

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 955**

21 Número de solicitud: 201330654

51 Int. Cl.:

G01N 33/00

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

06.05.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.04.2015

Fecha de la concesión:

02.02.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.02.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS (75.0%)
C/ Tulipán s/n
28933 Móstoles (Madrid) ES y
UNIVERSITAT DE VALENCIA (25.0%)**

72 Inventor/es:

**MORENO TRABA, Helena;
CATALÁ RODRÍGUEZ, Myriam;
DOMÍNGUEZ MORUECO, Noelia y
BARRENO RODRÍGUEZ, Eva**

54 Título: **Bioensayo de toxicidad ambiental basado en ficobiontes aislados de líquenes**

57 Resumen:

Bioensayo de toxicidad ambiental basado en ficobiontes aislados de líquenes.

En la presente invención se contempla un método para evaluar la toxicidad de una muestra basado en a) la obtención de una población de ficobiontes en un medio de cultivo estéril adecuado para cada tipo de ensayo; b) la preparación de una suspensión con la población de ficobiontes obtenida en a) en un medio de cultivo adecuado; c) la exposición de la suspensión obtenida en b) a la muestra esterilizada cuya toxicidad se quiere evaluar; d) la incubación de la suspensión de ficobiontes aislados de líquenes (c) en condiciones de temperatura entre 5 y 25 °C, y un fotoperíodo de 8 a 12 h de luz y 8 a 12 h de oscuridad de intensidad de luz blanca entre 5-200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante un periodo adecuado (entre 0 y 100 horas), según la muestra a); e) medición de la dispersión óptica del cultivo obtenido en la etapa d); f) cuantificación del DNA de la muestra obtenida en d); g) determinación de la autofluorescencia de la clorofila de la muestra obtenida en la etapa d).

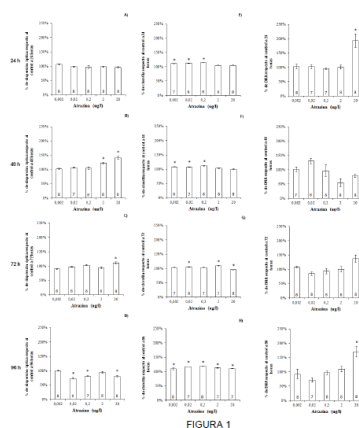


FIGURA 1

ES 2 534 955 B1

DESCRIPCIÓN

BIOENSAYO DE TOXICIDAD AMBIENTAL BASADO EN FICOBIONTES AISLADOS DE LÍQUENES

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a materiales y métodos para evaluar la toxicidad ambiental de aguas, efluentes, suelos, lixiviados e incluso emisiones gaseosas, estando la invención dentro del sector de la biotecnología, bioquímica, fisiología celular, medio ambiente y ecotoxicología. Concretamente se refiere a bioensayos de toxicidad ambiental realizados en ficobiontes aislados de líquenes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La toxicología ambiental estudia el impacto de los contaminantes sobre la estructura y función de los sistemas biológicos. Se trata de una relativamente reciente disciplina que se apoya en los conocimientos que proporcionan diferentes ramas del conocimiento como la Ecología, la Química Orgánica, la Biología Molecular o la Microbiología.

Una herramienta extremadamente útil que emplea la toxicología ambiental son los bioensayos. Un bioensayo puede definirse como un experimento en el que se determina la actividad biológica de una sustancia mediante la observación de su efecto sobre organismos intactos, órganos o diferentes preparaciones biológicas. Este tipo de ensayos proporcionan la posibilidad de evaluar la toxicidad de una muestra sin conocer la completa composición química de la misma. Las muestras contaminadas que encontramos en el medio ambiente pueden presentar una toxicidad debida, no tanto a un único compuesto puro, como a una compleja matriz. Esto va a dar lugar a una serie de interacciones entre estas sustancias, lo que puede provocar diferentes efectos:

- Efecto aditivo: el efecto combinado de dos sustancias es igual al efecto provocado por cada una de ellas por separado.
- Efecto sinérgico: el efecto de la combinación de las dos sustancias es mucho mayor que el causado por cada una de ellas por separado.

- Potenciación: se da cuando una sustancia que no es tóxica incrementa el efecto tóxico de otra sustancia que sí lo es.
- Antagonismo: ocurre cuando dos sustancias se contrarrestan o cuando una de ellas interfiere en la acción de la otra.

Debido a estas posibles interacciones, el análisis de la cantidad y composición de los contaminantes de una muestra no es suficiente para dar una completa información sobre los efectos biológicos que puede provocar. Sin embargo, los bioensayos sí pueden proporcionar esa información (S.A. Mansour, M.F. Gad, *Risk assessment of pesticides and heavy metal contaminants in vegetables: a novel bioassay method using Daphnia magna* Straus. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48: 377-389; K. Wadhia, K.C. Thompson, *Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotest for potential implementation of the Water Framework Directive*. Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26: 300-307).

Existe una amplia variedad de bioensayos de toxicidad que utilizan diferentes especies, que van desde las bacterias hasta las aves. La especie elegida para la realización de un bioensayo debe cumplir una serie de criterios como por ejemplo la posibilidad de estar disponible en cantidad suficiente, ya sea gracias a cultivo en laboratorio, en criadero o por recolección en el campo. También es importante que soporte bien las condiciones de laboratorio y que permita obtener una población homogénea (K. Wadhia, K.C. Thompson, *Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotest for potential implementation of the Water Framework Directive*. Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26: 300-307).

La mayoría de los bioensayos están basados en la evaluación de la mortalidad que provoca la muestra tóxica en el organismo elegido para el bioensayo. Algunos ejemplos de organismos usados en bioensayos son:

- Dáfnias: *Daphnia magna*, *D. pulex*, *D. pulicaria*.

Estos organismos son muy utilizados para bioensayos de toxicidad en muestras de agua. En este caso la toxicidad se evalúa contando al microscopio los individuos que mueren tras entrar en contacto con la muestra contaminada.

- Bacterias: *Vibrio fischeri*.

Se trata de una bacteria marina utilizada tanto para muestras de agua como para lixiviados de suelo. El bioensayo se basa en la bioluminiscencia que emite la bacteria. Esa bioluminiscencia se ve afectada de manera directamente proporcional a la presencia de tóxicos, de forma que se evalúa la toxicidad de la muestra midiendo con técnicas espectrofotométricas la disminución de luminiscencia.

- Lumbrícid: *Eisenia foetida*.

Muy utilizado en estudios de impacto ambiental de pesticidas, herbicidas, metales pesados y PAHs en suelos. La toxicidad se relaciona con el número de individuos que mueren.

- Algas unicelulares: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Selenastrum capricornutum*.

Estos organismos se emplean en bioensayos con muestras de agua. En este caso se evalúa la toxicidad de las muestras observando el crecimiento de las algas.

- Peces: *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris), *Salvelinus fontinalis* (trucha de arroyo), *Carassius auratus* (carpa dorada).

La muerte de los individuos como criterio de valoración de la toxicidad es por tanto de gran interés y muy utilizado en los bioensayos. Sin embargo, en ocasiones es difícil registrar los fallecimientos y deben realizarse recuentos de un elevado número de muestras, lo que hace que sea un trabajo arduo y lento. Además puede ocurrir que los contaminantes estén en cantidades no letales o en formas poco biodisponibles haciendo improbable el fallecimiento inmediato (R. Feito, Y. Valcárcel, M. Catalá, *Biomarker assessment of toxicity with miniaturized bioassays: diclofenac as a case study*, *Ecotoxicology*, 2012, 21: 289-296; J. Rodríguez Pérez, S. Loureiro, S. Menezes, P. Palma, R.R. Frenandes, I.R. Barbosa, A.M.V.M. Soares, *Assessment of water quality in the Alqueva Reservoir (Portugal) using bioassays*, *Environmental Science and Pollution Research*, 2010, 17: 688-702). Otro problema es el volumen de muestra ambiental, que en ocasiones, como en bioensayos con peces, es del orden de litros, lo que dificulta su almacenamiento, mantenimiento y manipulación.

Existe una manera de evaluar precozmente estos efectos tóxicos no letales, los biomarcadores. Los biomarcadores pueden definirse como cualquier parámetro biológico medible y cuantificable que sirve como índice para la evaluación del estado fisiológico o de la salud. Podemos afirmar que los biomarcadores son indicadores a corto plazo de efectos biológicos a largo plazo (M.P. Cajaraville, *Science of the total environment*, 2000, 247:295-311).

Por lo tanto, un uso correcto de los biomarcadores tiene la capacidad potencial de anticipar cambios en niveles de organización más complejos como poblaciones, comunidades y ecosistemas y se pueden utilizar de manera predictiva, permitiendo la aplicación de medidas correctoras antes de que ocurra un daño ambiental irreversible. Entre los biomarcadores empleados se encuentran la dispersión óptica, la autofluorescencia de la clorofila y la cuantificación de DNA.

La medición de la dispersión óptica es un método de estimación indirecta de la replicación y crecimiento rápido y sencillo. Cuando un haz de luz golpea un cuerpo en suspensión, parte de la luz es reflejada, parte es dispersada, parte es absorbida y parte es transmitida. La turbidimetría es la técnica que mide la luz que se dispersa al golpear una partícula como un decrecimiento de la luz transmitida a través del medio. Así, este método consiste en medir la turbidez, debida a la dispersión de la luz, de un medio líquido con células en suspensión. La luz dispersada será mayor en cuanto la suspensión contenga más material celular, con lo que la muestra será más turbia. Esta turbidez se mide en unidades de absorbancia con un espectrofotómetro o fotocolorímetro. Debe tenerse en cuenta que mediante este método no se distinguen células vivas de células muertas. (A.M. Manacorda, D.P. Cuadros, A. Alvarez, *Manual Práctico de Microbiología*, Universidad Nacional del Comahue, 2007:51; M. K. Chung, R. Hu, M.H. Wong, K.C. Cheung. *Comparative toxicity of hydrophobic contaminants to microalgae and higher plants*. *Ecotoxicology*, 2007, 16: 393-402.).

La autofluorescencia de la clorofila es un biomarcador que en las últimas décadas se ha convertido en un parámetro clave a la hora de realizar estudios con organismos de origen vegetal. Cualquier alteración producida en la cantidad o integridad de la molécula de clorofila puede afectar a los procesos fotosintéticos y, por lo tanto, al estado fisiológico de los organismos. Este método se basa el fenómeno de reemisión (en forma de fluorescencia) de la luz absorbida por parte de las moléculas de clorofila. La simplicidad y sensibilidad del principio en el que se basa el método ha permitido el desarrollo de fluorómetros de fácil

manejo (P.B. Fai, A. Grant, B. Reid, *Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment*, Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, 26: 1520-1531).

Aunque la cantidad total de la fluorescencia de la clorofila sea muy pequeña (sólo 1 o 2% de la luz absorbida total), la medición es bastante fácil. El espectro de fluorescencia emitido por la clorofila es diferente al de la luz absorbida, siendo el pico de emisión de fluorescencia de mayor longitud de onda que el de la absorción. Por lo tanto, el rendimiento de fluorescencia puede ser cuantificado mediante la exposición de una muestra que contenga clorofila a la luz de longitud de onda definida y midiendo la cantidad de luz re-emitida en longitudes de onda mayores (K. Maxwell, G.N. Johnson, *Chlorophyll fluorescence - A practical guide*, Journal of Experimental Botany, 2000, 51 (345): 665-668). Ese rendimiento de la fluorescencia de la clorofila dependerá de las condiciones en las que se encuentre el organismo. Por lo que, a medida que las condiciones sean más desfavorables para un organismo que posee clorofila, la emisión de la fluorescencia del mismo será menor (R. Feito, Y. Valcárcel, M. Catalá, *Biomarker assessment of toxicity with miniaturized bioassays: diclofenac as a case study*, Ecotoxicology, 2012, 21: 289-296).

En cuanto a la cuantificación de DNA, hay que mencionar que es un método basado en la cantidad de DNA presente en una muestra. Se trata de un método que proporciona alta fiabilidad y repetitividad. La determinación de la cantidad de una muestra se lleva a cabo por espectrofluorimetría mediante adición a la muestra de fluorocromos intercalantes. (P.K.S. Lam, *Use of biomarkers in environmental monitoring*, Ocean & Coastal Management, 2009, 52: 348-354).

Entre estos fluorocromos se encuentra el Hoechst que es intercalante específico y estequiométrico de DNA. Actúa uniéndose preferentemente a los pares de bases A-T expuestos en el surco menor de la doble cadena de DNA, emitiendo fluorescencia a unas longitudes de onda de $\lambda_{\text{excitación}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 465 \text{ nm}$ (B. Welsblum, E. Haenssler, *Fluorometric properties of the bisbenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA*. Chromosoma, 1974, 46: 255-260) que será recogida por el detector del fluorímetro. Cualquier cambio que afecte a la cantidad de DNA presente en una muestra será detectada por el fluorímetro, indicando así aumentos disminuciones del número de células (K.A. Haque, R.M. Pfeiffer, M.B. Beerman, J.P. Struewing, S.J. Chanock, A.W. Bergen, *Performance of high-throughput DNA quantification methods*, BMC Biotechnology, 2003, 28 (3):20).

Ahora, los autores de la presente invención han desarrollado un bioensayo que evalúa la toxicidad de una muestra mediante métodos indirectos, determinando la dispersión óptica de una suspensión, la autofluorescencia de la clorofila y/o la cantidad de DNA presentes en una muestra, empleando como organismos modelo ficobiontes aislados de líquenes.

5

A la hora de llevar a cabo microbioensayos de toxicidad, un componente clave en los mismos son las especies implicadas, ya que éstas se deben seleccionar de forma adecuada de modo que se pueda evaluar la toxicidad global en el ecosistema y se puedan obtener resultados de relevancia ecológica (K. Wadhia, K.C. Thompson, *Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotest for potential implementation of the Water Framework Directive*, Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26: 300-307.; M. Catalá, M. Esteban, J. L. Rodríguez-Gil, L. G. Quintanilla, *Development of a naturally miniaturised testing method based on the mitochondrial activity of fern spores: A new higher plant bioassay*, Chemosphere, 2009, 77: 983-988).

15

Entre los requisitos que deben cumplir estas especies se encuentran, su sensibilidad a los factores ambientales o materiales en cuestión, poseer una distribución amplia y una disponibilidad en cantidades suficientes y durante todo el año, ser un taxón con importancia desde el punto de vista ecológico y/o económico, se debe poder mantener fácilmente en el laboratorio, debe hallarse en buenas condiciones (libre de parásitos o enfermedades) y sobre todo, debe ser compatible con las técnicas de bioensayo (M. A. Capó Martí, *Principios de Ecotoxicología: Diagnóstico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente*, McGraw-Hill, 2002; K. Wadhia, K.C. Thompson, *Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotest for potential implementation of the Water Framework Directive*, Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26: 300-307).

25

Las especies que cumplen estas características son seleccionadas, entre otras cosas, para evaluar la toxicidad ambiental de los vertidos a las aguas superficiales. Entre ellas se encuentran invertebrados acuáticos (por ejemplo, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*), peces (como es el caso de *Pimephales promelas*), bacterias (como *Pseudomonas putida*), microalgas (por ejemplo, *Pseudokirchneriella subcapitata*), y las plantas vasculares (por ejemplo, *Lemna minor*) (S. M. Paixão, L. Silva, A. Fernandes, K. O'Rourke, E. Mendoça, A. Picado, *Performance of a miniaturized algal bioassay in phytotoxicity screening*, Ecotoxicology, 2008, 17:165-171.). En particular, las microalgas se han utilizado ampliamente para los ensayos de toxicidad debido a su alta sensibilidad y reproducibilidad. Los bioensayos de toxicidad llevados a cabo con microalgas utilizan algas de vida libre, sin

30

35

embargo, una buena opción es la utilización de algas asociadas a líquenes, biomarcadores ambientales por excelencia (I. Shitanda, S. Takamatsu, K. Watanabe, M. Itagaki, *Amperometric screen-printed algal biosensor with flow injection analysis system for detection of environmental toxic compounds*, Electrochimica Acta, 2009, 54: 4933-4936).

5

Los talos de líquenes poseen una parte compuesta por hongos heterótrofos (micobionte) y otra parte por algas o cianobacterias fotosintéticas (fotobionte o en el caso específico de algas, también denominado ficobionte). Estudios realizados con líquenes muestran que, generalmente, la parte más sensible a los contaminantes es el ficobionte (M. Bačkor, P. Váczi, *Copper tolerance in the lichen photobiont Trebouxia erici (Chlorophyta)*, Environmental and Experimental Botany, 2002, 48: 11-20).

10

Se ha observado que los ficobiontes presentan características tales como tolerancia a la desecación o anhidrobiosis (característica que no presentan las algas de vida libre), tolerancia a un amplio rango de temperaturas de trabajo, capacidad de crecimiento en medio líquido y sólido (F. Gasulla Vidal, *Insights on desiccation tolerance of the lichen photobiont TR9 pl. in both thalline and isolated ones*, Tesis doctoral, 2009; A. Del Hoyo, R. Álvarez, E.M. Del Campo, F. Gasulla, E. Barreno, L.M. Casano, *Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two Trebouxia phycobionts of the lichen Ramalina farinacea*, Annals of Botany, 2010, 1-10; L.M. Casano, E. Del Campo, F. García-Breijo, J. Reig-Armiñana, F. Gasulla, A. Del Hoyo, A. Guéra, E. Barreno, *Two Trebouxia algae with different physiological performances are ever present in lichen thalli of Ramalina farinacea. Coexistence vs. Competence?* Environmental Microbiology, 2010, 13: 806–818). Estas cualidades son muy útiles en el desarrollo de bioensayos miniaturizados, más adaptables, versátiles y de bajo coste permitiendo un fácil almacenamiento, manejo y utilización.

15

20

25

Así, la presente invención ha permitido desarrollar un nuevo bioensayo para la evaluación de la toxicidad de una muestra, rápido, sencillo, económico y fiable, que presenta importantes ventajas respecto a los actualmente empleados en el estado de la técnica.

30

OBJETO DE LA INVENCION

En primer lugar, es objeto de la invención un método para evaluar la toxicidad de una muestra basado en la determinación de la dispersión óptica, de la autofluorescencia de la

35

clorofila y/o de la cantidad de DNA presente en una muestra de ficobiontes aislados de líquenes.

5 Es también objeto de la invención el empleo de la dispersión óptica, de la autofluorescencia de la clorofila y de la cuantificación del DNA en ficobiontes aislados de líquenes como biomarcadores en métodos para evaluar la toxicidad en una muestra.

10 Finalmente, es también objeto de la invención un kit para evaluar la toxicidad de una muestra mediante el método citado anteriormente, así como los fundamentos de un biosensor ambiental.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15

La presente invención revela una familia de bioensayos capaces de determinar la toxicidad ambiental de muestras de agua, suelos y aire, y los métodos para llevarlos a cabo con ficobiontes de líquenes a partir de la medición de la dispersión óptica, la autofluorescencia de la clorofila y la cuantificación de DNA.

20

La biología de los ficobiontes puede verse alterada por la presencia de sustancias tóxicas, o mezclas de ellas presentes en el medio, dando lugar a una variación en una serie de parámetros como son la dispersión óptica, la autofluorescencia de la clorofila y/o el DNA. De esta manera, al poner en contacto los ficobiontes aislados de líquenes con muestras de campo se producirá, o no, una variación en la dispersión óptica, autofluorescencia de clorofila o cantidad de DNA en función de la toxicidad de las muestras.

25

Así, en un aspecto principal de la invención, se contempla un método para evaluar la toxicidad de una muestra basado en a) la obtención de una población ficobiontes en un medio de cultivo estéril adecuado para cada tipo de ensayo; b) la preparación de una suspensión con la población de ficobiontes obtenida en a) en un medio de cultivo adecuado; c) la exposición de la suspensión obtenida en b) a la muestra esterilizada cuya toxicidad se quiere evaluar; d) la incubación de la suspensión de ficobiontes aislados de líquenes (c) en condiciones de temperatura entre 5 y 25 °C, y un fotoperiodo de 8 a 12 h de con intensidad de luz blanca entre 5-200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante un periodo adecuado (entre 0 y 100 horas),

30

35

según la muestra; e) medición de la dispersión óptica del cultivo obtenido en la etapa d) a una longitud de onda de 650 nm; f) cuantificación del DNA de la muestra obtenida en d); g) determinación de la autofluorescencia de la clorofila de la muestra obtenida en la etapa d).

5 Las características de este ensayo permiten el análisis de muestras de muy distinta naturaleza:

- 10 - muestras acuosas: incluyendo, pero no limitándose a, aguas subterráneas, aguas superficiales, aguas para consumo, lixiviados de suelos, lixiviados de residuos, residuos líquidos, etc.
- muestras sólidas o semi-sólidas: incluyendo, pero no limitándose a, suelos, lodos, compost, agregados granulares, etc.
- 15 - muestras gaseosas: incluyendo, pero no limitándose a, efluentes gaseosos, bien directamente o mediante su absorción acuosa.

En una realización particular de la invención la población axénica de ficobiontes en a) se obtiene de una colección establecida, como por ejemplo la colección UTEX de la
20 Universidad de Texas, o bien mediante su aislamiento y purificación a partir de un talo líquénico (por ejemplo con el método de F. Gasulla, A. Guéra, E. Barreno, *A simple and rapid method for isolating lichen photobionts*, Symbiosis 2010 51:175-179).

Una vez preparadas las alícuotas, se procede a la exposición (etapa c) e incubación de
25 éstas con la muestra de agua, suelo o aire cuya toxicidad se desea evaluar (etapa d). El rango de temperaturas de incubación de la etapa d) oscila entre 5 y 25 °C dependiendo de la especie de ficobionte que se utilice, y cual sea su rango de temperatura óptimo. Así mismo, en función de la especie a utilizar, variará el fotoperiodo de horas de luz y oscuridad entre 8 y 12 h. Tras la incubación extraerá una alícuota de cada muestra para medir la dispersión
30 óptica (etapa e). En una realización particular de la invención, la media de la dispersión óptica se mide en un lector de placas a 650 nm. De la misma manera se extraerá una alícuota para medir la autofluorescencia de la clorofila (etapa d). En una realización particular de la invención, para medir la autofluorescencia de la clorofila se utiliza un fluorímetro con un filtro de excitación de 485 nm, y un filtro de emisión de 635 nm. El resto
35 de la muestra se destina a la cuantificación de DNA (etapa f). En una realización particular

de la invención, se procesa la muestra por el método de Feito et al., con una serie de modificaciones adaptadas para estos microorganismos (R. Feito, Y. Valcárcel, M. Catalá, *Biomarker assessment of toxicity with miniaturized bioassays: diclofenac as a case study*, *Ecotoxicology*, 2012, 21: 289-296). Según este método, las células se someten a etanol al 70 % y se incuban durante 24 horas a temperatura ambiente. Tras el tiempo de incubación, las muestras se sedimentan, por ejemplo centrifugando a 13.000 g. Se resuspenden en un medio TNE- lisis (1:1), compuesto por solución de lisis (Triton X-100 al 0,2% y NaOH 1N al 1 %) y TNE (100 mM TRIS, 10 mM EDTA y 1 M NaCl). Posteriormente, una alícuota de cada muestra será diluida en TNE y otra alícuota del mismo volumen será diluida en TNE - bisbenzimidazol Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) 0,2 µg/ml. De esta forma, se crea un blanco que elimina la autofluorescencia que puedan emitir las células, para obtener sólo la fluorescencia del DNA unido al Hoechst. Ambas deben ser agitadas durante 1 min e incubadas en oscuridad durante 5 minutos. En una realización particular de la invención, la fluorescencia del Hoechst se mide en un lector de placas fluorímetro con un filtro de excitación de 360 nm, y un filtro de emisión de 465 nm. El dato de fluorescencia se debe interpolar en una recta patrón de DNA purificado en el rango de concentraciones adecuado, de 0 – 10 µg/ml, por ejemplo.

En una realización particular, se utilizan gradillas de 96 tubos de 1,2 ml de capacidad con tapa esterilizados añadiéndose en cada tubo 500 µl de una suspensión con 10^6 cells ml⁻¹.

En una realización preferida, se escogen ficobiontes aislados del líquen *Ramalina farinacea*, que en adelante denominaremos *Trebouxia sp.* cuya suspensión requiere las siguientes condiciones de incubación (etapa a): fotoperiodo de luz de 12 h, a una temperatura de 15 °C, durante 15 días. En estas condiciones, la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de 15 °C con un fotoperiodo de luz de 12 h durante un periodo de tiempo comprendido entre 24 y 96 horas en condiciones axénicas.

En otra realización preferida, se escogen ficobiontes *Asterochloris erici* (Ahmadjian) Skaloud et Peksa (anteriormente conocidos como *Trebouxia erici*) cuya suspensión requiere las siguientes condiciones de incubación (etapa a): un fotoperiodo de luz de 12 h, a una temperatura de 20 °C, durante 15 días. En estas condiciones, la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de 20 °C con un fotoperiodo de luz de 12 h durante un periodo de tiempo comprendido entre 24 y 96 horas en condiciones axénicas, y en gradillas de 96 tubos de 1,2 ml.

El empleo de ficobiontes aislados de líquen proporciona al bioensayo objeto de la presente invención una serie de características que le confieren ventajas respecto a otros bioensayos existentes en el estado de la técnica:

- 5 1) Los ficobiontes aislados de líquenes son fáciles de reproducir en laboratorio. Puede obtenerse suficiente cantidad de forma económica para procesar las muestras que se necesiten, ya que se reproducen a bajas temperaturas y bajas intensidades de luz.
- 10 2) Toleran el almacenaje a 4 °C directamente en condiciones de cultivo, y la congelación en el medio adecuado. También están adaptados a la anhidrobiosis, recuperando su actividad fisiológica rápidamente tras la rehidratación, lo que facilita enormemente su transporte, almacenaje y conservación.
- 15 3) Los ficobiontes aislados de líquenes crecen fácilmente en medio semisólido. Por lo que no necesitan del mantenimiento constante de cultivos líquidos.
- 20 4) Este bioensayo proporciona mayor relevancia biológica que otros bioensayos existentes especialmente para el medio terrestre. Debido a que los líquenes son conocidos como bioindicadores por excelencia, el empleo de ficobiontes aislados de líquenes van a mantener esta particularidad. Los ficobiontes se reproducen por meiosis y mitosis, de manera que las células empleadas en el bioensayo van a ser, en parte, individuos genéticamente diferentes y además se ha observado la formación de subpoblaciones. Otros bioensayos utilizan clones de individuos (algas, 25 bacterias, líneas celulares o cultivos primarios), que aunque presentan una menor dispersión en los resultados confieren al bioensayo menor relevancia biológica.
- 30 5) El bioensayo descrito aporta mayor relevancia ecológica que otros bioensayos utilizados actualmente. Existe una amplia variedad de especies de líquenes y algunos de ellos son características de hábitats o ecosistemas muy concretos. Esto hace que determinadas especies de ficobiontes puedan ser útiles herramientas en la vigilancia y seguimiento ambiental de habitats concretos.
- 35 6) El bioensayo descrito permite procesar un elevado número de muestras con un coste mínimo. Tanto el material biológico como los reactivos utilizados en este bioensayo

son baratos. El equipamiento de laboratorio necesario para la realización del bioensayo puede encontrarse en cualquier laboratorio de microbiología básica.

7) Las características del bioensayo hacen posible su adaptación a sistemas automáticos de técnicas ópticas como placas multipocillo y sistemas continuos.

8) El bioensayo objeto de la presente invención emplea pequeños volúmenes de muestra. El bioensayo puede llevarse a cabo con volúmenes de muestra del orden de microlitros. Esta característica hace que el bioensayo sea especialmente útil en casos en los que la cantidad de muestra es limitada. Además reduce la necesidad de almacenar elevadas cantidades de muestra, que en muchos casos necesitan refrigeración, lo que provoca problemas de espacio.

Finalmente, otro aspecto principal de la invención contempla la posibilidad del desarrollo de un kit para evaluar la toxicidad de una muestra, que comprende una población de ficobiontes aislados de líquenes en suspensión, sustrato sólido o semisólido, y el medio adecuado para su utilización. Asimismo, se deberá incluir un protocolo de utilización para determinar el efecto tóxico sobre la dispersión óptica y la autofluorescencia de la clorofila de muestras de agua, suelos o aire. Por otro lado, además podrá incluirse una sonda fluorescente para la cuantificación del DNA de los ficobiontes y el medio adecuado para su utilización para determinar el efecto tóxico de muestras de agua, suelos o aire.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de figuras en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Dispersión óptica, autofluorescencia de la clorofila y cantidad de DNA respecto al control tras 24, 48, 72 y 96 horas con 5 concentraciones del herbicida Atrazina en *Trebouxia* sp. Las columnas representan las medias y las barras muestran el error típico de la media. En la base de cada columna aparece el valor de n en cada punto. (*) indica diferencia estadísticamente significativa frente al control (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 2. Dispersión óptica, autofluorescencia de la clorofila y cantidad de DNA respecto al control tras 24, 48, 72 y 96 horas con 6 concentraciones del antiinflamatorio Diclofenaco en *Trebouxia sp.* Las columnas muestran la media y las barras muestran el error típico de la media. En la base de cada columna aparece el valor de n en cada punto. (*) indica diferencia estadísticamente significativa frente al control (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 3. Dispersión óptica, autofluorescencia de la clorofila y cantidad de DNA respecto al control tras 24, 48, 72 y 96 horas con 5 las concentraciones del herbicida Atrazina en *Asterochloris erici*. Las columnas muestran la media y las barras muestran el error típico de la media. En la base de cada columna aparece el valor de n en cada punto. (*) indica diferencia estadísticamente significativa frente al control (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 4. Dispersión óptica, autofluorescencia de la clorofila y cantidad de DNA respecto al control tras 24, 48, 72 y 96 horas con 6 concentraciones del antiinflamatorio Diclofenaco en *Asterochloris erici*. Las barras muestran el error típico de la media. En la base de cada columna aparece el valor de n en cada punto. (*) indica diferencia estadísticamente significativa frente al control (ANOVA, $p < 0,05$).

Expuestas hasta aquí las características distintivas de la presente invención, se describe una de las maneras posibles de llevarla a cabo.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo el cual no pretende ser limitativo del alcance de la invención.

Se llevó a cabo un bioensayo con ficobiontes aislados de *Ramalina farinacea*, que de aquí en adelante denominaremos *Trebouxia sp.*, y *Asterochloris erici*, frente a la presencia de fitosanitarios y fármacos encontrados en aguas de río y de consumo, como son el herbicida Atrazina y el antiinflamatorio Diclofenaco (Ma, J., Zheng, R., Xu, L., Wang, S., 2002. *Differential Sensitivity of Two Green Algae, Scenedesmus obliquus and Chlorella pyrenoidosa, to 12 Pesticides*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, 57-61; Altenburger, R., Bodeker, W., Faust, M., Horst Grimme, L., 1990; *Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals: Combination effect studies*

with pesticides in algal biotests. Ecotoxicology and Environmental Safety 20, 98-114; Gonzalez Alonso, S.; Catala, M.; Romo Maroto, R.; Rodriguez Gil, J. L.; Gil de Miguel, A.; Valcarcel, Y., 2010. *Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain)*. Environment International 36: 195-201.; Feito, R; Valcárcel, Y.; Catalá, M.; *Biomarker assessment of toxicity with miniaturized bioassays: diclofenac as a case study*. Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Topp, E., Korber, D.R., Neu, T.R., Wassenaar, L.I., 2007. *Structural and functional responses of river biofilm communities to the nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac*. Environmental Toxicology and Chemistry 26, 573-582). Los microbioensayos tratan de determinar la toxicidad que tienen estos compuestos en los organismos citados anteriormente, tras someterlos a diferentes concentraciones de cada compuesto y frente a distintos tiempos de exposición en una realización preferida (24, 48, 72 y 96 horas). Los biomarcadores estudiados para la determinación de la toxicidad fueron: medición de la dispersión óptica (turbidez), autofluorescencia de la clorofila y cuantificación de DNA mediante sondas fluorescentes.

En una primera etapa se preparó un precultivo de una suspensión de ficobiontes de *Trebouxia sp.* y de *Asterochloris erici*, con el objetivo de facilitar la aclimatación y la obtención de suspensiones conocidas en etapas posteriores.

Para todos los microbioensayos se utilizaron cultivos en medio líquido, preparados 15 días antes, de cada una de las especies seleccionadas. Esto es así debido a que la tasa máxima de crecimiento de estos ficobiontes se encuentra entre los 7 y 17 días de cultivo (Gasulla, 2009). Se tomaron tubos de 1,2 ml y se inocularon 500 µl de ficobiontes en suspensión con una concentración de 10^6 cel/ml para cada tubo. A cada uno de ellos se les añadieron 500 µl de medio 3NBBM y contaminante para poder identificar así su efecto. Cada uno de estos tubos de 1,2 ml fue almacenado en gradillas con capacidad para 96 tubos, para determinar que influencia tenía en los ficobiontes tanto la concentración del compuesto, como el tiempo de exposición al que fuera sometido. Se realizaron 8 replicas por concentración del compuesto incluyendo, además, controles. En el caso de la Atrazina, el control se compuso de cultivo 3NBBM estéril, acetona y ficobiontes en suspensión, puesto que la Atrazina es un compuesto apolar y se utilizó la acetona para su disolución. Para el fármaco Diclofenaco, el control se compuso de medio de cultivo 3NBBM estéril y ficobiontes en suspensión. Todos los cultivos fueron mantenidos en cámara de cultivo a 15 °C para el caso de *Trebouxia sp.*, y a 21 °C para el caso de *Asterochloris erici*, bajo un fotoperiodo 12 h de luz blanca con una intensidad de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para ambas cepas. Finalizado el tiempo de exposición se tomaron 200 µl para medición de dispersión óptica, 200 µl para determinación de la

autofluorescencia de la clorofila y 600 μ l para cuantificación de DNA mediante sondas fluorescentes.

En el caso de medición de la dispersión óptica se tomaron 200 μ l de muestra y se depositaron 100 μ l por pocillo de placa de 96 pocillos, de forma que se obtuvieran dos placas para realizar mediciones de absorbancia duplicadas. Estas se obtuvieron mediante el lector de placas multipocillo (espectrofotómetro) modelo 17-550 Anthos 2010 a una longitud de onda $\lambda=650$ nm (Chung et al., 2007). Los resultados demuestran que tanto el herbicida atrazina como el antiinflamatorio diclofenaco a muy bajas concentraciones inducen alteraciones significativas en las propiedades ópticas de las suspensiones de ambos ficobiontes, especialmente *Asterochloris erici*, más sensible. La variación de las propiedades ópticas de las suspensiones está ligada tanto al número de células como al cambio del patrón de agregación ligando los efectos a nivel individual con el nivel poblacional. Este parámetro informa de alteraciones en la estructura de la población y es un claro biomarcador de exposición sin menoscabo de otras aplicaciones.

En el caso de la medición de la autofluorescencia de la clorofila, también se tomaron 200 μ l de muestra y se depositaron 100 μ l por pocillo de placa Greiner de 96 pocillos, de forma que se obtuvieran dos placas para realizar mediciones de fluorescencia duplicadas. Estas fueron obtenidas mediante el lector de placas SPECTRAFluor Plus (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland) con filtros de $\lambda_{\text{excitación}}=485$ nm y de $\lambda_{\text{emisión}}=635$ nm. Los resultados presentados en las figuras demuestran que ambas sustancias inducen alteraciones significativas en la autofluorescencia de la clorofila. Es especialmente llamativa la disminución significativa que induce en *Asterochloris erici* la atrazina, un herbicida que inhibe la fotosíntesis. En este sentido, *Trebouxia sp.* Parece más tolerante, lo que concuerda con la clasificación como toxitolerante de su líquen de origen *Ramalina farinacea*.

Para la cuantificación de DNA se utilizó la sonda fluorométrica Hoechst, que es un intercalante específico y estequiométrico de DNA. Actúa uniéndose preferentemente a los pares de bases A-T expuestos en el surco menor de la doble cadena de DNA, emitiendo fluorescencia a unas longitudes de onda de $\lambda_{\text{excitación}}=360$ nm, $\lambda_{\text{emisión}}=465$ nm. Previamente, fue necesario hacer un tratamiento químico de las muestras con el objetivo de romper o generar poros en las membranas de las células y facilitar la entrada de la sonda Hoechst. Para ello, las muestras se sedimentaron, a 1300 g durante 10 minutos en la centrífuga Digicen 20, dispuesta con un rotor flotante capaz de centrifugar las gradillas. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y la muestra fue sometida a una exposición de

etanol al 70 %. Se agito durante unos segundos en el vortex y se incubo a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este periodo de tiempo, las muestras se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones anteriormente mencionadas y se retiro el sobrenadante. A continuación, se les añadió la solución TNE- lisis 1:1, compuesto por
 5 solución de lisis (Triton X-100 al 0,2 % y NaOH 1N al 1 %) y TNE (100 mM TRIS, 10 mM EDTA y 1 M NaCl) (Cesarone et al., 1979). Por último, las muestras fueron sonicadas durante 5 minutos y puestas al baño durante 1 hora a 37 °C, quedando ya listas para la aplicación de la sonda y la medición correspondiente.

10 Una alícuota de 100 µl de cada muestra fue diluida en TNE para generar los blancos (medición de la autofluorescencia propia de los ficobiontes) y otra alícuota del mismo volumen fue diluida en Hoechst 0,1 µg/ml - TNE (medición de la autofluorescencia
 15 procedente de los ficobiontes y del DNA) en placas Greiner multipocillo negras. Por otro lado, se llevo a cabo la realización de una recta patrón de DNA que servirá posteriormente para interpolar los resultados de DNA de las muestras y conocer así su concentración de DNA. Cada placa fue agitada durante un minuto y posteriormente incubadas en oscuridad
 20 durante 5 minutos y a una temperatura de 37 °C. Transcurrido este periodo de tiempo, se volvieron a agitar durante 1 minuto para asegurar la homogeneidad de la muestra y se llevó a cabo la medición mediante el lector de placas SPECTRAFluor Plus (Tecan Group Ltd.,
 25 Mannedorf, Switzerland) a unas longitudes de onda de $\lambda_{\text{excitación}} = 360 \text{ nm}$ y de $\lambda_{\text{emisión}} = 465 \text{ nm}$ (Cesarone et al., 1979). Los resultados de las figuras demuestran alteraciones significativas en el número de células inducidas por diversas concentraciones de los contaminantes a diversos tiempos si bien la interpretación de este parámetro es compleja ya que a los tiempos ensayados, bastante largos, podría haber la selección de subpoblaciones
 tolerantes con tasas de proliferación mayor y sustitución de la población original. El periodo de exposición deberá ser estudiado para cada caso.

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar la toxicidad de una muestra a partir de ficobiontes de líquenes que comprende:

5

- a. obtención de una población de ficobiontes;
- b. preparación de una suspensión con la población de ficobiontes obtenida en a) en un medio de cultivo adecuado,
- c. exposición de la suspensión obtenida en b) a la muestra esterilizada cuya toxicidad se quiere evaluar;
- d. incubación de la suspensión de ficobiontes de líquenes obtenida en c) en condiciones de temperatura entre 5 °C y 25 °C, fotoperiodo de 8 o 12 h de luz y 8 o 12 h de oscuridad de intensidad de luz blanca entre 5-200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante un periodo adecuado (entre 0 y 100 horas), según la muestra a analizar;
- e. medición de la dispersión óptica de la muestra obtenida en d); y/o
- f. cuantificación del DNA de la muestra obtenida en d); y/o
- g. determinación de la autofluorescencia de la clorofila de la muestra obtenida en d).
- h. Análisis de los datos obtenidos en e) a g) para evaluar la toxicidad de la muestra.

10

15

20

2. Método, según la reivindicación anterior, caracterizado porque la suspensión obtenida en la etapa d) se puede congelar a una temperatura máxima de -18°C.

25

3. Método, según las reivindicaciones anteriores, por el que se determina la cantidad de DNA de ficobiontes de líquenes, donde se utiliza una sonda específica de DNA y longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas.

30

4. Método, según las reivindicaciones anteriores, por el que se mide la autofluorescencia de la clorofila de ficobiontes de líquenes donde se utiliza un filtro de excitación con una longitud de onda entre 450 nm y 500 nm y con un filtro de emisión con una longitud de onda entre 600 nm y 650 nm.

5. Método, según las reivindicaciones anteriores, por el que se mide la dispersión óptica de la suspensión de ficobiontes utilizando un equipo capaz de medir la absorbancia entre 550 y 700 nm.
- 5 6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el microensayo está basado en ficobiontes aislados del líquen *Ramalina farinacea*.
7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el microensayo está basado en el ficobionte líquénico *Asterochloris erici*.
- 10 8. Empleo de la dispersión óptica en ficobiontes de líquenes como biomarcador en métodos para evaluar la toxicidad de una muestra.
9. Empleo de la cantidad de DNA en ficobiontes de líquenes como biomarcador en métodos para evaluar la toxicidad de una muestra.
- 15 10. Empleo de la autofluorescencia de la clorofila en ficobiontes de líquenes como biomarcador en métodos para evaluar la toxicidad de una muestra.
- 20 11. Kit para evaluar la toxicidad de una muestra utilizando las alteraciones en la actividad óptica y la autofluorescencia de la clorofila como biomarcadores, según el método descrito en las reivindicaciones anteriores, que comprende, como mínimo, un vial con una suspensión de ficobiontes en medio de cultivo, una botella con medio de cultivo estéril y un protocolo con instrucciones para realizar el bioensayo.
- 25 12. Kit para evaluar la toxicidad de una muestra utilizando la cantidad de DNA como biomarcador, según el método descrito en las reivindicaciones anteriores, que comprende, además del material descrito en la reivindicación 11, un vial con reactivo concentrado, tampón de dilución y un protocolo con instrucciones para realizar el bioensayo y la cuantificación de DNA.
- 30

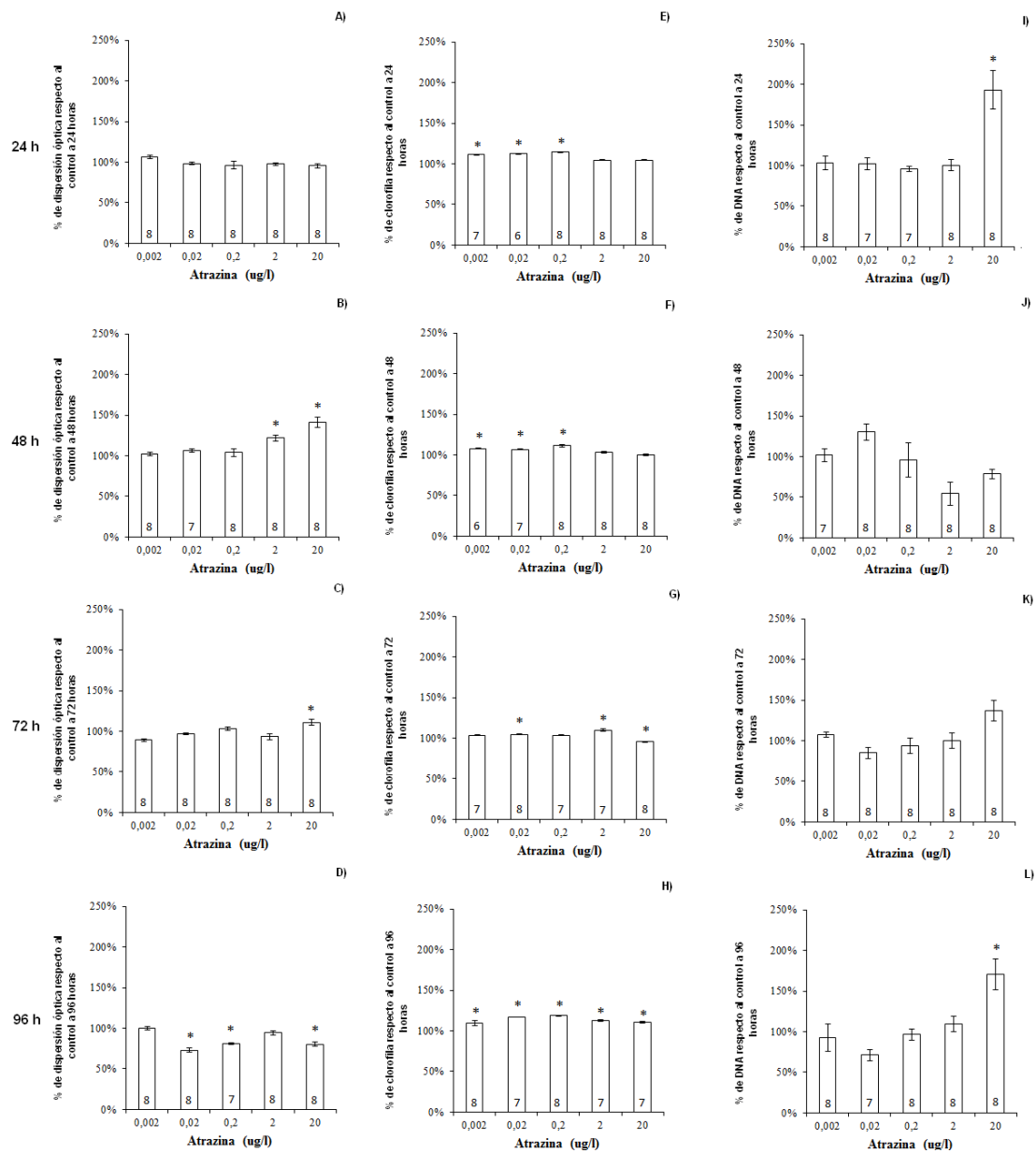


FIGURA 1

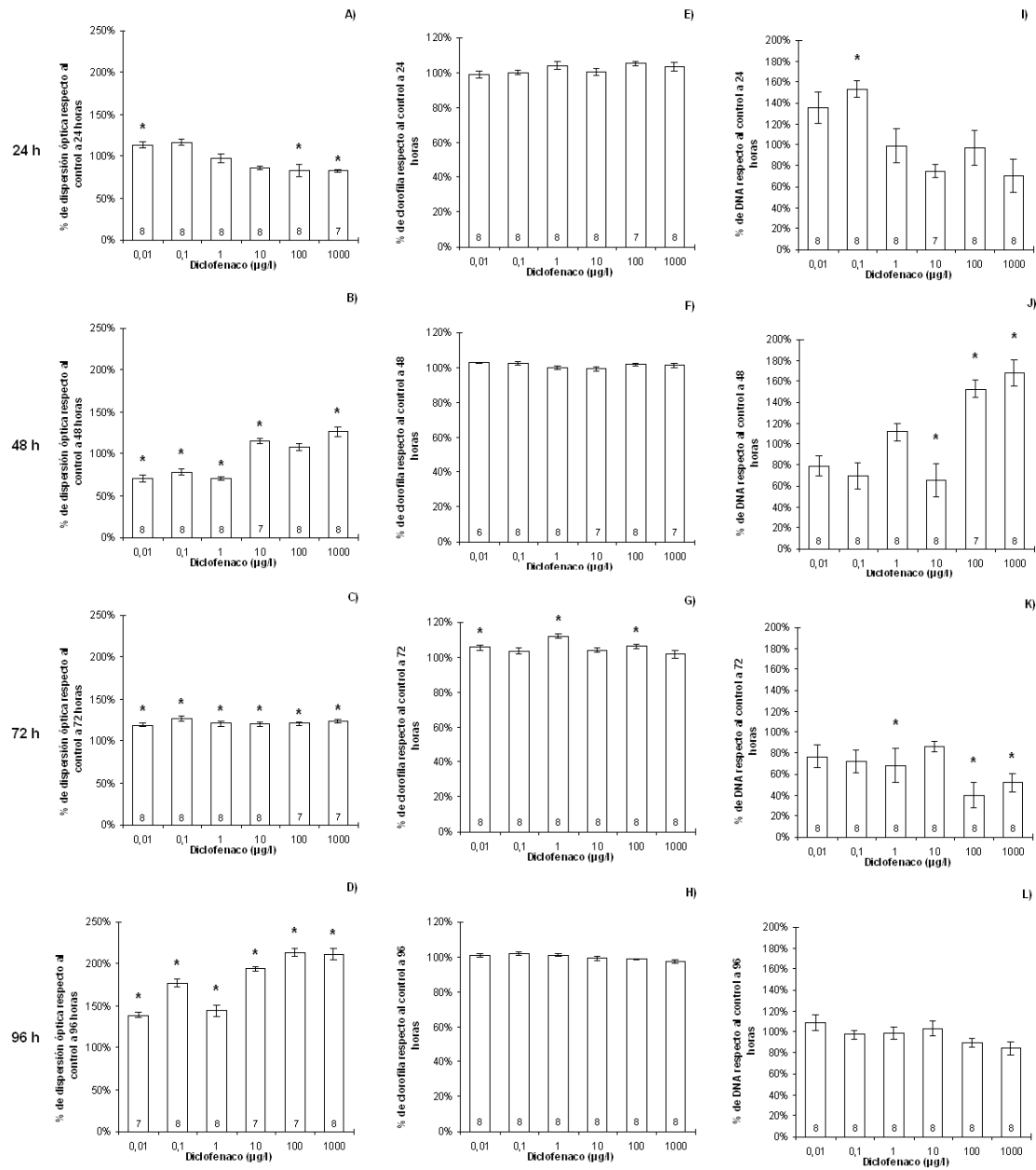


FIGURA 2

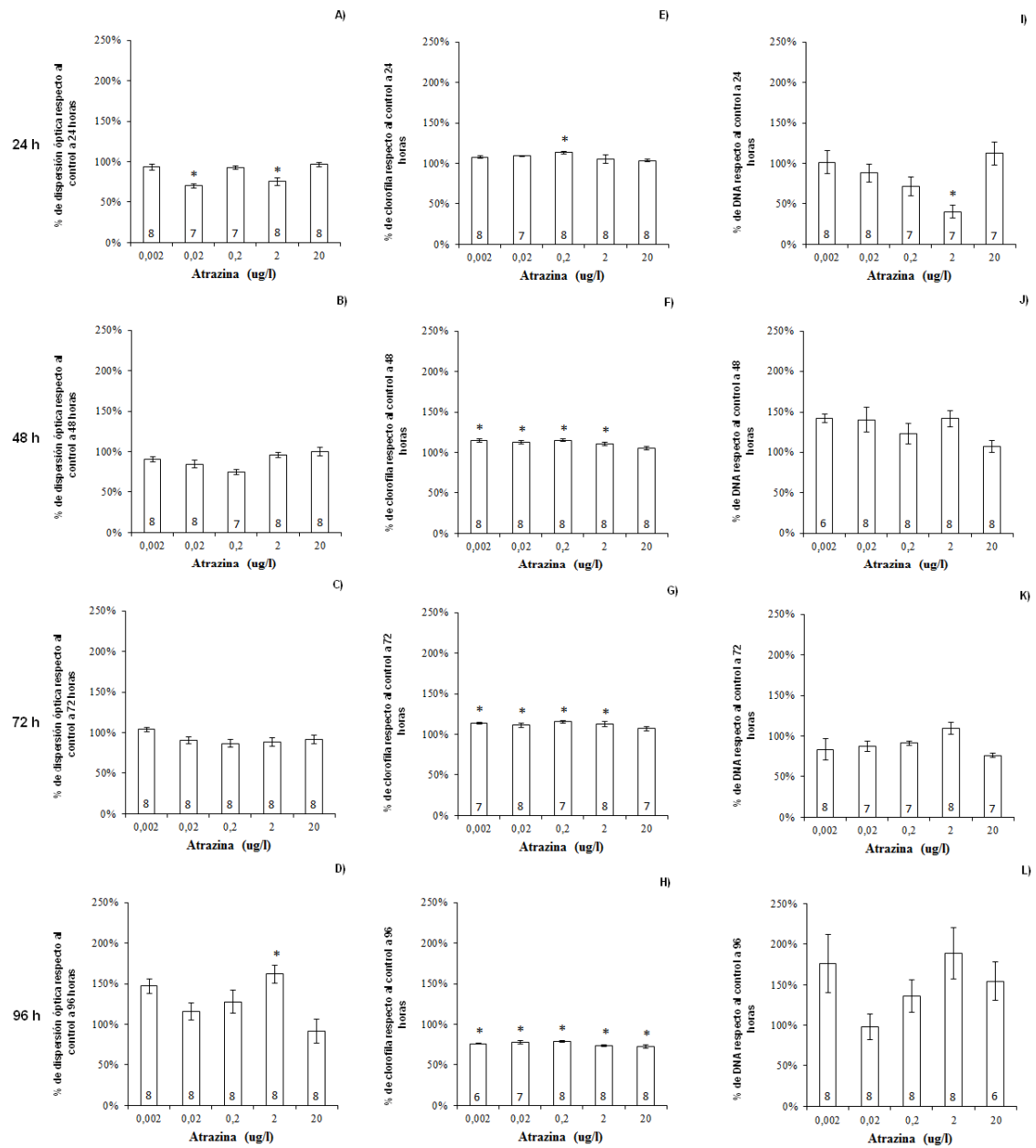


FIGURA 3

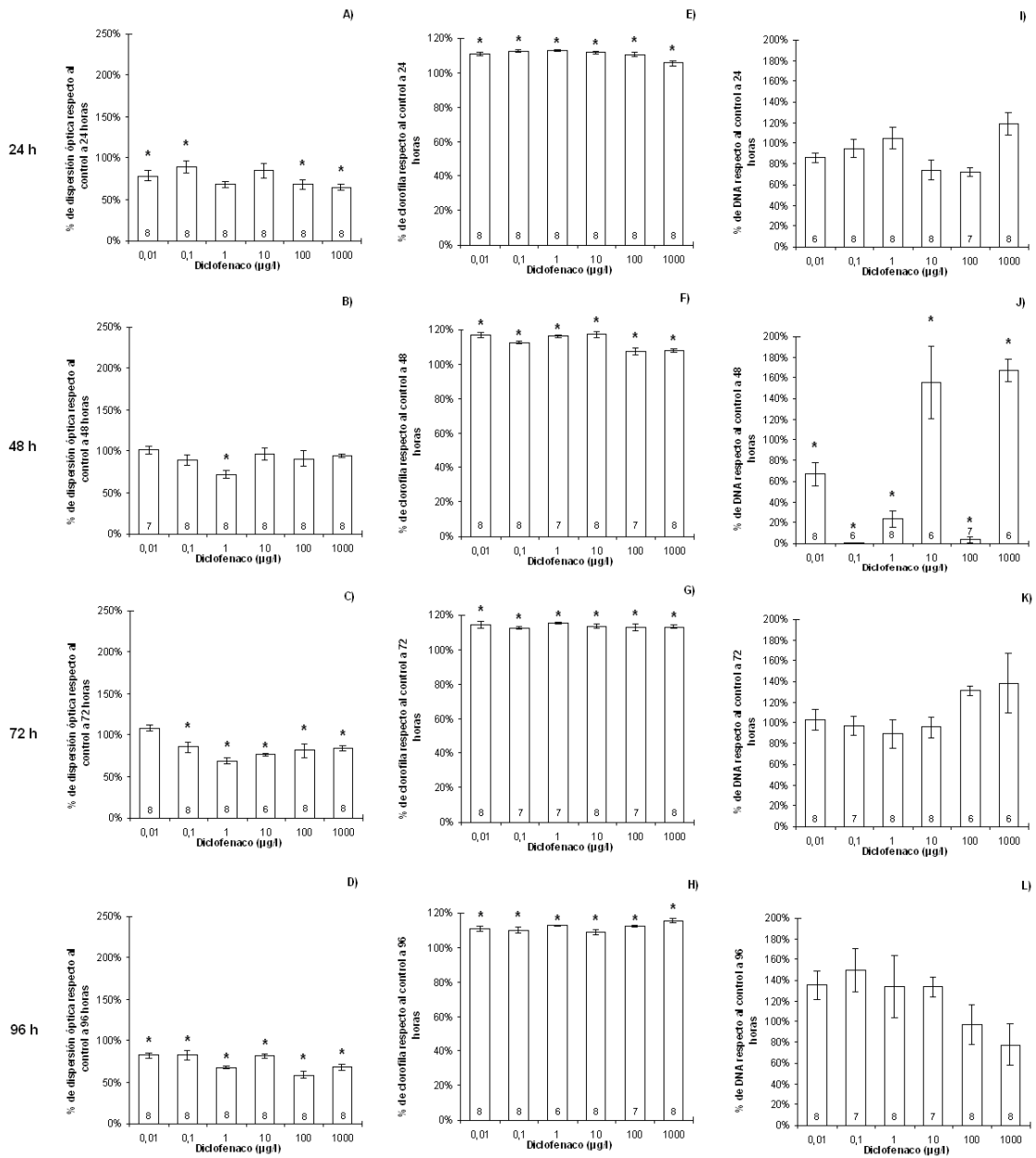


FIGURA 4



- ②① N.º solicitud: 201330654
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.05.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GASULLA et al. A simple and rapid method for isolating lichen photobionts. <i>Symbiosis</i> . Septiembre 2010, páginas 175-179. Resumen.	1-12
A	MARTIN et al. Response to copper and cadmium stress in wild-type and copper tolerant strains of the lichen alga <i>Trebouxia erici</i> : metal accumulation, toxicity and non-protein thiols. <i>Plant Growth Regulation</i> . 2007, páginas 17-27. Resumen.	1-12
A	BACKOR et al. Copper tolerance in the lichen photobiont <i>Trebouxia erici</i> (Chlorophyta). <i>Environmental and Experimental Botany</i> . 2002, páginas 11-20. Resumen.	1-12
A	BACKOR et al. Short-term and chronic effects of copper, zinc and mercury on the chlorophyll content of four lichen photobionts and related alga. <i>Journal of the Hattori Botanical Laboratory</i> . 2004, páginas 271-284. Resumen.	1-12

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
22.04.2015

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.04.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

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	GASULLA et al. A simple and rapid method for isolating lichen photobionts. <i>Symbiosis</i> , páginas 175-179. Resumen.	2010
D02	MARTIN et al. Response to copper and cadmium stress in wild-type and copper tolerant strains of the lichen alga <i>Trebouxia erici</i> : metal accumulation, toxicity and non-protein thiols. <i>Plant Growth Regulation</i> , páginas 17-27. Resumen.	2007
D03	BACKOR et al. Copper tolerance in the lichen photobiont <i>Trebouxia erici</i> (Chlorophyta). <i>Environmental and Experimental Botany</i> , páginas 11-20. Resumen.	2002
D04	BACKOR et al. Short-term and chronic effects of copper, zinc and mercury on the chlorophyll content of four lichen photobionts and related alga. <i>Journal of the Hattori Botanical Laboratory</i> , páginas 271-284. Resumen.	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la LP11/86)**

En las reivindicaciones 1-7 de la solicitud de patente se reivindica un método para evaluar la toxicidad de una muestra a partir de ficobiontes de líquenes que comprende las siguientes etapas: a) obtención de una población de ficobiontes; b) preparación de una suspensión con la población de ficobiontes obtenida en a) en un medio de cultivo adecuado; c) exposición de la suspensión obtenida en b) a la muestra esterilizada cuya toxicidad se quiere evaluar; d) incubación de la suspensión de ficobiontes de líquenes obtenida anteriormente; e) medición de la dispersión óptica de la muestra obtenida en d); y/o f) cuantificación del DNA de la muestra obtenida en d); y/o g) determinación de la autofluorescencia de la clorofila de la muestra obtenida en d); h) análisis de los datos obtenidos en e) a g) para evaluar la toxicidad de la muestra. En las reivindicaciones 8, 9 y 10 de la solicitud de patente se reivindica en ficobiontes de líquenes el empleo de la dispersión óptica, de la cantidad de DNA y de la autofluorescencia de la clorofila como biomarcador en métodos para evaluar la toxicidad de una muestra. En las reivindicaciones 11 y 12 de la solicitud de patente se reivindica un kit para evaluar la toxicidad de una muestra utilizando las alteraciones en la actividad óptica, la cantidad de DNA y la autofluorescencia de la clorofila como biomarcadores.

El documento D01 divulga un método para aislar fotobiontes. En los documentos D02, D03 y D04 se puede apreciar un estudio de la tolerancia de *Trebouxia erici* frente al cobre, al cadmio al zinc y al mercurio. Ninguno de los documentos citados refleja un método para evaluar la toxicidad de una muestra a partir de ficobiontes de líquenes como el método reivindicado en la solicitud de patente. A partir de la información divulgada en cualquiera de los documentos D01, D02, D03 o D04 no resultaría evidente, para un experto en la materia, el desarrollo de un método para evaluar la toxicidad de una muestra a partir de ficobiontes de líquenes, como el método reivindicado en la solicitud de patente. Por tanto, las reivindicaciones 1-12 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.