(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 285 138**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/24 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **03737588 .8**
(86) Fecha de presentación : **31.01.2003**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1476188**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

(54) Título: **Procedimiento para acceder a la diversidad microbiana.**

(30) Prioridad: **08.02.2002 US 355177 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

(73) Titular/es: **Fraunhofer USA, Inc.**
46025 Port Street
Plymouth, Michigan 48170, US

(72) Inventor/es: **Kuhner, Carla, H.;**
Marrs, Barry y
Romesser, James

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para acceder a la diversidad microbiana.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

Esta invención se refiere a procedimientos para acceder a la diversidad microbiana a través de la alteración de los sistemas microbianos de percepción de quórum. En particular, esta invención permite el aislamiento de nuevos microorganismos mediante la inutilización de los sistemas de percepción de quórum que se usan para mantener la densidad celular microbiana a bajo nivel.

Descripción de la técnica relacionada

Con los desarrollos recientes en la tecnología de PCR y la secuenciación comparativa de genomas microbianos, se ha demostrado en muchos entornos que el número de los microorganismos que se han cultivado representa sólo un porcentaje de aquellos presentes en un entorno particular. Se ha estimado que sólo del 1 al 5% aproximadamente de los microorganismos existentes se han cultivado en condiciones de laboratorio.

Los organismos que siguen "sin cultivar" representan una gran reserva potencial de genes que constituye una nueva diversidad microbiana. El acceso a esta diversidad permitiría, por ejemplo, la identificación de enzimas que presentaran características biocatalíticas nuevas o aumentadas, nuevos cofactores u otros metabolitos secundarios nuevos como sustancias farmacéuticas, polímeros u otras sustancias químicas. Muchos procesos industriales utilizan (o podrían utilizar) procesos microbianos o componentes de éstos y, por tanto, podrían beneficiarse en gran medida del aislamiento de nuevos microorganismos que presentaran características únicas. Además, los microorganismos nuevos responsables de estados de enfermedad podrían ser identificados. La biorecuperación del entorno también podría beneficiarse en gran medida de la identificación de microorganismos que presentaran nuevos procesos de biodegradación o biotransformación.

Recientemente se han creado muchas empresas para acceder a la diversidad microbiana mediante el uso de técnicas recombinantes para salvar la incapacidad de cultivar los microorganismos. Estas técnicas están limitadas en cuanto a que pueden acceder solamente a genes únicos o a pequeñas agrupaciones de genes que codifican rutas metabólicas o sintéticas cortas. La capacidad de cultivar un microorganismo en condiciones de laboratorio proporcionaría una ventaja enorme.

En la naturaleza, las bacterias se comunican entre sí con el fin de coordinar la expresión de genes específicos de una manera dependiente de la densidad celular. Esta comunicación bacteriana se denomina percepción de quórum y permite a las bacterias controlar la expresión génica en respuesta al nivel de una molécula señalizadora difusible, denominada autoinductor. La molécula señalizadora se une a una proteína receptora que activa entonces la expresión génica. Los procesos que están controlados por la percepción de quórum incluyen la virulencia, la bioluminiscencia, la formación de biopelículas, el comportamiento en enjambre, la esporulación, la transferencia de plásmidos por conjugación y el desarrollo de la competencia.

Se han descrito tres tipos principales de sistemas de percepción de quórum en las bacterias: tipo 1, tipo 2 y basado en péptidos. La percepción de quórum de tipo 1 sólo se ha demostrado hasta ahora en microorganismos Gram negativos y utiliza acilhomoserinalactonas como moléculas señalizadoras. El tipo 2 se ha demostrado tanto en microorganismos Gram positivos como Gram negativos y se cree que utiliza 4-hidroxi-5-metil-2H-furan-3-ona o 4,5-dihidroxi-2-ciclopenten-1-ona como molécula señalizadora. Los sistemas de percepción de quórum basados en péptidos sólo se han demostrado en microorganismos Gram positivos y dependen de péptidos cortos para la activación génica. Además, se ha demostrado que otras señales químicas se usan para la percepción de quórum; éstas incluyen gamma-butirolactona en *Streptomyces sp*. y 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona en *Pseudomonas aeruginosa*.

El sistema de percepción de quórum de tipo 1 utiliza acilhomoserinalactonas (AHSL) como moléculas señalizadoras. Las señales químicas AHSL constan de un anillo de lactona unido a una cadena de acilo por medio de un enlace peptídico. La longitud de la cadena de acilo es específica para un microorganismo dado o para un proceso mediado por AHSL llevado a cabo por ese microorganismo. Algunas AHSL contienen un grupo carbonilo o hidroxilo en la posición 3 de la cadena de acilo (por ejemplo, 3-oxohexanoilhomoserinalactona, 3-hidroxibutanoilhomoserinalactona). El paradigma de la percepción de quórum de tipo 1 es el sistema LuxI/LuxR de *Vibrio fischeri*. La proteína LuxI cataliza la síntesis del autoinductor 3-oxohexanoilhomoserinalactona (OHHL). A medida que aumenta la densidad celular, se acumula el autoinductor y cuando se alcanza un nivel umbral, la señal OHHL interacciona con la proteína LuxR. El complejo LuxR/OHHL se une al ADN en la caja *lux*, dando lugar a la transcripción de los genes de bioluminiscencia. Otros microorganismos que presentan la percepción de quórum de tipo 1 poseen análogos de LuxI y LuxR.

Se incorpora el documento WO 01/85664 en su totalidad por su descripción de la percepción de quórum de tipo 2. Se cree que la biosíntesis del autoinductor de tipo 2 procede en etapas progresivas desde metionina, a través de S-adenosilmetionina,a S-adenosilhomocisteína,a S-ribosilhomocisteína, hasta 4-hidoxi-5-metil-2H-furan-3-ona o 4,5-dihidroxi-2-ciclopenten-1-ona. Se cree que las enzimas implicadas en la síntesis incluyen metioninaadenosiltransfe-

rasa, metiltransferasa, nucleosidasa y la proteína LuxS o sus análogos, que sintetizan 4-hidroxi-5-metil-2H-furan-3-ona o 4,5-dihidroxi-2-ciclopenten-1-ona a partir de su precursor. En *Vibrio harveyi*, los receptores para el autoinductor de tipo 2 son LuxP y LuxPQ. Cuando las concentraciones del autoinductor alcanzan un nivel umbral, el autoinductor interacciona con el receptor y LuxO se defosforila (e inactiva), evitando así la activación de un represor y permitiendo a LuxR activar la transcripción de los genes *luxCDABE*.

Muchas bacterias Gram positivas usan péptidos secretados como autoinductores. Generalmente, en los sistemas de percepción de quórum basados en péptidos, el péptido es secretado por un transportador con casete de unión a ATP (ABC). La concentración del autoinductor aumenta con la densidad celular y, para un nivel umbral, cinasas sensoras de dos componentes detectan el autoinductor. Se inicia una cascada de fosforilación que da lugar a la fosforilación de una proteína reguladora de respuesta análoga. De este modo se activa el regulador de respuesta, permitiéndole unirse a ADN e influir en la transcripción de los genes regulados por la percepción de quórum.

En la naturaleza, los microorganismos regulan los procesos microbianos en respuesta a las condiciones del entorno. Por ejemplo, en los entornos en los que los nutrientes están distribuidos uniformemente, puede imaginarse que los microorganismos regulan la división celular de modo que nunca se alcance una densidad celular elevada y las células se mantengan dispersas; un ejemplo de un entorno semejante es el océano. Es posible que los microorganismos utilicen la percepción de quórum para controlar su división celular y, de este modo, muchos microorganismos de estos entornos habrían sido hasta ahora incultivables en condiciones de laboratorio debido a la percepción de quórum. Por tanto, si se alterara o inutilizara la percepción de quórum podrían cultivarse nuevos microorganismos de estos entornos en condiciones de laboratorio.

Breve descripción de la invención

Algunas bacterias producen señales químicas que regulan su propia densidad celular. Se ha sugerido que las moléculas señal para la percepción de quórum pueden inhibir el crecimiento de las células hijas de las bacterias que producen dichas moléculas señal para la percepción de quórum, manteniendo así la población celular a baja densidad. Un mecanismo semejante de mantenimiento de una densidad celular relativamente baja puede contribuir también a las dificultades experimentadas por los microbiólogos al tratar de establecer cultivos puros de estas bacterias. La eliminación de esta señal, el bloqueo de su producción o la inhibición de la actividad de dicha señal pueden permitir el aumento de la densidad celular y dar lugar así a una "colonia" o masa celular que puede visualizarse.

La presente invención se refiere a un procedimiento para interferir con la percepción de quórum con el fin de inhibir el mecanismo que regula el crecimiento de la población celular. El procedimiento implica a) la obtención de una muestra del entorno que contiene al menos un nuevo microorganismo (sin cultivar en el laboratorio), b) la puesta en contacto de la muestra del entorno con una cantidad eficaz de un agente o una combinación de agentes, al menos uno de los cuales interfiere, altera, elimina o inutiliza una o varias de las señales para la percepción de quórum en la muestra del entorno, c) el cultivo de la muestra tratada en un medio de cultivo que contiene el agente o agentes que alteran la percepción de quórum y d) el análisis de las colonias de microorganismos cultivadas para demostrar la novedad genética como mínimo a nivel de especies o subespecies.

La invención permite la captura de biodiversidad microbiana previamente incultivable.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para acceder a la diversidad microbiana mediante la interferencia con o la alteración de las señales para la percepción de quórum que regulan la densidad de población de un microorganismo, mediante la adición de un agente o una combinación de agentes que interfieren con, alteran, eliminan o inutilizan el sistema de señales químicas para la percepción de quórum que regula la densidad de población del microorganismo. Donde aparezca una de las palabras "interferencia con, alteración, eliminación, inhibición o inutilización" en esta memoria descriptiva, pueden sustituirse las otras palabras.

El procedimiento de la presente invención comprende: a) la obtención de una muestra del entorno que contiene al menos un nuevo microorganismo (sin cultivar en el laboratorio), b) la puesta en contacto de la muestra del entorno con una cantidad eficaz de un agente o una combinación de agentes, al menos uno de los cuales interfiere con, altera, elimina o inutiliza una o varias de las señales para la percepción de quórum en la muestra del entorno, c) el cultivo de la muestra tratada en un medio de cultivo que contiene el agente o agentes que alteran la señal para la percepción de quórum y d) el análisis de las colonias de microorganismos cultivadas para demostrar la novedad genética como mínimo a nivel de especies o subespecies.

La muestra del entorno puede obtenerse a partir de cualquier fuente de la que se espera que contenga al menos un nuevo microorganismo (es decir, todavía sin cultivar). Las fuentes de la muestra del entorno de las que se espera que contengan nuevos microorganismos incluyen cualquier masa de agua, incluyendo pero sin limitarse a los arroyos, ríos, lagos, lagunas, marismas, océanos y semejantes. Las fuentes incluyen también muestras de suelo de cualquier variedad de fuentes. Las muestras de suelo pueden tomarse de cualquier tipo de bosque, como el bosque lluvioso o caducifolio. Además, las muestras de suelo pueden tomarse de praderas, pantanos, tundra, regiones áridas secas, tierras agrícolas, los fondos de lagos, ríos u océanos y semejantes. Las muestras pueden tomarse también de formaciones geológicas o entornos expuestos a condiciones extremas de temperatura o presión, incluyendo entornos extraterrestres. Los ejem-

plos de temperaturas extremas incluyen, pero no se limitan al Ártico y la Antártica, o las chimeneas hidrotermales o los manantiales calientes. Las muestras pueden obtenerse también a partir de otros microorganismos o de organismos multicelulares (incluyendo los humanos) que contienen simbiontes o patógenos microbianos; las muestras pueden constar también de fluidos corporales. Las muestras del entorno pueden incluir también, por ejemplo, componentes de las plantas como las hojas o la rizosfera. Las muestras del entorno pueden incluir también muestras de procesos industriales.

La invención se refiere a un procedimiento para interferir con, alterar, eliminar, inhibir o inutilizar las señales químicas (autoinductores) acilhomoserinalactona (AHSL) que facilitan la percepción de quórum de tipo 1 en muchas bacterias Gram negativas. Las señales de AHSL pueden alterarse usando un agente que a) abre el anillo de lactona, b) hidroliza el enlace peptídico o c) modifica la cadena de acilo.

En una realización de la invención, el agente es una enzima que cataliza una reacción con el autoinductor acilhomoserinalactona. Algunos ejemplos de clases de enzimas incluyen esterasas, lipasas, lactonasas, proteasas, peptidasas, aminoacilasas o carboxipeptidasas; muchas enzimas que constituyen estas clases se encuentran disponibles comercialmente.

Se ha demostrado que las enzimas pueden degradar las AHSL. Se ha mostrado que lactonasa inactiva oxohexanoil-, oxodecanoil- y oxooctanoilhomoserinalactonas (Dong y col., PNAS USA 97:3526-331, 2000 y Nature 411:813-817, 2001). De forma similar, se ha demostrado que una cepa de *Variovorax paradoxus* puede utilizar varias acilhomoserinalactonas para su crecimiento; se cree que el anillo se escinde enzimáticamente permitiendo el uso de la cadena de acilo y del anillo de lactona como fuentes de energía y nitrógeno, respectivamente (Leadbetter y Greenberg, J. Bacteriology, 182:6921-6926). En otra realización, el agente es una sustancia química distinta de una enzima que cataliza una reacción con la molécula de autoinductor, de modo que la estructura del autoinductor se modifica y dicho autoinductor deja de ser funcional. Se sabe que la adición de hidróxido de sodio u otra base para elevar el pH por encima de 8 hidroliza el anillo de lactona, degradando así la AHSL.

En una realización de la invención, el agente de la invención es una sustancia química que inhibe la biosíntesis del autoinductor acilhomoserinalactona, por ejemplo por medio de la inhibición de la proteína LuxI, de un análogo de la misma o de una proteína que presenta una función similar. Algunos ejemplos de un agente semejante incluyen cicloleucina o ácido (2S,4S)-2-amino-4,5-epoxipentanoico, inhibidores de la síntesis de S-adenosilmetionina. En otra realización de la invención, el agente es una sustancia química que inhibe la unión del autoinductor acilhomoserinalactona a su receptor, bloqueando así la transcripción de los genes regulados por la percepción de quórum. Un ejemplo de una sustancia química semejante es un anticuerpo que se une específicamente al receptor; el anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal y puede prepararse usando los procedimientos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo adicional de una sustancia química semejante es un análogo de la AHSL misma. Las furanonas halogenadas del alga roja *Delisea pulchra* que inhiben la unión de la AHSL al receptor que regula el comportamiento en enjambre en *Serratia liquefaciens* son un ejemplo de un análogo de una AHSL (Rasmussen y col., Microbiology, 146:3237-3244,2000).

En otra realización de la invención, la invención se refiere a un procedimiento para interferir con, alterar, eliminar, inhibir o inutilizar la percepción de quórum de tipo 2. En una realización, el agente es una enzima que cataliza una reacción con el autoinductor para la percepción de quórum de tipo 2, 4-hidroxi-5-metil-2H-furan-3-ona, 4,5-dihidroxi-2-ciclopenten-1-ona o un análogo. En otra realización el agente es una sustancia química que altera el autoinductor de tipo 2.

En otra realización más, el agente es una sustancia química que inhibe la biosíntesis del autoinductor para la percepción de quórum de tipo 2. Los agentes que inhiben la biosíntesis del autoinductor de tipo 2 pueden modificar las enzimas biosintéticas mismas. Alternativamente, el agente puede ser un análogo de uno de los precursores biosintéticos de una de las enzimas. Por ejemplo, el agente puede ser un análogo de metionina, S-adenosilhomocisteína o S-ribosilhomocisteína, evitando así la unión de estas moléculas a la enzima apropiada y la biosíntesis del autoinductor.

En otra realización de la invención, el agente es una sustancia química que inhibe la unión del autoinductor para la percepción de quórum de tipo 2 a su receptor. El agente puede ser una sustancia química que modifica LuxP o LuxQ o proteínas que llevan a cabo funciones similares en otros organismos. De forma similar, un agente puede inhibir la percepción de quórum de tipo 2 mediante la modificación de LuxO, LuxR o la proteína represora o cualquiera de las proteínas que llevan a cabo funciones similares en otros organismos. El agente puede unirse también al receptor del autoinductor o a otras proteínas implicadas en la transducción de señales entre el autoinductor y los genes controlados por la percepción de quórum; un ejemplo es un anticuerpo que se une a una de las proteínas implicadas. En otra realización el agente puede ser un análogo de la molécula de autoinductor de tipo 2, como una furanona modificada.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para interferir con, alterar, eliminar, inhibir o inutilizar la percepción de quórum regulada por péptidos en bacterias Gram positivas. Muchas bacterias Gram positivas usan péptidos secretados como autoinductores. En una realización, la percepción de quórum por bacterias Gram positivas se inhibe por una enzima que cataliza una reacción con el autoinductor peptídico. Algunos ejemplos de enzimas semejantes incluyen, pero no se limitan a proteasas, peptidasas y desaminasas. En algunos organismos Gram positivos, como *Staphylococcus*, el péptido contiene un anillo de tiolactona; estos autoinductores pueden ser alterados también por una enzima que cataliza una reacción con el enlace tiol, como la tiolreductasa. En otra realización de la invención, el agente es una sustancia química que altera la estructura del péptido autoinductor, por ejemplo, mediante la modi-

ficación de grupos carboxilo o amido. En otra realización más de la invención, el agente es un anticuerpo que se une al péptido autoinductor, evitando así la unión del péptido a su proteína receptora. El anticuerpo puede unirse también a un propéptido del autoinductor, evitando así el procesado postraduccional hasta el autoinductor activo. Sustancias miméticas de los péptidos como los β-péptidos pueden inhibir también la unión de un péptido a su receptor.

En otra realización de la invención, el agente es una sustancia química que inhibe la biosíntesis del péptido autoinductor. Por ejemplo, el agente puede inhibir la transcripción del péptido o de su propéptido (en el caso de autoinductores que se modifican postraduccionalmente). El agente puede inhibir la escisión del péptido autoinductor a partir de su propéptido.

En otra realización, el agente es una sustancia química que inhibe la unión del péptido a su proteína receptora. El agente puede ser una sustancia química o una enzima que modifica el receptor o que se une al receptor, y de este modo lo inactiva; un ejemplo es un anticuerpo específico para el receptor que altera la unión del autoinductor al receptor. En otra realización, el agente es un análogo del péptido autoinductor que se une al receptor, evitando así la unión del autoinductor. El artículo en Current Opinion in Microbiology 1999, 2:40-45, cuyo contenido completo se incorpora en este documento como referencia, describe como un autoinductor para una especie bacteriana puede actuar como un inhibidor para otra. Estos péptidos pueden usarse como agentes de inhibición en la presente invención. Hay numerosas referencias adicionales que citan inhibidores que un experto en la materia podría reconocer como de utilidad para la presente invención.

Se han descrito otras moléculas autoinductoras para la percepción de quórum, como gamma-butirolactona de *Streptomyces* y 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona de *Pseudomonas aeruginosa*. Es probable que haya sistemas de percepción de quórum aún sin describir. Usando los procedimientos descritos anteriormente, el experto en la materia podría alterar estos sistemas de percepción de quórum con el fin de permitir la formación de colonias por parte de organismos que regulan su densidad celular usando la percepción de quórum.

Una combinación cualquiera de agentes puede usarse para interferir con, alterar, eliminar, o inutilizar o inhibir la percepción de quórum. Como un ejemplo no limitante, un agente para el autoinductor de tipo 1, un agente para el autoinductor de tipo 2 y un agente para el autoinductor peptídico pueden mezclarse entre sí y usarse sobre una muestra dada.

Los agentes inhibidores de la percepción de quórum de la presente invención son preferentemente solubles en agua y pueden aplicarse o administrarse con un sistema portador aceptable. La composición puede aplicarse o administrarse con un sistema portador adecuado, tal que el agente puede dispersarse o disolverse de manera estable, de modo que dicho agente, al administrarse directa o indirectamente, está presente en una forma que está disponible de un modo particularmente ventajoso.

Además, los agentes individuales de la presente invención pueden combinarse previamente o cada componente puede añadirse por separado al mismo entorno según una dosis predeterminada, con el propósito de alcanzar el nivel de concentración deseado de los componentes del tratamiento y siempre que finalmente los componentes se mezclen íntimamente entre sí.

En otra realización de la invención, el procedimiento de la invención comprende la utilización de un dispositivo físico que tiene el efecto de mantener la concentración del autoinductor por debajo de la concentración umbral necesaria para la respuesta de percepción de quórum. Un ejemplo de dispositivo físico puede ser una membrana u otro soporte sólido al que pueden unirse los microorganismos. La membrana se lava entonces continuamente con el medio de cultivo para mantener una baja concentración del autoinductor difusible. El dispositivo físico puede comprender un polímero u otro soporte sólido al que se hallan unidos anticuerpos específicos para el autoinductor o para la proteína receptora del autoinductor. De este modo se evita que el autoinductor se una a su receptor y se inhibe la percepción de quórum. Puede usarse cualquier tipo de soporte físico que pueda alojar la membrana o el soporte sólido considerados en esta invención. Algunos ejemplos de estos dispositivos físicos pueden incluir, pero no se limitan a, unidades de ultrafiltración o diaflitración o columnas de cromatografía que podrían usarse para alojar la membrana o soporte sólido apropiados.

El medio de cultivo usado para el cultivo de las muestras tratadas puede ser cualquier medio conocido por los expertos en la materia. Preferentemente, el medio se deriva de los componentes que constituyen el entorno del que se toma la muestra. Por ejemplo, un medio de cultivo para aislar microorganismos marinos contiene preferentemente sales marinas. Un medio para el cultivo de microorganismos del suelo puede derivarse de un extracto del suelo. Los medios pueden suplementarse con los componentes apropiados con el fin aislar los microorganismos que crecen en un sustrato único o que presentan una característica nueva. El soporte sólido usado para aislar colonias individuales puede ser agar, agar noble, Gelrite o cualquier otro soporte sólido conocido por los expertos en la materia. Las estrategias para el aislamiento y cultivo de los microorganismos se describen en parte en The Prokaryotes (Martin Dworkin, ed., Springer Verlag, NY, 1999).

Con el fin de identificar un microorganismo como nuevo, el ácido nucleico de dicho microorganismo ha de secuenciarse y compararse con los bancos de datos de los microorganismos conocidos. La secuenciación de ADN puede ser realizada por una empresa u organización especializada en secuenciación o puede ser realizada por el investigador usando los procedimientos y el equipamiento conocidos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1

Cultivo y aislamiento de nuevos microorganismos: utilización de la esterasa Sigma E0887 para degradar señales autoinductoras de homoserinalactona (tipo 1)

En este ejemplo se usa agua de un lago/embalse como fuente de microorganismos, pero puede usarse cualquier fuente de la que se espera que presente una diversidad de nuevos microorganismos (es decir, aún sin cultivar).

Las muestras de agua (aproximadamente 1 - 2 litros) se obtienen a una profundidad de 0 - 2 metros en el lago Marsh Creek (Downingtown, PA, EEUU) y el embalse Spruce Run (Clinton, NJ, EEUU); las muestras se mantienen a 4 - 20ºC hasta su uso.

Se preparan medios de agar compuestos de 1) el agua de las muestras esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco (Becton Dickinson, Sparks, MD, EEUU) y el 0,05% de bactopeptona Difco y 2) el agua de las muestras esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco y el 0,50% de bactopeptona Difco. Preferentemente, el agar y la peptona se preparan a una concentración 4x en el agua de las muestras, se esterilizan y entonces se diluyen con el agua de las muestras esterilizada por filtración hasta el volumen apropiado. Según sea necesario, los medios se suplementan con 200 U/ml de esterasa esterilizada por filtración (Sigma, nº E0887) o 200 U/ml de esterasa filtrada por esterilización hervida (la esterasa se hierve durante 10 min a 100ºC y después se enfría) (200 U/ml = concentración final). En este ejemplo se usa la esterasa Sigma E0887 para degradar la señal, pero también pueden usarse otras enzimas o inhibidores del sistema de tipo 1.

Los medios de agar se vierten en placas de Petri y 1) se preparan las placas por vertido o 2) el agar se deja solidificar y las muestras se extienden sobre la superficie del agar.

Se preparan tres lotes de muestras de agua: a) agua de las muestras más E0887 (E0887 se disuelve en agua desionizada y se esteriliza por filtración; concentración final en la muestra de agua 200 U/ml), b) agua de las muestras más E0887 hervida (disuelta en agua desionizada, esterilizada por filtración, hervida durante 10 min y enfriada; concentración final 200 U/ml) y c) muestra de agua más una cantidad de agua desionizada estéril igual a aquella añadida a las muestras a) y b). Las muestras se diluyen entonces en etapas 1:10 sucesivas hasta 1 x 10^{-4} y unas alícuotas de 0,1 ml de las diluciones se siembran en las placas en profundidad (por vertido) o sobre la superficie de los medios de agar. Las placas de agar se incuban entonces durante un período de hasta 10 días a 20 - 30ºC, preferentemente en una cámara de humedad controlada para evitar la evaporación. El número de alícuotas de cada dilución y para cada medio está determinado por el número de colonias requerido para obtener diferencias estadísticamente relevantes en las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas con y sin E0887.

La formación de colonias durante el cultivo puede controlarse con un microscopio de disección o, alternativamente, un colorante indicador como cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC; 0,005%) puede permitir una mejor visualización de las colonias.

Después de la incubación se cuentan las colonias en/dentro de las placas. El número de UFC en las placas que contienen la esterasa E0887 debería ser significativamente superior a aquellos en las placas sin E0887. Las placas que contienen E0887 hervida deberían permitir la determinación de aquellos organismos que utilizan péptidos/proteínas para su crecimiento; el número de UFC en estas placas puede ser similar al del "medio menos E0887" debido a la peptona en el medio.

Las colonias de las placas de "medio más E0887" se suspenden en agua de las muestras estéril y se transfieren a medio fresco +/- E0887. Aquellas colonias que crecen en "medio + E0887", pero no en "medio - E0887" se envían entonces a la empresa Accugenix™/Acculab (Newark, DE, EEUU) (o a un laboratorio que ofrezca unos servicios similares) para la secuenciación del ADN con el fin de determinar si los microorganismos pertenecen a géneros, especies o subespecies nuevos (es decir, "novedosos").

Ejemplo 2

Cultivo y aislamiento de nuevos microorganismos: utilización de L-selenometionina o adenina para inhibir la señal autoinductora de tipo 2

En este ejemplo se usa agua del océano Atlántico como fuente de microorganismos, pero puede usarse también cualquier fuente de la que se espera que presente una diversidad de nuevos microorganismos (es decir, aún sin cultivar).

Las muestras de agua (aproximadamente 1-2 litros) se obtienen del océano Atlántico, a una profundidad de 0 - 2 metros, 1,61 km al este de Ocean City, MD, EEUU;las muestras se mantienen a 4ºC hasta su uso.

Se preparan medios de agar compuestos de 1) el agua de las muestras esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco (Becton Dickinson, Sparks, MD, EEUU) y el 0,05% de bactopeptona Difco y 2) el agua de las muestras esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco y el 0,50% de bactopeptona Difco. Preferentemente, el agar

y la peptona se preparan a una concentración 4x en el agua de las muestras, se esterilizan y entonces se diluyen con el agua de las muestras esterilizada por filtración hasta el volumen apropiado. Según sea necesario, los medios se suplementan con L-(+)-selenometionina 10 mM (Aldrich nº 473944) o adenina 5 mM (concentración final) (Sigma nº A-8626) como inhibidores del sistema autoinductor de tipo 2. También pueden usarse inhibidores adicionales del sistema de tipo 2.

Los medios de agar se vierten en placas de Petri y o bien 1) se preparan las placas por vertido o 2) el agar se deja solidificar y las muestras se extienden sobre la superficie del agar.

Se preparan dos lotes de muestras de agua: a) agua de las muestras más L-selenometionina o adenina (disueltas en agua desionizada y esterilizadas por filtración; concentración final 10 mM o 5 mM, respectivamente) y b) muestras de agua más una cantidad de agua desionizada estéril igual a aquella añadida con el inhibidor en la muestra a). Las muestras se diluyen entonces en etapas 1:10 sucesivas hasta 1 x 10^{-4} y unas alícuotas de 0,1 ml de las diluciones se siembran en las placas en profundidad (por vertido) o sobre la superficie de los medios de agar. Las placas de agar se incuban entonces durante un período de hasta 10 días a 10 - 18ºC, preferentemente en una cámara de humedad controlada para evitar la evaporación. El número de alícuotas de cada dilución y para cada medio está determinado por el número de colonias requerido para obtener diferencias estadísticamente relevantes en las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas con y sin inhibidor.

La formación de colonias durante el cultivo puede controlarse con un microscopio de disección o, alternativamente, un colorante indicador como cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC; 0,005%) puede permitir una mejor visualización de las colonias.

Después de la incubación se cuentan las colonias en/dentro de las placas. El número de UFC en las placas que contienen el inhibidor debería ser significativamente superior a aquellos en las placas sin inhibidor.

Las colonias de las placas de "medio más inhibidor" se suspenden en agua de las muestras estéril y se transfieren a medio fresco +/- sin inhibidor. Aquellas colonias que crecen en "medio + inhibidor", pero no en "medio - inhibidor" se envían entonces a la empresa Accugenix™/Acculab (Newark, DE, EEUU) (o a un laboratorio que ofrezca unos servicios similares) para la secuenciación del ADN con el fin de determinar si los microorganismos pertenecen a géneros, especies o subespecies nuevos (es decir, "novedosos").

Ejemplo 3

Cultivo y aislamiento de nuevos microorganismos: utilización del péptido Asp-Ile-Cys-Asn-Ala-Tyr-Phe para inhibir el sistema de señalización basado en péptidos de las bacterias Gram positivas

En este ejemplo se usa suelo como fuente de microorganismos, pero puede usarse también cualquier fuente de la que se espera que presente una diversidad de microorganismos nuevos (es decir, aún sin cultivar).

Las muestras de suelo (aproximadamente 500 g) se obtienen de los horizontes O_h y A_h de un bosque de hoja caduca; las muestras se mantienen a 4ºC hasta su uso.

Unas porciones de las muestras de suelo se lavan 1:1 en agua corriente, se filtran a través de papel Whatman nº 1 para obtener "agua de suelo" y se esterilizan por filtración. Se preparan medios de agar compuestos de 1) agua de suelo esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco (Becton Dickinson, Sparks, MD, EEUU) y el 0,05% de bactopeptona Difco y 2) agua de suelo esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco y el 0,50% de bactopeptona Difco. Preferentemente, el agar y la peptona se preparan a una concentración 4x en el agua de suelo, se esterilizan y entonces se diluyen con agua de suelo esterilizada por filtración hasta el volumen apropiado. Según sea necesario, los medios se suplementan con el péptido Asp-Ile-Cys-Asn-Ala-Tyr-Phe (</= 10 mM [concentración final]) como un inhibidor del péptido(s) para la percepción de quórum de las bacterias Gram positivas.

Los medios de agar se vierten en placas de Petri y o bien 1) se preparan las placas por vertido o 2) el agar se deja solidificar y las muestras se extienden sobre la superficie del agar.

Unas porciones de las muestras de suelo se lavan 1:1 en agua corriente estéril. Se dejan sedimentar brevemente las partículas del suelo y se preparan dos lotes de muestras de agua: a) agua de suelo más el péptido Asp-Ile-Cys-Asn-Ala-Tyr-Phe (</= 10 mM [concentración final]) esterilizado por filtración y b) agua de suelo más una cantidad de agua desionizada estéril igual a aquella añadida con el inhibidor en la muestra a). Las muestras se diluyen entonces en etapas 1:10 sucesivas hasta 1 x 10^{-4} y unas alícuotas de 0,1 ml de las diluciones se siembran en las placas en profundidad (por vertido) o sobre la superficie de los medios de agar. Las placas de agar se incuban entonces durante un período de hasta 10 días a 10 - 18ºC, preferentemente en una cámara de humedad controlada para evitar la evaporación. El número de alícuotas de cada dilución y para cada medio está determinado por el número de colonias requerido para obtener diferencias estadísticamente relevantes en las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas con y sin inhibidor peptídico.

La formación de colonias durante el cultivo puede controlarse con un microscopio de disección o, alternativamente, un colorante indicador como cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC; 0,005%) puede permitir una mejor visualización de las colonias.

Después de la incubación se cuentan las colonias en/dentro de las placas. El número de UFC en las placas que contienen el inhibidor debería ser significativamente superior a aquellos en las placas sin inhibidor.

Las colonias de las placas de "medio más inhibidor" se suspenden en agua de suelo estéril y se transfieren a medio fresco +/- sin inhibidor. Aquellas colonias que crecen en "medio + inhibidor", pero no en "medio - inhibidor" se envían entonces a la empresa Accugenix™/Acculab (Newark, DE, EEUU) (o a un laboratorio que ofrezca unos servicios similares) para la secuenciación del ADN con el fin de determinar si los microorganismos pertenecen a géneros, especies o subespecies nuevos (es decir, "novedosos").

Ejemplo 4

Cultivo y aislamiento de nuevos microorganismos: utilización de una peptidasa para inhibir el sistema de señalización basado en péptidos de las bacterias Gram positivas

En este ejemplo se usa suelo como fuente de microorganismos, pero puede usarse también cualquier fuente de la que se espera que presente una diversidad de nuevos microorganismos (es decir, aún sin cultivar).

Las muestras de suelo (aproximadamente 500 g) se obtienen de los horizontes O_h y A_h de un bosque de hoja caduca; las muestras se mantienen a 4ºC hasta su uso.

Unas porciones de las muestras de suelo se lavan 1:1 en agua corriente, se filtran a través de papel Whatman nº 1 para obtener "agua de suelo" y se esterilizan por filtración. Se preparan medios de agar compuestos de 1) agua de suelo esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco (Becton Dickinson, Sparks, MD, EEUU) y el 0,05% de bactopeptona Difco y 2) agua de suelo esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco y el 0,50% de bactopeptona Difco. Preferentemente, el agar y la peptona se preparan a una concentración 4x en el agua de suelo, se esterilizan y entonces se diluyen con agua de suelo esterilizada por filtración hasta el volumen apropiado. Según sea necesario, los medios se suplementan con una peptidasa, como la proteasa bacteriana de tipo IV de *Streptomyces griseus* (Sigma nº P6911) como inhibidor del péptido(s) para la percepción de quórum de las bacterias Gram positivas. La peptidasa debe demostrar una eficacia suficiente contra el péptido a baja temperatura y baja concentración de péptido y la preparación de peptidasa no debe contener inhibidores microbianos. La concentración de la peptidasa usada para la inhibición se determina empíricamente con péptido purificado.

Los medios de agar se vierten en placas de Petri y o bien 1) se preparan las placas por vertido o 2) el agar se deja solidificar y las muestras se extienden sobre la superficie del agar.

Unas porciones de las muestras de suelo se lavan 1:1 en agua corriente estéril. Se dejan sedimentar brevemente las partículas del suelo y se preparan tres lotes de muestras de agua: a) agua de suelo más peptidasa esterilizada por filtración, b)agua de suelo más peptidasa hervida esterilizada por filtración (la peptidasa se hierve a 100ºC y entonces se enfría) y c) agua de suelo más una cantidad de agua desionizada estéril igual a aquella añadida con la peptidasa en las muestras a) y b). Las muestras se diluyen entonces en etapas 1:10 sucesivas hasta 1 x 10^{-4} y unas alícuotas de 0,1 ml de las diluciones se siembran en las placas en profundidad (por vertido) o sobre la superficie de los medios de agar. Las placas de agar se incuban entonces durante un período de hasta 10 días a 10 - 18ºC, preferentemente en una cámara de humedad controlada para evitar la evaporación. El número de alícuotas de cada dilución y para cada medio está determinado por el número de colonias requerido para obtener diferencias estadísticamente relevantes en las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas con y sin peptidasa.

La formación de colonias durante el cultivo puede controlarse con un microscopio de disección o, alternativamente, un colorante indicador como cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC; 0,005%) puede permitir una mejor visualización de las colonias.

Después de la incubación se cuentan las colonias en/dentro de las placas. El número de UFC en las placas que contienen la peptidasa debería ser significativamente superior a aquellos en las placas sin la peptidasa.

Las colonias de las placas de "medio más peptidasa" se suspenden en agua de suelo estéril y se transfieren a medio fresco +/- sin peptidasa. Aquellas colonias que crecen en "medio + peptidasa", pero no en "medio - peptidasa" se envían entonces a la empresa Accugenix™/Acculab (Newark, DE, EEUU) (o a un laboratorio que ofrezca unos servicios similares) para la secuenciación del ADN con el fin de determinar si los microorganismos pertenecen a géneros, especies o subespecies nuevos (es decir, "novedosos").

Ejemplo 5

Cultivo y aislamiento de nuevos microorganismos: utilización de anticuerpos para inhibir el sistema de señalización basado en péptidos de las bacterias Gram positivas

En este ejemplo se usa suelo como fuente de microorganismos, pero puede usarse también cualquier fuente de la que se espera que presente una diversidad de nuevos microorganismos (es decir, aún sin cultivar).

Las muestras de suelo (aproximadamente 500 g) se obtienen de los horizontes O_h y A_h de un bosque de hoja caduca; las muestras se mantienen a 4ºC hasta su uso.

Mediante el uso de procedimientos conocidos se preparan anticuerpos contra el "propéptido autoinductor" o contra el péptido mismo (el propéptido autoinductor es la proteína escindida por las bacterias para producir el autoinductor).

Unas porciones de las muestras de suelo se lavan 1:1 en agua corriente, se filtran a través de papel Whatman nº 1 para obtener "agua de suelo" y se esterilizan por filtración. Se preparan medios de agar compuestos de 1) agua de suelo esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco (Becton Dickinson, Sparks, MD, EEUU) y el 0,05% de bactopeptona Difco y 2) agua de suelo esterilizada por filtración, el 0,5% de agar noble Difco y el 0,50% de bactopeptona Difco. Preferentemente, el agar y la peptona se preparan a concentración 4x en el agua de suelo, se esterilizan y entonces se diluyen con agua de suelo esterilizada por filtración hasta el volumen apropiado. Según sea necesario, los medios se suplementan con un anticuerpo contra el propéptido del autoinductor o contra el péptido autoinductor. El anticuerpo se une al autoinductor al ser secretado de las células o al propéptido, desactivándolo de este modo. El anticuerpo debe demostrar suficiente afinidad por el péptido o propéptido a baja temperatura y a baja concentración de péptido/propéptido y la preparación de anticuerpo no debe contener inhibidores microbianos. La concentración de anticuerpo usada para la inhibición se determina empíricamente con péptido o propéptido purificado.

Los medios de agar se vierten en placas de Petri y o bien 1) se preparan las placas por vertido o 2) el agar se deja solidificar y las muestras se extienden sobre la superficie del agar.

Unas porciones de las muestras de suelo se lavan 1:1 en agua corriente estéril. Se dejan sedimentar brevemente las partículas del suelo y se preparan dos lotes de muestras de agua: a) agua de suelo más el anticuerpo esterilizado por filtración y b) agua de suelo más una cantidad de agua desionizada estéril igual a aquella añadida con el anticuerpo en la muestra a). Las muestras se diluyen entonces en etapas 1:10 sucesivas hasta 1 x 10^{-4} y unas alícuotas de 0,1 ml de las diluciones se siembran en las placas en profundidad (por vertido) o sobre la superficie de los medios de agar. Las placas de agar se incuban entonces durante un período de hasta 10 días a 10 - 18ºC, preferentemente en una cámara de humedad controlada para evitar la evaporación. El número de alícuotas de cada dilución y para cada medio está determinado por el número de colonias requerido para obtener diferencias estadísticamente relevantes en las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas con y sin anticuerpo.

La formación de colonias durante el cultivo puede controlarse con un microscopio de disección o, alternativamente, un colorante indicador como cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC; 0,005%) puede permitir una mejor visualización de las colonias.

Después de la incubación se cuentan las colonias en/dentro de las placas. El número de UFC en las placas que contienen el anticuerpo debería ser significativamente superior a aquellos en las placas sin el anticuerpo.

Las colonias de las placas de "medio más anticuerpo" se suspenden en agua de suelo estéril y se transfieren a medio fresco +/- sin anticuerpo. Aquellas colonias que crecen en "medio + anticuerpo", pero no en "medio - anticuerpo" se envían entonces a la empresa Accugenix™/Acculab (Newark, DE, EEUU) (o a un laboratorio que ofrezca unos servicios similares) para la secuenciación del ADN con el fin de determinar si los microorganismos pertenecen a géneros, especies o subespecies nuevos (es decir, "novedosos").

Ejemplo 6

Cultivo y aislamiento de nuevos microorganismos: utilización de anticuerpos unidos a una fase sólida para inhibir el sistema de señalización regulado por péptidos en organismos del dominio Archaea

Mediante los procedimientos conocidos en la técnica se generan anticuerpos contra el péptido autoinductor. Los anticuerpos se unen entonces a sefarosa activada por NHS (Amersham Pharmacia Biotech) por medio de grupos amino primarios según los procedimientos desarrollados por el fabricante. Se prepara una columna que contiene la sefarosa unida al anticuerpo. Se obtiene una muestra del sedimento en una marisma. Se prepara un medio anaeróbico compuesto de agua de la marisma suplementada con el 0,05% de peptona, antibióticos (penicilina y tetraciclina) y citrato de titanio como reductor. La muestra de la marisma se añade a la columna de sefarosa y se permite la unión de los microorganismos durante una hora. Entonces se hace fluir continuamente el medio sobre la columna durante un período de hasta 5 días. De esta manera, el autoinductor es eliminado por el anticuerpo, los microorganismos contaminantes del dominio Bacteria se destruyen por la inclusión de los antibióticos y así se seleccionan los nuevos Archaea. Los microorganismos unidos a bolas pueden sembrarse entonces en el medio anaeróbico de agua de marisma

que contiene el 0,5% de agar noble con el fin de aislar los nuevos Archea. Los microorganismos de las colonias se secuencian para determinar su novedad como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 7

Cultivo y aislamiento de nuevos microorganismos: utilización de un dispositivo de flujo continuo para inhibir la percepción de quórum y aislar nuevos patógenos orales

Se suspenden discos de hidroxiapatito recubiertos con saliva en un reactor de flujo continuo de 1 litro que contiene un medio de cultivo apropiado para microorganismos orales (como un medio Nutrient Broth diluido [0,05%]). Antes de comenzar el flujo continuo se recoge saliva (50 ml) de individuos humanos y se añade al reactor. Se permite que los microorganismos de la saliva se unan a los discos de hidroxiapatito durante una hora. Después de la unión, los discos se lavan continuamente con medio fresco durante un período de hasta 5 días. De este modo, el autoinductor se elimina continuamente por lavado y los microorganismos se unirán a los discos de hidroxiapatito y crecerán sobre ellos. Después del cultivo, los microorganismos pueden aislarse en medio de cultivo que contiene agar; los microorganismos pueden identificarse por secuenciación de ADN como se describe en el ejemplo 1.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de acceso a la biodiversidad microbiana, comprendiendo el procedimiento:

(a) la obtención de una muestra del entorno que comprende al menos un microorganismo nuevo, es decir no cultivado en el laboratorio,

(b) la puesta en contacto de la muestra del entorno con una cantidad eficaz de un agente o una combinación de agentes, al menos uno de los cuales interfiere, altera, elimina o inutiliza una o varias de las señales para la percepción de quórum en la muestra del entorno,

(c) el cultivo de la muestra tratada en un medio de cultivo que contiene el agente o agentes que alteran la señal para la percepción de quórum y

(d) el análisis de las colonias cultivadas para demostrar la novedad genética como mínimo a nivel de especies o subespecies.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente inhibe la percepción de quórum de tipo 1.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el agente es una enzima que cataliza una reacción con el autoinductor acilhomserinalactona.

4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el agente se selecciona del grupo compuesto por esterasa, aminoacilasa, carboxipeptidasa, lipasa, lactonasa, peptidasa y proteasa.

5. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el agente es una sustancia química que inhibe la unión del autoinductor acilhomoserinalactona a su receptor.

6. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el agente es una sustancia química que inhibe la biosíntesis del autoinductor acilhomoserinalactona.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente inhibe la percepción de quórum de tipo 2.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en que el agente es una enzima que cataliza una reacción con el autoinductor para la percepción de quórum de tipo 2.

9. El procedimiento de la reivindicación 7, en que el agente es una sustancia química que inhibe la unión del autoinductor para la percepción de quórum de tipo 2 a su receptor.

10. El procedimiento de la reivindicación 7, en que el agente es una sustancia química que inhibe la biosíntesis del autoinductor para la percepción de quórum de tipo 2.

11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente inhibe la percepción de quórum regulada por péptidos.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el agente es una enzima que cataliza una reacción con el autoinductor peptídico.

13. El procedimiento de la reivindicación 11, en que el agente se selecciona del grupo compuesto por peptidasa, deaminasa y proteasa.

14. El procedimiento de la reivindicación 11, en que el agente es una sustancia química que inhibe la unión del autoinductor peptídico a su receptor.

15. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el agente es una sustancia química que inhibe la biosíntesis del autoinductor peptídico.

16. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el agente es un anticuerpo contra el autoinductor peptídico.

17. Un procedimiento de acceso a la biodiversidad microbiana, comprendiendo el procedimiento:

(a) la obtención de una muestra del entorno que comprende al menos un microorganismo nuevo (sin cultivar en el laboratorio),

(b) la puesta en contacto de la muestra del entorno con un dispositivo físico al que pueden unirse los microorganismos y que actúa para mantener la concentración de autoinductor por debajo de la concentración umbral necesaria para la respuesta de la percepción de quórum,

(c) el lavado continuo del dispositivo físico con medio de cultivo para mantener la concentración del autoinductor difusible a una baja concentración, y

(d) el análisis de las colonias de microorganismos cultivadas para demostrar la novedad genética, como mínimo a nivel de especies o subespecies.