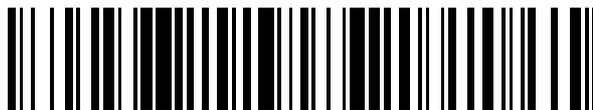


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 392**

21 Número de solicitud: 201330200

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**15.02.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.08.2014**

Fecha de la concesión:

**25.03.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**01.04.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (100.0%)  
Edif. Emprendia Campus Vida(Susana Torrente)  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ-ANDRADE FERNÁNDEZ, Rita;  
ARIAS VÁZQUEZ, María Sol y  
PAZ SILVA, Adolfo**

54 Título: **Medio de cultivo para la producción conjunta de hongos con actividad parasitica**

57 Resumen:

Medio de cultivo para la producción conjunta de hongos con actividad parasitica.  
El medio de cultivo comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una o varias sales minerales y una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. Dicho medio de cultivo puede ser utilizado en un método para el desarrollo simultáneo de diferentes especies de hongos, que incluye el crecimiento de sus micelios y la producción de formas de perennización (esporas) por parte de dichos hongos.

ES 2 486 392 B2

**DESCRIPCIÓN**

**MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN CONJUNTA DE HONGOS CON  
ACTIVIDAD PARASITICIDA**

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con un medio de cultivo de microorganismos y sus aplicaciones. Dicho medio puede ser utilizado en un método para el desarrollo  
10 simultáneo de diferentes especies de hongos, que incluye el crecimiento de sus micelios y la producción de formas de perennización (esporas) por parte de dichos hongos.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

En los últimos años ha aumentado la cría de animales en régimen de pastoreo debido en parte al cierre de las explotaciones clásicas, acuciadas por el incremento de los costes y la reducción de ingresos. Estos sistemas de manejo (semi-extensivo, extensivo) aportan una serie de ventajas como la reducción de masa vegetal  
20 combustible, que disminuye el riesgo de incendios y acrecienta los beneficios que se pueden obtener de explotaciones arbóreas, mejoría del paisaje y transitabilidad de parajes naturales, y obtención de productos *sanos* y con características organolépticas muy destacables. Estas condiciones facilitan la infección de los animales por diferentes agentes, entre los que destacan por su importancia socioeconómica algunos  
25 parasitismos (protozoosis, cestodosis, trematodosis, nematodosis, miasis, ectoparasitosis), que merman la condición corporal, y con ello su rendimiento.

Las infecciones parasitarias del ganado, en particular las parasitosis causadas por helmintos, son uno de los principales problemas de salud en el ganado, causando  
30 importantes pérdidas económicas en el ámbito de la ganadería. El control de las helmintosis parasitarias se ha abordado tradicionalmente mediante la administración de antihelmínticos de naturaleza química altamente efectivos, cuyo uso indiscriminado ha llevado al desarrollo de cepas de parásitos resistentes a estos agentes químicos. Adicionalmente, la ecotoxicidad de algunos de estos compuestos en el marco de una  
35 sociedad que demanda el uso de productos ecológicos u orgánicos se ha convertido en una preocupación cada vez mayor por parte de los ganaderos.

El programa WORMCOPS (*worm control in organic production systems for small ruminants in Europe*) recomienda el uso del control integrado como una estrategia dirigida a detener o al menos retrasar el desarrollo de las resistencias a antihelmínticos y sus consecuencias en el ámbito de la Comunidad Europea, limitando el uso de fármacos, exclusivamente, con fines terapéuticos. Pese a todo, la lucha frente a los parasitismos se centra en la administración de fármacos, muy complicada en animales en extensivo por las condiciones de manejo, de modo que al recibir menos cuidados, alcanzan importantes porcentajes de infección por algunos helmintos (nematodos gastrointestinales y trematodos) (Arias *et al.*, 2011. *Livestock: Rearing, Farming Practices and Diseases*, Nova Science Publishers, Hauppauge NY, capítulo 5 páginas 105-126). Como no se suelen utilizar otras medidas de carácter preventivo que disminuyan la presencia de formas infectivas en los pastos, la desparasitación supone una medida temporal.

En este contexto surgió el control biológico de algunos helmintos nematodos que parasitan al ganado, que se ha basado en el uso de los enemigos naturales de los nematodos como agentes capaces de destruir las fases de vida libre de nematodos parásitos previniendo de esta forma la infección del ganado. Se han estudiado diversos organismos como ciertas bacterias, hongos, protozoos, otros nematodos y artrópodos como posibles agentes de control biológico. Entre todos ellos, el uso de hongos nematófagos, y en particular de la especie *Duddingtonia (Arthrobotrys) flagrans*, ha demostrado tener un gran potencial como herramienta de control biológico de infecciones provocadas por nematodos estrogilados.

Los hongos nematófagos son organismos del suelo que poseen la capacidad de transformar sus micelios en trampas especializadas para capturar y destruir las larvas de nematodos ya sea en el suelo o en las heces de los animales. *D. flagrans*, además de ser un predador de nematodos altamente eficiente debido a su capacidad de formar redes tridimensionales adhesivas, produce una gran cantidad de esporas de resistencia que soportan el paso a través del tracto gastrointestinal de los animales para ser liberadas en las heces, donde ejercen su acción predatora sobre las larvas de los parásitos.

Sin embargo, si bien el uso de *D. flagrans* ha demostrado ser eficaz en la reducción de la población de larvas de nematodos en los pastos de los que se alimenta el ganado, dicho hongo no tiene actividad sobre los huevos de otras formas parasitarias, como cestodos, trematodos y ciertos nematodos (no estrogilados; ascáridos, tricúridos).

Existen distintos tipos de hongos parasitoides con actividad depredadora sobre diferentes estadios de nematodos, pero cada uno de estos hongos tiene unos requerimientos específicos respecto al medio de cultivo que necesita para su producción.

5

Los métodos de cultivo que se han empleado para la producción a gran escala de hongos nematófagos se basan en soportes sólidos (fermentación en estado sólido), en cultivos líquidos sumergidos (fermentación líquida) o combinaciones de ambos (fermentación bi-fásica). Se prefieren los medios líquidos porque al evitar la adición de agar y el uso de placas Petri reducen los costes y agilizan la producción, y permiten la obtención de esporas que puedan ser administradas a los animales por vía oral. Además, el cultivo de hongos en medios sólidos suele conllevar la contaminación con ácaros. Dado que los ácaros no sobreviven al medio acuoso, otra ventaja de emplear medios líquidos para la producción de estos hongos sería evitar la contaminación del cultivo con ácaros.

Se han desarrollado algunos medios de cultivo aptos para la producción de varios tipos de hongos nematófagos. Se trata de medios líquidos compuestos esencialmente por una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno. Así por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO9428725 describe un medio de cultivo líquido que comprende una fuente de carbono, que puede ser glucosa, sacarosa o melaza; y una fuente de nitrógeno, minerales y vitaminas, como por ejemplo licor de maceración de maíz, harina de soja, harina de pescado o harina de semillas de algodón. Dicho medio es apto para la producción de diversos tipos de hongos nematófagos, como hongos endoparásitos, hongos que atrapan nematodos y hongos parásitos de huevos, pero los hongos deben ser producidos de forma individual y posteriormente combinados en una composición para el control biológico de nematodos que parasitan plantas.

La solicitud de patente europea EP0494592 describe un método adecuado para la producción simultánea de varias especies de hongos, pero dicho método va dirigido a la obtención de una biomasa formada esencialmente por un micelio y no por esporas. La obtención de esporas en el control biológico de nematodos parásitos de ganado es deseable puesto que, tal y como se ha indicado anteriormente para *D. flagrans*, dichas formas de resistencia son capaces de atravesar el tracto gastrointestinal de los animales para ser eliminadas en las heces donde germinan dando lugar a un micelio que ejerce su acción depredadora sobre las larvas 3 o fases infectivas de algunos nematodos.

5 Por el momento no se han descrito medios de cultivo útiles en la producción simultánea de varias especies de hongos parasiticidas con actividad frente a helmintos cestodos, trematodos y nematodos, lo que permitiría abaratar los costes y agilizar el proceso de producción.

10 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un medio de cultivo que permita la producción simultánea de varios tipos de hongos parasiticidas, de forma que se obtenga una preparación de esporas que se pueda administrar al ganado formando parte del pienso y que actúe como agente de control biológico protegiendo al ganado de la infección de distintas formas de helmintos parásitos.

### **COMPENDIO DE LA INVENCIÓN**

15 En un primer aspecto, la invención se relaciona con un medio de cultivo de microorganismos que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una o varias sales minerales y una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

20 En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método de cultivo de microorganismos que comprende inocular un microorganismo en un medio de cultivo según el primer aspecto e incubar dicho medio a una temperatura comprendida entre 16 y 22°C.

25 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método para la producción de esporas de un hongo que comprende inocular dicho hongo en un medio de cultivo según el primer aspecto y mantener dicho medio a una temperatura comprendida entre 16°C y 22°C durante un periodo de tiempo suficiente para la producción de esporas.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

30 La invención se basa, en general, en el descubrimiento de que una proteína con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 es capaz de estimular el crecimiento de varias especies de hongos parasiticidas, por lo que su inclusión en un medio de cultivo permite el crecimiento simultáneo en medio líquido de varias especies  
35 de dichos hongos parasiticidas así como la producción de esporas por parte de dichos hongos.

En base a este descubrimiento, se han desarrollado los aspectos inventivos que se explican con detalle a continuación.

##### 5 *Medio de cultivo de microorganismos*

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un medio de cultivo de microorganismos, en adelante medio de cultivo de microorganismos de la invención o medio de cultivo de la invención, que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales minerales y una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

El término “medio de cultivo de microorganismos”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a cualquier sustancia o preparación usada para el cultivo de microorganismos. El término “medio”, según se usa en referencia a un cultivo de microorganismos, incluye los componentes del entorno que rodea a los microorganismos. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquidos así como medios líquidos que no mantienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como matrices de agar, agarosa, gelatina y colágeno. Los medios gaseosos a modo de ejemplo incluyen la fase gaseosa a la que se exponen células que crecen en una placa Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término “medio” también se refiere al material previsto para su uso en un cultivo celular, aunque aún no se haya puesto en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para el cultivo de un microorganismo es un medio. De manera similar, una mezcla en polvo que cuando se mezcla con agua u otro líquido se vuelve adecuada para el cultivo de un microorganismo, puede denominarse “medio en polvo”. El “medio definido” se refiere a medios que están compuestos por componentes químicamente definidos (habitualmente purificados). Los “medios definidos” no contienen extractos biológicos mal caracterizados tales como extracto de levadura y caldo de ternera. El “medio rico” incluye medios que están diseñados para soportar el crecimiento de la mayor parte o todas las formas viables de una especie particular. Los medios ricos incluyen a menudo extractos biológicos complejos.

El medio de cultivo de la invención es apto para el cultivo de microorganismos. El término “microorganismo”, tal y como se usa en la presente descripción, incluye

bacterias, hongos, levaduras, protozoos, etc. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microorganismo es un hongo.

5 El medio de cultivo de microorganismos de la invención comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales minerales y una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

10 El término "fente de carbono", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto que pueda ser empleado como suministro de carbono para el crecimiento y el metabolismo de un microorganismo. Cualquier fuente de carbono conocida en el estado de la técnica por ser adecuada para el cultivo de microorganismos se puede emplear en el medio de cultivo de microorganismos de la invención. Ejemplos ilustrativos no limitativos de fuentes de carbono útiles para el  
15 medio de cultivo de la invención son monosacáridos como glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xilosa; disacáridos como lactosa, sacarosa, maltosa; alcoholes como glicerol y manitol; polisacáridos como almidón soluble o almidón sacarificado, celulosa, pectina; acetatos; ácidos como ácidos alquilcarboxílicos; compuestos derivados de vegetales como melazas, harinas de cereales, etc. En una forma particular de  
20 realización del medio de cultivo de la invención la fuente de carbono es harina de cereal, preferiblemente de *Triticum aestivum*.

El término "fente de nitrógeno", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto que pueda ser empleado para suministrar nitrógeno para el  
25 crecimiento y/o metabolismo de un microorganismo. Cualquier fuente de nitrógeno conocida en el estado de la técnica por ser adecuada para el cultivo de microorganismos se puede emplear en el medio de cultivo de microorganismos de la invención. Ejemplos ilustrativos no limitativos de fuentes de nitrógeno útiles para el medio de cultivo de la invención son fuentes de nitrógeno que se producen de manera  
30 natural (por ejemplo, peptona, neopeptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, casaminoácidos, licor de maceración de maíz, proteína de soja, soja desgrasada, harina de semilla de algodón, harina de cereales, etc.), fuentes de nitrógeno orgánico (por ejemplo, urea, aminoácidos, etc.), y fuentes de nitrógeno inorgánico (por ejemplo, nitrato de sodio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, etc.).  
35 En una forma particular de realización del medio de cultivo de la invención, la fuente de nitrógeno es harina de cereal, preferiblemente de *Triticum aestivum*.

En una forma preferida de realización la fuente de carbono y de nitrógeno es la misma. En una forma más preferida de realización, dicha fuente de carbono y nitrógeno es harina de cereal. El término “harina de cereal”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al polvo resultante de moler el grano de cereal. El término “cereal”, tal y como se emplea aquí, incluye tanto las plantas gramíneas que dan frutos farináceos como sus frutos. Ejemplos no limitativos de cereales útiles en el medio de cultivo de la invención son trigo, centeno, cebada, maíz, avena, mijo, arroz, etc. En una forma aún más preferida de realización el cereal es *Triticum aestivum* o trigo autóctono. El término “*Triticum aestivum*”, “trigo autóctono”, “trigo común” o “trigo harinero”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una especie alohexaploide perteneciente al género *Triticum* clasificada como *Triticum aestivum* según la taxonomía usada por la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?>, *Taxonomy ID*: 4565), e incluye las subespecies *T. aestivum* subsp. *Tibeticum* (trigo tibetano) y *T. aestivum* subsp. *Yunnanense* y las variedades *T. aestivum* var. *albirubrinflatum*, *T. aestivum* var. *erythrospermum* y *T. aestivum* var. *vavilovii*.

El medio de cultivo de microorganismos de la invención también comprende una o varias sales minerales. Las sales minerales que pueden formar parte del medio de cultivo de la invención pueden aportar uno o varios macronutrientes (como nitrógeno, potasio, fósforo, azufre, calcio, magnesio) y/o uno o varios micronutrientes esenciales (como hierro, sodio, cloro, manganeso, zinc, boro, cobre, níquel, molibdeno). Ejemplos ilustrativos no limitativos de sales minerales que pueden ser incorporadas al medio de la invención son aquellas que aportan nitratos ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ), sulfatos ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), halógenos ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) hierro ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), etc.

En una forma preferida de realización del medio de cultivo de la invención, las sales minerales son  $\text{NaCl}$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

El medio de cultivo de la invención contiene una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. El término “proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una proteína que presenta en su secuencia de aminoácidos la secuencia mostrada en

SEQ ID NO: 1. Como el experto en la materia entenderá, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 puede encontrarse formando parte de la proteína bien en su extremo amino-terminal, bien en su extremo carboxilo-terminal o bien en una región de la secuencia primaria de la proteína diferente a los extremos amino o carboxilo. La proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 es capaz de favorecer la producción de esporas por parte de un microorganismo, preferiblemente un hongo, cuando forma parte del medio de cultivo de la invención.

En una realización particular, la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 es la proteína recombinante APS de *Fasciola hepatica*. El término “proteína APS de *Fasciola hepatica*”, según se usa en la presente invención, se refiere a una proteína de 2,9 KDa definida por la secuencia de la base de datos Uniprot con número de acceso Q6B7I7 con fecha de 11 de julio de 2012, o por la secuencia de la base de datos GenBank con número de acceso AAT78430.1 que corresponde a la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 1. El término “*Fasciola hepatica*” o “trematodo hepático” o “duela del hígado”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un organismo identificado según la base de datos del NCBI por el *Taxonomy ID*: 6192. Dicho organismo es una especie de platelminto parásito de la clase Trematoda, que infecta el hígado de varios mamíferos causando una enfermedad denominada fascioliasis o fasciolosis, que afecta especialmente al ganado rumiante que se infecta al ingerir pasto que contiene la forma infectiva de trematodo.

La proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 puede aislarse a partir de la naturaleza o puede producirse mediante medios recombinantes y/o sintéticos. Así por ejemplo, la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 puede ser una proteína recombinante obtenida por la expresión de un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 en un organismo heterólogo, como una bacteria, levadura, célula de insecto o célula de mamífero. Dicha proteína puede ser expresada como una proteína de fusión, unida en su extremo amino o carboxilo terminal a un péptido etiqueta para facilitar su posterior purificación. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de péptidos etiqueta que se pueden fusionar a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 son colas de polihistidina (etiquetas de His) (por ejemplo, H6 y H10, etc.), fusiones con GST, fusiones con MBP, etiquetas de estreptavidina, la secuencia diana de biotilación BSP de la enzima bacteriana BIRA y epítomos etiqueta dirigidos por anticuerpos (por ejemplo, etiquetas c-myc, etiquetas FLAG, entre otras). Como observará el experto en

la materia, dicho péptido etiqueta se puede usar para purificar, inspeccionar, seleccionar y/o ver la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Un ejemplo de cómo obtener dicha proteína recombinante es el descrito en Paz-Silva et al, 2005. Parasitology Research, 95: 129–135, a partir de la  
5 expresión del polinucleótido de número de acceso en la base de datos GenBank AY676331, y posterior purificación de la proteína de fusión resultante.

La invención contempla el uso de variantes funcionalmente equivalentes de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Por  
10 “variante funcionalmente equivalente de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1”, tal y como aquí se utiliza, se entiende toda molécula que comparte con la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 un mínimo de identidad en la secuencia de aminoácidos y que además es capaz de desempeñar esencialmente las mismas funciones, en  
15 concreto, que es capaz de promover la producción de esporas por parte de microorganismos, preferiblemente de hongos. El experto en la materia sabe cómo determinar si una proteína promueve la producción de esporas por parte de un microorganismo, preferiblemente un hongo, empleando para ello técnicas conocidas, como por ejemplo las técnicas descritas en los ejemplos de la presente descripción. A  
20 modo de ejemplo ilustrativo, se puede determinar si una proteína con un mínimo de identidad de secuencia con la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 es capaz de promover la producción de esporas por parte de un microorganismo y, por tanto, es una variante funcionalmente equivalente de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1,  
25 comparando la producción de esporas por parte de un microorganismo, preferiblemente un hongo, cuando se emplea un medio como el de la invención y cuando se emplea un medio igual pero que carece de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. Si una proteína es capaz de producir un incremento de al  
30 menos un 5% en la producción de esporas por parte de un microorganismo, preferiblemente un hongo, con respecto a la producción de esporas por parte de dicho microorganismo en idénticas condiciones pero en ausencia de dicha proteína, entonces dicha proteína es capaz de promover la producción de esporas por parte de dicho microorganismo. Las variantes funcionalmente equivalentes de la proteína que  
35 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 tienen una identidad de secuencia con dicha proteína de al menos un 60%, típicamente al menos un 70%, ventajosamente al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%.

La expresión y purificación de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma puede realizarse según métodos conocidos por el experto en la materia y descritos en el estado de la técnica.

En una forma particular de realización, la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 es una proteína recombinante. En una realización aún más preferida, dicha proteína recombinante se expresa en bacterias fusionada a GST para facilitar su purificación.

El medio de cultivo de microorganismos de la invención puede contener los diferentes elementos que lo forman en distintas proporciones. Típicamente, la fuente de carbono representa entre un 0,5% y un 5% de la composición del medio, más preferiblemente entre un 1% y un 3% de la composición del medio, aún más preferiblemente entre un 1,5% y un 3% de la composición del medio. La fuente de nitrógeno típicamente representa entre un 0,2% y un 3,5% de la composición del medio, más preferiblemente entre un 0,5% y un 3% de la composición del medio, aún más preferiblemente entre un 1% y un 2% de la composición del medio. En una forma preferida de realización el medio de cultivo de la invención comprende harina de *Triticum aestivum* a una concentración de 30,6 g/L (3,06 %, m/v) como fuente de carbono y de nitrógeno.

En una forma de realización, el medio de cultivo comprende NaCl a una concentración de 7,1 g/L y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O a una concentración de 1,6 g/L.

En una forma preferida de realización, la composición del medio de la invención por litro de agua es la siguiente:

7,1 g de NaCl

1,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O

0,423 mg de la proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1

30,6 g de harina de *Triticum aestivum*

En otra forma preferida de realización, la composición del medio de la invención por litro de agua es la siguiente:

7,1 g de NaCl

1,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O

0,423 mg de la proteína que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1

30,6 g de harina de *Triticum aestivum*

En una forma preferida de realización, el medio de cultivo de microorganismos de la invención es un medio líquido.

5

*Método de cultivo de microorganismos*

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de cultivo de microorganismos, en adelante primer método de la invención, que comprende inocular  
10 un microorganismo en un medio de cultivo según el primer aspecto e incubar dicho medio en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo.

El término "método de cultivo de microorganismos", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un método que permite el mantenimiento y/o crecimiento de  
15 microorganismos y/o la progenie de los mismos.

El término "microorganismo" ha sido descrito previamente en el contexto del medio de cultivo de la invención.

20 En una realización particular del segundo método de la invención, el microorganismo es un hongo. El término "hongo", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a todos aquellos seres vivos clasificados dentro del reino *Fungi*, caracterizados por ser organismos eucariotas cuyas paredes celulares están compuestas por quitina y de nutrición heterótrofa por absorción. Dentro del término hongo se incluyen las  
25 divisiones *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota*. Preferiblemente, los hongos que se pueden cultivar mediante el primer método de la invención pueden ser hongos saprófitos (aquellos que obtienen los nutrientes a partir de materia orgánica en descomposición), hongos simbioses (aquellos que obtienen los nutrientes a partir de otro ser vivo con el que establecen  
30 una relación mutualista, como los que forman parte de líquenes y micorrizas) u hongos parásitos, ya sea parásitos obligados o biótrofos (obtienen los nutrientes a partir de un hospedador vivo sin causarle la muerte) o parásitos facultativos o necrótrofos o predadores (aquellos que atacan a seres vivos a los que parasitan hasta causarles la  
35 obteniendo los nutrientes de su hospedador y en las siguientes etapas se alimentan como hongos saprófitos obteniendo los nutrientes de su hospedador ya muerto). Los

hongos parásitos pueden parasitar animales, plantas e incluso otros hongos. Dentro de los hongos predadores destacan los que tienen capacidad parasiticaida.

5 En una realización particular del primer método de la invención, el hongo se caracteriza por su actividad parasiticaida, preferiblemente es un hongo con actividad parasiticaida sobre helmintos parásitos, y más preferiblemente sobre cestodos, trematodos y nematodos. El término “hongo con actividad parasiticaida”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a todos aquellos hongos predadores de organismos parásitos, preferiblemente helmintos, incluyendo cestodos, trematodos y  
10 nematodos. Los hongos con actividad parasiticaida incluyen hongos que atrapan nematodos y hongos que parasitan huevos de parásitos.

Los hongos parasiticaidas predadores de nematodos reciben el nombre de hongos nematófagos. El término “hongo nematófago”, tal y como se emplea en la presente  
15 descripción, se refiere a un hongo que generalmente vive en el suelo o en excrementos y que en algún momento de su ciclo vital se alimenta de los estadios libres (larvas) de helmintos nematodos. Los hongos nematófagos muestran una especificidad variable respecto a las especies de nematodos que infectan, pero en general sólo infectan larvas de nematodos parásitos de plantas y animales.

20 El término “hongo que atrapa nematodos”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un hongo capaz de capturar larvas de nematodos mediante órganos especiales de captura que se forman en sus hifas (hifas adhesivas, redes, pedúnculos, ramas, anillos constrictores, etc.). Una vez atrapado el nematodo, el  
25 hongo lo parasita. Ejemplos ilustrativos no limitativos de hongos que atrapan nematodos son *Duddingtonia flagrans* (o *Arthrobotrys flagrans*), *Arthrobotrys oligospora*, *Monacrosporium haptotylum*, *Monacrosporium gephyropagum*, *Stylopage hadra*, *Arthrobotrys dactyloides*, *Pleurotus ostreatus*. En una forma preferida de realización del método de la invención, el hongo que atrapa nematodos es  
30 *Duddingtonia flagrans*.

El término “*Duddingtonia flagrans*”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una especie de hongo ascomiceto identificado por en la base de datos de NCBI por el *Taxonomy ID: 47257*.

35 El término “hongo parásito de huevos”, tal y como se emplea en la presente descripción”, se refiere a hongos que parasitan huevos y quistes de cestodos y

trematodos, y de nematodos en los que la larva no abandona el huevo, tales como ascáridos y tricúridos. Se entiende por ascáridos a los nematodos de los géneros *Ascaris*, *Parascaris*, *Toxocara* o *Toxascaris*. Se entiende por tricúridos a los nematodos del género *Trichuris*. Los hongos parasitocidas predadores de cestodos se denominan cestocidas, dado que su actividad consiste en reducir la viabilidad de huevos o quistes de estos parásitos. Los hongos predadores de trematodos o trematocidas presentan idéntico mecanismo de acción, puesto que provocan alteraciones en los huevos de estos parásitos que conducen a la pérdida de su viabilidad.

- 5
- 10 Los hongos parásitos de huevos producen apresorios que son estructuras de infección en los extremos de las hifas que se adhieren a la cubierta del huevo. Ejemplos ilustrativos no limitativos de hongos parásitos de huevos son los del género *Mucor* (*Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, etc), *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Catenaria* (*Catenaria auxiliaris*, etc), *Lagenidium*, *Nematophthora* (*Nematophthora gynophila*, etc), *Fusarium*, *Gliocadium*, *Verticillium* y *Pochonia* (*Pochonia chlamydosporia* (anteriormente denominado *Verticillium chlamydosporium*), etc). En una forma preferida de realización del método de cultivo de la invención el hongo parásito de huevos se selecciona del grupo formado por los géneros *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pochonia* o *Verticillium*. En una forma aún más preferida de realización,
- 15
- 20 el hongo parásito de huevos es *Mucor circinelloides*.

El término "Verticillium", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un género de hongos ascomicetos identificado en la base de datos de NCBI por los Taxonomy ID: 5106, 264599 y 1036719.

25

El término "Pochonia", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un género de hongo ascomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 243023.

- 30 El término "Pochonia chlamydosporia" o "Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporia" o "Metacordyceps chlamydosporia var. chlamydosporia" o "Verticillium chlamydosporium" o "Verticillium chlamydosporium var. chlamydosporium", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una especie de hongo ascomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el
- 35 Taxonomy ID: 280754.

El término "Mucor", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un

género de hongo zigomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 4830.

5 El término "*Mucor circinelloides*", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una especie de hongo zigomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 36080.

10 El término "*Fusarium*", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una especie de hongo zigomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID:5506. Se trata de un hongo con actividad ovicida.

15 El término "*Trichoderma*.", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un género de hongo zigomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 5543.

En una forma particular de realización del primer método de la invención, el hongo con actividad parasitocida se selecciona del grupo formado por un hongo que atrapa nematodos, y un hongo que parasita huevos de parásitos.

20 El primer método de la invención requiere inocular el medio de cultivo según el primer aspecto con uno o varios microorganismos, preferiblemente, con uno o varios hongos, más preferiblemente, uno o varios hongos con actividad parasitocida, y aún más preferiblemente, con actividad parasitocida sobre helmintos. Los hongos con actividad parasitocida se pueden aislar a partir de diferentes sustratos incluyendo muestras de heces, tierra, raíces o materia orgánica. El experto en la materia sabe cómo aislar los  
25 hongos con actividad parasitocida que van a ser empleados en el primer método de la invención. Por ejemplo, se puede emplear la técnica del espolvoreado de suelo en placa (Barron G. L., 1977, Topics in Mycobiology No.1, Canadian Biological Publications; Guelph, Ont./Canada). Esta técnica consiste en tomar una pequeña cantidad de suelo (0,1-2 g) y espolvorearla sobre el medio de cultivo. Habitualmente el  
30 espolvoreado se realiza en placas Petri empleando un medio de cultivo bajo en nutrientes, como el agua-agar, y se incuba durante un periodo de tiempo aproximado de dos semanas. Durante este tiempo se observa el cultivo diariamente con el fin de identificar estructuras fúngicas, como hifas, conidios, esporas, trampas, etc. Para obtener un cultivo puro, libre de contaminantes, se llevan a cabo pases sucesivos en  
35 las placas Petri, transfiriendo las estructuras fúngicas con características propias de

los hongos nematófagos a una nueva placa con medio pobre en nutrientes sucesivamente hasta obtener una cepa pura.

Cualquier método que permita obtener o aislar microorganismos, preferiblemente, hongos, más preferiblemente, hongos con actividad parasitocida, y aún más preferiblemente hongos con actividad parasitocida sobre helmintos, es útil para la obtención de los microorganismos que van a ser inoculados en el medio de cultivo del primer aspecto según el primer método de la invención.

El término “inocular”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la acción de depositar una parte del microorganismo en el medio de cultivo. En el caso de que el microorganismo sea un hongo, el inóculo puede estar formado por esporas, micelio u otra biomasa del hongo.

El primer método de la invención comprende incubar el medio de cultivo según el primer aspecto, previamente inoculado con un microorganismo, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo. Las “condiciones adecuadas para el crecimiento de un microorganismo” varían dependiendo del tipo de microorganismo y son conocidas por el experto en la materia. En el caso de que el microorganismo sea un hongo, en particular un hongo con actividad parasitocida sobre helmintos, las condiciones adecuadas para el crecimiento son temperatura entre 16 y 22°C, más preferiblemente entre 18 y 20°C. Por crecimiento se entiende desarrollo de micelio (hifas) y producción de esporas.

El primer método de la invención permite el cultivo simultáneo de más de una especie de hongo. En una forma preferida de realización del primer método de la invención, se inoculan dos o más hongos con actividad parasitocida sobre helmintos. En una forma aún más preferida de realización, se inoculan dos o más hongos con actividad parasitocida de diferentes tipos, por ejemplo, un hongo que atrapa nematodos y un hongo parásito de huevos, o un hongo que atrapa nematodos y un hongo endoparásito, etc.

En una forma particular de realización del método de cultivo de la invención, se inocula un hongo que atrapa nematodos junto con uno o más hongos parásitos de huevos. En una realización preferida, el hongo que atrapa nematodos es *Duddingtonia flagrans* y el hongo parásito de huevos se selecciona del grupo formado por *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pochonia* y *Verticillium*. En una realización más preferida, el hongo

parásito de huevos es *Mucor circinelloides*.

En una realización particular del método de cultivo de la invención, se inocula *Duddingtonia flagrans* y *Mucor circinelloides*.

5

*Método para la producción de esporas*

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la producción de esporas, en adelante segundo método de la invención, de un hongo, que comprende  
10 inocular dicho hongo en un medio de cultivo según el primer aspecto y mantener dicho medio a una temperatura comprendida entre 16°C y 22°C durante un periodo de tiempo suficiente para la producción de esporas. En una realización más preferida, la temperatura está comprendida entre 18 y 20°C

15 El término “espora”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una célula reproductora producida por un hongo e incluye tanto las esporas asexuales como las sexuales. Las esporas asexuales son generalmente resistentes a la sequedad y la radiación, pero no especialmente al calor, por lo que no tienen un periodo de latencia. Son capaces de germinar cuando hay humedad incluso en  
20 ausencia de nutrientes. Dentro de las esporas asexuales se incluyen clamidiosporas, esporangiosporas y conidiosporas. Las esporas sexuales son más resistentes al calor que las asexuales, presentan periodo de latencia y son capaces de germinar sólo cuando son activadas por calor suave o por determinadas sustancias químicas.

25 En una realización particular del segundo método de la invención, el hongo es un hongo con actividad parasitocida, preferiblemente un hongo con actividad sobre helmintos parásitos seleccionados de la lista que comprende: cestodos, trematodos y nematodos. En una realización aún más particular, el hongo con actividad parasitocida se selecciona del grupo formado por un hongo que atrapa nematodos, y un hongo  
30 parásito de huevos.

Los términos “inocular”, “hongo”, “hongo con actividad parasitocida”, “hongo que atrapa nematodos”, y “hongo parásito de huevos” han sido descritos previamente en el contexto del primer método de la invención.

35

En una forma preferida de realización, el hongo que atrapa nematodos es *Duddingtonia flagrans*. En otra forma preferida de realización, el hongo parásito de

huevos se selecciona del grupo formado por *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pochonia* y *Verticillium*. En una realización más preferida, el hongo parásito de huevos es *Mucor circinelloides*.

- 5 El segundo método de la invención permite la obtención de esporas a partir de más de una especie de hongo. En una forma preferida de realización del método de la invención, se inoculan dos o más hongos con actividad parasitocida sobre helmintos. En una forma aún más preferida de realización, se inoculan dos o más hongos con actividad parasitocida de diferentes tipos, por ejemplo, un hongo que atrapa nematodos  
10 y un hongo parásito de huevos, o un hongo que atrapa nematodos y un hongo endoparásito, etc.

En una forma particular de realización del segundo método de la invención, se inocula el hongo *Duddingtonia flagrans* junto con uno o más hongos parásitos de huevos. En  
15 una forma aún más particular del segundo método de la invención, se inoculan *Duddingtonia flagrans* y *Mucor circinelloides*.

El segundo método de la invención comprende inocular el hongo o los hongos en el medio de cultivo de microorganismos de la invención y mantener dicho medio en  
20 oscuridad durante un periodo de tiempo suficiente para la obtención de esporas por parte de dicho hongo u hongos. La incubación se produce preferiblemente a una temperatura comprendida entre los 16 y los 22°C, más preferiblemente entre 18 y 20°C.

- 25 El término “periodo de tiempo suficiente para la producción de esporas”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un periodo de tiempo que permite obtener un rendimiento considerado deseable en la producción de esporas. El periodo de tiempo suficiente para la producción de esporas varía dependiendo de la especie o especies de hongos empleados, y puede ser determinado por el experto en la materia.  
30 Por ejemplo, el medio de cultivo en el que se ha inoculado el hongo u hongos puede ser analizado cada cierto tiempo para detectar la presencia de esporas. El experto en la materia conoce técnicas adecuadas para detectar y cuantificar la presencia de esporas en un medio, como la observación al microscopio de contraste de fase y el recuento de las esporas mediante una cámara de recuento celular tipo Neubauer, tal y  
35 como se ilustra en los ejemplos incluidos en la presente descripción. En una forma particular de realización, el periodo de tiempo adecuado para la producción de esporas está comprendido entre 16 y 30 días. En una realización preferida, el período de

tiempo adecuado para la producción de esporas es de 20 días.

Los ejemplos específicos que se proporcionan a continuación sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines  
5 ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

## EJEMPLOS

### 10 **Materiales y métodos**

El presente estudio se desarrolló con varios hongos aislados en el laboratorio del grupo COPAR (Facultade de Veterinaria de Lugo, USC), demostrándose que tenían actividad parasitocida frente a huevos (*Mucor circinelloides*, *Trichoderma* sp, *Fusarium* sp.) y larvas (*Duddingtonia flagrans*).

15 La producción de esporas de *Mucor circinelloides* y *Duddingtonia flagrans* se realizó en 2 medios de cultivo, sólido (en placa) y líquido (COPFr). La producción de esporas de *Trichoderma* sp, y *Fusarium* sp se realizó únicamente en medio líquido (COPFr).

a) Producción de esporas en medio sólido

20 Se preparó un medio compuesto por de 30 g de trigo (*Triticum aestivum*) y 50 mg de cloramfenicol por litro de agua. Después de esterilizar en autoclave (121°C, 20 min), el medio se vertió en placas Petri de 9 cm de diámetro (40 mL/placa) en una cámara de flujo laminar, y se dejó enfriar bajo la acción de luz UV.

Las placas se sembraron con los hongos mediante la adición de inóculos de 4x4 cm  
25 de placas madre, manteniéndose en estufa a 20-25°C durante 20 días.

Se prepararon un total de 8 placas. Para facilitar el recuento de las esporas formadas, se procedió a delimitar 8 áreas de 1,5 cm<sup>2</sup> en cada placa.

b) Producción de esporas en medio líquido (COPFr)

30 La composición del medio COPFr fue la siguiente (por L de agua): 7,1 g NaCl, 1,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12 H<sub>2</sub>O, 0,423 mg proteína FhrAPS (proteína recombinante de *Fasciola hepatica*) y 30,6 gramos trigo autóctono (*Triticum aestivum*). Se prepararon 10 L del medio COPFr, que se introdujeron en dos bidones de nalgene y se sometieron a autoclave (121°C, 20 min). Después de enfriar, se añadieron inóculos de los 2 hongos  
35 (50 mL de un cultivo previo), y los bidones se colocaron en oscuridad y temperatura ambiente (18-22°C) durante 20 días.

El recuento del número de esporas formadas se realizó en alícuotas de 1 mL de

medio, recogándose 20 muestras de cultivo (10 en cada bidón).

c) Recuento de esporas

- 5 Para hallar la concentración de clamidiosporas se empleó una cámara de recuento celular de tipo Neubauer a 10x, compuesta por 4 cuadrículas de 4x4 y 1 central de 5x5. Es importante tener en cuenta que el recuento se hace por duplicado.

**Resultados**

10

En la tabla 1 se recogen los resultados obtenidos tras el crecimiento de los hongos en medio sólido. Se apreció una mayor producción de esporas de *Mucor*, que osciló entre 84 y 102·10<sup>6</sup>, en tanto que el rango en las de *Duddingtonia* fue de 73-85·10<sup>6</sup>.

15

| Tabla 1.- Producción conjunta de esporas de <i>Duddingtonia flagrans</i> (Df) y <i>Mucor circinelloides</i> (Mc) en medio de cultivo sólido. |                        |                        |
|--|------------------------|------------------------|
| Placa  | Df (x10 <sup>6</sup> ) | Mc (x10 <sup>6</sup> ) |
| 1  | 82                     | 84                     |
| 2  | 76                     | 89                     |
| 3  | 85                     | 93                     |
| 4  | 73                     | 86                     |
| 5  | 77                     | 95                     |
| 6  | 81                     | 102                    |
| 7  | 84                     | 97                     |
| 8  | 82                     | 98                     |
| Media  | 80 ± 4'21              | 93 ± 6'23              |

20 La utilización del medio de cultivo líquido COPFr proporcionó un valor medio de 100·10<sup>6</sup> esporas de *Duddingtonia*, por 122·10<sup>6</sup> de *Mucor*.

| Tabla 2.- Producción conjunta de esporas de <i>Duddingtonia flagrans</i> (Df) y <i>Mucor circinelloides</i> (Mc) en medio de cultivo líquido (COPFr). |                        |                        |          |                        |                        |
|---|------------------------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|
| Alícuota  | Df (x10 <sup>6</sup> ) | Mc (x10 <sup>6</sup> ) | Alícuota | Df (x10 <sup>6</sup> ) | Mc (x10 <sup>6</sup> ) |

|              |            |            |              |           |            |
|--------------|------------|------------|--------------|-----------|------------|
| 1            | 98         | 132        | 11           | 99        | 129        |
| 2            | 105        | 125        | 12           | 100       | 118        |
| 3            | 102        | 122        | 13           | 91        | 130        |
| 4            | 101        | 121        | 14           | 119       | 111        |
| 5            | 100        | 123        | 15           | 92        | 118        |
| 6            | 99         | 119        | 16           | 93        | 109        |
| 7            | 119        | 121        | 17           | 92        | 132        |
| 8            | 93         | 117        | 18           | 102       | 116        |
| 9            | 93         | 119        | 19           | 102       | 131        |
| 10           | 100        | 123        | 20           | 100       | 124        |
| <i>Media</i> | 101 ± 7'33 | 122 ± 4'16 | <i>Media</i> | 99 ± 8'29 | 122 ± 8'53 |

- 5 La comparación de los resultados obtenidos con los dos medios de cultivo demostró un incremento del 20% en la producción de *Duddingtonia* en medio líquido, y de un 24% para *Mucor*. Mediante análisis de varianza se demostró la existencia de diferencias significativas ( $F= 47'695$ ,  $P= 0'001$  y  $F= 115'266$ ,  $P= 0'001$ , respectivamente).
- 10 Asimismo, tras el crecimiento de las especies *Trichoderma* sp, y *Fusarium* sp en el medio líquido se observó la producción de esporas por parte de ambos hongos, demostrando la viabilidad de este medio de cultivo para la producción conjunta de esporas de hongos parasiticidas.
- 15 **TRADUCCIÓN AL CASTELLANO DE TÉRMINOS EN INGLÉS QUE APARECEN EN LA LISTA DE SECUENCIAS**

El término "sequence listing" significa "lista de secuencias".

**REIVINDICACIONES**

1. Un medio de cultivo de microorganismos que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una o varias sales minerales y una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.  
5
2. Medio de cultivo de microorganismos según la reivindicación 1 en el que la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 es una proteína recombinante.
- 10 3. Medio de cultivo de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno es la misma.
4. Medio de cultivo de microorganismos según la reivindicación 3, en el que la fuente de carbono y de nitrógeno es harina de un cereal.
5. Medio de cultivo de microorganismos según la reivindicación 4, en el que el cereal es *Triticum aestivum*.  
15
6. Medio de cultivo de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las sales son NaCl y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
7. Medio de cultivo de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio por litro de agua comprende  
20 7,1 g de NaCl  
1,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O  
0,423 mg de la proteína que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1  
30,6 g de *Triticum aestivum*
8. Medio de cultivo de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho medio es un medio líquido.  
25
9. Un método de cultivo de microorganismos que comprende inocular un microorganismo en un medio de cultivo según las reivindicaciones 1 a 8 e incubar dicho medio a una temperatura comprendida entre 16 y 22°C.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el microorganismo es un hongo.
- 30 11. Método según la reivindicación 10, en el que el hongo es un hongo con actividad

parasitocida.

12. Método según la reivindicación 11, en el que el hongo con actividad parasitocida actúa sobre helmintos parásitos seleccionados de la lista que comprende: cestodos, trematodos y nematodos.
- 5 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en el que el hongo con actividad parasitocida se selecciona del grupo formado por un hongo que atrapa nematodos y un hongo parásito de huevos.
- 10 14. Método según la reivindicación 13, en el que el hongo que atrapa nematodos es *Duddingtonia flagrans*, y el hongo parásito de huevos se selecciona del grupo formado por *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pochonia* y *Verticillium*.
15. Método según la reivindicación 14, donde el hongo parásito de huevos es *Mucor circinelloides*.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende inocular dos o más hongos.
- 15 17. Un método para la producción de esporas de un hongo que comprende inocular dicho hongo en un medio de cultivo según las reivindicaciones 1 a 8 y mantener dicho medio a una temperatura comprendida entre 16°C y 22°C durante un periodo de tiempo suficiente para la producción de esporas.
- 20 18. Método según la reivindicación 17, en el que el periodo de tiempo suficiente para la producción de esporas está comprendido entre 16 y 30 días.
19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, en el que el hongo es un hongo con actividad parasitocida.
- 25 20. Método según la reivindicación 19 en el que el hongo con actividad parasitocida actúa sobre helmintos parásitos seleccionados de la lista que comprende: cestodos, trematodos y nematodos.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, en el que el hongo con actividad parasitocida se selecciona del grupo formado por un hongo que atrapa nematodos y un hongo parásito de huevos.
- 30 22. Método según la reivindicación 21, en el que el hongo que atrapa nematodos es *Duddingtonia flagrans*, y el hongo parásito de huevos se selecciona del grupo formado por *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pochonia* y *Verticillium*.

23. Método según la reivindicación 22, donde el hongo parasito de huevos es *Mucor circinelloides*.
24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23 que comprende inocular dos o más hongos seleccionados de un hongo que atrapa nematodos y un hongo parásito de huevos.
25. Método según la reivindicación 24 en el que el hongo que atrapa nematodos es *Duddingtonia flagrans*, el hongo parásito de huevos se selecciona del grupo formado por *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pochonia* y *Verticillium*
26. Método según la reivindicación 25, donde el hongo parásito de huevos es *Mucor circinelloides*.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidade de Santiago de Compostela
- <120> MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN CONJUNTA DE HONGOS CON ACTIVIDAD PARASITICIDA
- <130> P8642ES00
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Fasciola hepatica
- <400> 1

Met Asn Thr Val Lys Ala Thr His Tyr Thr Ser Asp Arg Glu Met Phe  
1                   5                                   10                                   15

Pro Leu Gln Asp Lys Ser Lys Thr Leu  
                  20                                   25



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201330200

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.02.2013

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/14** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A         | LLERANDI-JUÁREZ, R.D., MENDOZA DE GIVES, P., "Resistance of chlamyospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep." J. Helminthol (1998) Vol. 72, nº 02, pp 155-158, todo el documento. | 1-26                       |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
05.08.2013

Examinador  
M. Hernández Cuéllar

Página  
1/4

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

C12N

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.08.2013

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-26 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-26 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

| Documento | Número Publicación o Identificación  | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01       | LLERANDI-JUÁREZ, R.D., MENDOZA DE GIVES, P., "Resistance of chlamydo spores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep." J. Helminthol (1998) Vol. 72, nº 02, pp 155-158, todo el documento. |                   |

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

La invención se relaciona con un medio de cultivo de microorganismos que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una o varias sales minerales y una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. La proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 es la proteína recombinante APS de Fasciola hepatica.

El documento D01 se refiere a un estudio sobre la resistencia de clamidosporas de hongos nematófagos durante los procesos digestivos de las ovejas. En el apartado de procedimientos experimentales de la página 156 se describe el cultivo de material fúngico a partir de excrementos de oveja. El segundo día de incubación se añaden a las placas de cultivo 10 microlitros de agua que contienen un número indeterminado de nematodos vivos y larvas infectivas de H. contortus para estimular el crecimiento de los hongos y comprobar si mantienen su capacidad predadora frente a los nematodos después de pasar por el tracto gastrointestinal.

**1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

La adición de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 a un medio de cultivo no se encuentra descrita en el estado de la técnica pertinente. En consecuencia, las reivindicaciones 1-26 cumplen el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP 11/1986.

En cuanto a la actividad inventiva, D01 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención. No obstante, en este documento no hay evidencias ni sugerencias que induzcan al experto en la materia a incluir la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 en un medio de cultivo y estimular el crecimiento de hongos parasitoides. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-26 cumplen el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.