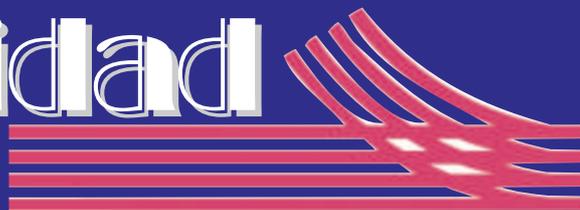


Actualidad



SEM

Bacterias productoras de electricidad

Juan Marcilla, primer Presidente de la SEM
Canibalismo en poblaciones de *Bacillus subtilis*
Probióticos. Aspectos críticos de su eficacia sobre la salud

Número 45

Junio 2008

Junta Directiva de la SEM

Presidente

Ricard Guerrero Moreno.

Dpto. Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
Avda. Diagonal, 645.
08028 Barcelona. rguerrero@iec.cat

Vice-Presidente

Ernesto García.

Dpto. Microbiología Molecular. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
e.garcia@cib.csic.es

Secretario

Humberto Martín Brieua.

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid.
humberto@farm.ucm.es

Tesorerera

María Jesús Martínez.

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
mjmartinez@cib.csic.es

Editores de publicaciones

INTERNATIONAL MICROBIOLOGY

Jordi Mas Castellà.

Fundació Catalana per a la Recerca i la Innovació.
Paseo de Lluís Companys, 23. 08010 Barcelona.
jordi.mas@fcri.es

Actualidad SEM

Federico Navarro García.

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid.
fnavarro@farm.ucm.es

NoticiaSEM:

Rafael Giraldo Suárez.

Dpto. Microbiología Molecular Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
rgiraldo@cib.csic.es

Directora de la Colección Española de Cultivos Tipo

Esperanza Garay.

Dpto. Microbiología y Ecología.
Edificio de Investigación. C/ Doctor Moliner, 50.
46100 Burjassot (Valencia)
esperanza.garay@uv.es

ISSN: 1888-5500.

Depósito Legal: 36180-1986.

www.semicro.es/ActualidadSEM.htm

Vocales

Juan Luis Barja Pérez.

Dpto. Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia. 15706 Santiago de Compostela.
(A Coruña). mpaetjlb@usc.es

Juan José Borrego García.

Dpto. Microbiología. Facultad de Ciencias. Campus Universitario Teatinos. 29071 Málaga.
jjborrego@uma.es

Rafael Giraldo Suárez.

Dpto. Microbiología Molecular
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
rgiraldo@cib.csic.es

Juan Ignacio Reguera Useros.

Área de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos. Plaza Misael Bañuelos s/n. 09001 Burgos. jiru@ubu.es

Ferrán Ribas Soler.

Sociedad General de Aguas de Barcelona.
Pº San Juan, 39. 08017 Barcelona.
fribas@agbar.es

Antonio Ventosa Uvero.

Dpto. Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
C/Prof. García González, 2. 41012 Sevilla.
ventosa@us.es

Presidentes de Grupos

Biodeterioro y Biodegradación

Diego A. Moreno.

Dpto. de Ingeniería y Ciencia de los Materiales.
ETS Ingenieros Industriales.
Universidad Politécnica de Madrid.
C/José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid.
diego.moreno@upm.es

Hongos Filamentosos y Levaduras (Micología)

Mª Isabel-Reyes González Roncero.

Dpto. Genética. Edificio Mendel 1ª P.
Campus de Rabanales.
Universidad de Córdoba. 14071 Córdoba.
ge1gorom@uco.es

Microbiología Clínica

Ernesto García.

Dpto. Microbiología Molecular.
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
e.garcia@cib.csic.es

Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

Tomás González Villa.

Dpto. Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia.
15782 Santiago de Compostela.
mpvilla@usc.es

Microbiología de los Alimentos

Miguel Ángel Asensio Pérez.

Dpto. Higiene de los Alimentos.
Facultad de Veterinaria.
Universidad de Extremadura.
Ctra. de Trujillo, s/n. 10071 Cáceres.
masensio@unex.es

Microbiología Molecular

Juan Mª García Lobo.

Dpto. Biología Molecular.
Facultad de Medicina.
Universidad de Cantabria.
C/Cardenal Herrera Oría s/n.
39011 Santander.
jmglobo@unican.es

Microbiología del Medio Acuático

Albert Bosch.

Dpto. Microbiología. Facultad de Biología.
Universidad Central.
Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.
abosch@ub.edu

Microbiología de Plantas

Jesús Murillo Martínez.

Dpto. Producción Agraria. ETSI Agrónomos.
Universidad Pública de Navarra.
31006 Pamplona.
jesus.murillo@unavarra.es

Protistología

Aurelio Serrano Delgado.

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.
CSIC-Universidad de Sevilla.
Avda. Américo Vespucio, 49. 41092 Sevilla.
aurelio@bvfc.csic.es

Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad

Jorge Lalucat Jo.

Dpto. Biología. Área de Microbiología.
Universidad de les Illes Balears.
Crta. Valldemosa, Km. 7,5.
07071 Palma de Mallorca.
jlalucat@uib.es

Actualidad SEM es una publicación semestral de la **Sociedad Española de Microbiología (SEM)**

Director : Federico Navarro-García. **E-mail**: fnavarro@farm.ucm.es

Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia.

Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Universidad Complutense. 28040 Madrid.

La SEM y el Director no comparten necesariamente las opiniones que puedan aparecer en artículos, informaciones o cartas enviados por los socios, ni se responsabilizan de su veracidad.

Foto de portada: Celia Rogero y Abraham Esteve-Núñez. Imagen de microscopía de fuerzas atómicas (AFM) de células de *Geobacter sulfurreducens* sobre grafito HOPG, medidas en modo no conductivo. Centro de Astrobiología (CSIC-CAB).



Microbiología con Bacon	por Ricardo Guerrero	1
Nombres propios		2
Antonio José Palomares Díaz		2
Informes de los grupos		3
Comisión Nacional de Normalización y Validación		5
Reseñas de cursos		6
VI Workshop en Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria		6
Tesis Doctorales		8
Carlos Garrido Crespo, Michal Letek Polberg, M ^a Magdalena Leiva Arjona, Pablo Álvarez-Martín, María Jiménez Sánchez, Ana Conty Fernández, Alexandre Olvera van der Stoep, Félix Daniel Andueza Leal, Inmaculada Moreno Gimeno, Jaime Navas Fernández, M. Salceda Fernández-Barredo y del Amo, María Esther Rodríguez Jiménez, Elena Fernández-Arenas Hervás, Esmeralda Valiente Conejero, Cecilia Girbau Iturralde, Ruth Serra Moreno.		
Apuntes y comentarios		14
El genoma sintético de la factoría Venter por Víctor de Lorenzo		14
Cine y microbiología por Juan Carlos Argüelles		15
Nuestra historia: Juan Marcilla, primer presidente de la SEM		18
Canibalismo en poblaciones de <i>Bacillus subtilis</i>		22
Nuevos socios de la SEM		26
Socios que deben actualizar datos		26
CECT, año 2007		27
Probióticos. Aspectos críticos de su eficacia sobre la salud		28
Elecciones a Junta Directiva		33
Bacterias productoras de electricidad: del subsuelo a la pila de combustible		34

En este número:

- **Juan Marcilla, primer Presidente de la SEM** por Alfonso V. Carrascosa Santiago (pág. 18).
- **Canibalismo en poblaciones de *Bacillus subtilis*** por José Eduardo González Pastor (pág. 22).
- **Probióticos. Aspectos críticos de su eficacia sobre la salud** por Elena Puertollano, María A. Puertollano, Gerardo Álvarez de Cienfuegos y Manuel de Pablo (pág. 28).
- **Bacterias productoras de electricidad: del subsuelo a la pila de combustible** por Abraham Esteve-Núñez (pág. 34).

CONGRESOS y REUNIONES

JUNIO- JULIO 2008

1 - 5 JUNIO: **108th General Meeting of the ASM.**
Boston Convention and Exposition Center Boston, MA.
gm.asm.org

14 JUNIO - 31 JULIO: **Microbial Diversity Course.**
Marine Biological Laboratory.
Woods Hole, Massachusetts, USA.
www.mbl.edu/education/courses/summer/course_micro_div.html

AGOSTO 2008

5 - 9 AGOSTO: **IUMS Congress: 12th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology & 12th International Congress of Mycology.**

10 - 15 AGOSTO: **IUMS Congress: 14th International Congress of Virology.**

Istanbul Convention and Exhibition Center (ICEC),
Istanbul, Turkey.

Prof. Dr Özdem Ang
ozdem.ang@superonline.com
iums2008@topkon.com
www.iums2008.org

17 - 22 AGOSTO: **The 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME12.**

Cairns, Australia.

ISME 12 Symposium Secretariat

Kenes International

1-3, Rue de Chantepoulet, P.O. Box 1726, CH-1211

Geneva 1, Switzerland

Tel:+41 22 908 0488

Fax:+41 22 732 2850

isme@kenes.com

www.kenes.com/isme12/

31 AGOSTO - 4 SEPTIEMBRE: **9th Symposium on Lactic Acid Bacteria - Health, Evolution and Systems Biology**

Hotel Zuiderduin, Egmond aan Zee, Netherlands

Dr Elaine E. Vaughan

Research & Development, Unilever

Olivier van Noortlaan 120, Vlaardingen

3133 AT Netherlands

Tel: +31-10-460 5491

elaine.vaughan@unilever.com

SEPTIEMBRE 2008

1 - 5 SEPTIEMBRE: **Third European Congress of Virology**
CCN CongressCenter Nürnberg, Germany.

MCN Medizinische Congressorganisation Nürnberg AG

eurovirology@mcnag.info

www.eurovirology.org

8 - 11 SEPTIEMBRE: **Society for General Microbiology 163rd meeting.**

Coventry, UK.

Mrs Josiane Dunn, Meetings Administrator

Phone +44 118 988 1805

Fax +44 118 988 5656

meetings@sgm.ac.uk

www.sgm.ac.uk/meetings/

16-18 SEPTIEMBRE: **VII Reunión del Grupo de Microbiología Molecular de la SEM.**

Cádiz.

www.ucm.es/info/mmol/Cadiz2008.htm

microbiologia.molecular@uca.es

25-27 SEPTIEMBRE: **VII Reunión de Microbiología del Medio Acuático**

Bilbao, España

Juan Iriberry. Universidad del Pais Vasco.

juan.iriberri@ehu.es

Fecha límite resúmenes e inscripción a precio reducido:

30 de junio 2008

http://www.uv.es/~mmas/

OCTUBRE 2008

12 - 16 OCTUBRE: **2nd ASM Conference on Beneficial Microbes: Beneficial Host-Microbial Interactions**

San Diego, California.

www.asm.org/Meetings/index.asp?bid=52027

NOVIEMBRE 2008

11 - 13 NOVIEMBRE: **Understanding and Controlling Infectious Diseases: an Agenda for the 21st Century**

Paris, France.

Institut Pasteur

CIS/Gestion des Colloques

28 rue du Dr Roux

75724 Paris cedex 15 - FRANCE

Fax : +33 1 4061 3721

www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/clp7/

13-14 NOVIEMBRE: **VI Reunión del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana de la SEM (CMIBM2008)**

Barcelona.

www.ub.edu/CMIBM2008

2009

28 JUNIO - 2 JULIO: **3rd FEMS Congress of European Microbiologists**

Göteborg Convention Centre, Göteborg, Sweden

GLOBE-KENES Secretariat

(17 Rue du cendrier) P.O. Box 1726, Geneva 1

CH-1211 Switzerland

Tel: +41 22 908 0488

Fax: +41 22 732 2850

fems@kenes.com ó congress@fems-microbiology.org

www.kenes.com/fems-microbiology/

Microbiología con Bacon

Muchos autores suelen introducir en sus textos una cita o una frase conocida que pronunció o escribió un personaje famoso, de la literatura, la ciencia, la filosofía, o de cualquier otro campo del pensamiento humano. Frases como *Nihil novum sub sole* (Salomón), *Be careful about reading health books; you may die of a misprint* (Mark Twain), o *Lo bueno, si breve, dos veces bueno* (Baltasar Gracián), nos invitan a detenernos en la lectura y recapacitar sobre lo leído. Uno de los autores ingleses más citados es Francis Bacon (1561–1626). Las enciclopedias especializadas, y ahora *wikiquote*, registran cientos de frases cortas sacadas de algunos de los numerosos libros del autor de *Novum Organum*, o *Indicaciones verdaderas sobre la interpretación de la naturaleza* (Londres, 1620), la obra fundacional del método científico, escrita todavía en latín. En el prefacio de un libro póstumo, *Máximas de la Ley* (Londres, 1630), Bacon escribió: “Considero que todo el mundo es deudor de su profesión, de la cual recibimos satisfacción y provecho. Y, por consiguiente, deberíamos esforzarnos en servirla, ayudarla, mejorarla y honrarla.” Los socios de la SEM tienen profesiones muy diversas, pero a todos les une un mismo interés y entusiasmo: la microbiología y los microorganismos. La SEM reúne profesionales de muy diversos campos, tanto desde el punto de vista del método de estudio (taxonomía, estructura, fisiología, genética, ecología, y otros), como del grupo estudiado (priones, virus, bacterias y arqueas, protozoos, hongos y algas), o como del grado y tipo de aplicación (ciencia básica, campos clínicos o industriales, universidad, laboratorios de ensayos, etc.). Todos debemos mucho a la microbiología, que ha sido y es nuestro objeto de estudio y trabajo, la materia que enseñamos, el fundamento de nuestra actividad durante años, y a la que los jóvenes que la han escogido recientemente como profesión piensan dedicar buena parte de su vida.

El siglo xx ha proporcionado a la humanidad un caudal de conocimientos superior al que nuestra especie había acumulado a lo largo de toda su historia. Unas de las ciencias que han progresado enormemente en las últimas décadas han sido la biología, en general, y la microbiología, en particular. Si recordamos la fecha de 1953 como el año en que se descubrió la estructura del DNA, también debemos tener presente que 1995 fue el año en el que se secuenció el genoma de dos organismos vivos: las bacterias *Haemophilus influenzae* y *Mycoplasma genitalium*. El enorme desarrollo tecnológico y un mecanismo de retroalimentación positiva han ido actuando conjuntamente, de manera que cada nuevo descubrimiento es un estímulo para seguir progresando. En las ciencias de la vida y de la salud, los mayores avances se han dado en el conocimiento de la célula y de los mecanismos de la herencia, en el conocimiento y control de muchas enfermedades, en especial las infecciosas, en la posibilidad de cambiar los genes y de fabricar microorganismos programados para desarrollar funciones o fabricar sustancias que nos interesan.

Paralelamente, el interés por la ciencia en la sociedad ha aumentado y eso ha repercutido en los medios de comunicación, que compiten por la difusión de los descubrimientos científicos. La facilidad de comunicación ha puesto de manifiesto que, en ciencia, “veracidad” y “velocidad” son conceptos a veces difíciles de maridar. En muchos medios de comunicación, principalmente la prensa diaria, la inmediatez es prioritaria: una noticia deja pronto de serlo cuando ha perdido la novedad o es desalojada de las primeras páginas por otras que seguirán el mismo camino, pues ya no es un *scoop*, una primicia. Además, el sensacionalismo es un valor añadido a la noticia. Esto hace que el rigor científico quede a veces marginado y no haga más que “entorpecer” —eso nos dicen— la tarea del comunicador. Los datos científicos no son hechos aislados, ni evidentes, y por ello tienen que ser comunicados y explicados adecuadamente. Los grupos especializados de la SEM, actualmente diez (pueden encontrarse en la página de *Actualidad SEM* que está antes de este texto), realizan una enorme tarea de difusión de la microbiología en el campo concreto de su especialidad. Cada congreso o reunión de grupo tiene un gran impacto en la ciudad y en los medios donde se celebra, y reúne también muchas personas que no son socios de la SEM y que, de esa manera, se encuentran con nuestra ciencia y conocen su importancia.

Éste es un año en que muchos grupos especializados de la SEM celebran su reunión bienal. Desde junio a noviembre de este año, los grupos especializados desarrollarán en distintas ciudades españolas numerosas actividades de gran interés. Y en conjunto, participarán más de mil personas. Mencionaremos muy sucintamente estas reuniones (puede encontrarse la lista detallada en la página web de la SEM, www.semicro.es/Congresos.htm). A principios de junio, dos: *Taxonomía*, en Tarragona, y *Protistología*, en Sevilla. En septiembre, cuatro: *Microbiología de Alimentos y Hongos filamentosos y levaduras (Micología)*, en Córdoba; *Microbiología Molecular*, en Cádiz; y *Microbiología del Medio Acuático*, en Bilbao. Finalmente, en noviembre, *Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana*, en Barcelona. Además, este año se celebrará en Granada, del 7 al 11 de julio, el “XII Curso de iniciación a la microbiología”; debemos animar a nuestros mejores estudiantes a solicitar la aceptación en el curso. Estos cursos, que la SEM celebra desde hace dieciocho años, han sido la cantera de muchos investigadores y docentes jóvenes que hoy día disfrutan y honran la profesión de la microbiología en centros españoles y extranjeros. Desde aquí, deseamos a los grupos especializados un gran éxito en la realización de sus reuniones y que, además, éstas sirvan para atraer nuevos socios a la SEM.

Ricardo Guerrero
Presidente de la SEM

Antonio José Palomares Díaz

El 26 de septiembre de 1975, Antonio José Palomares Díaz defendía brillantemente su Tesis Doctoral en la Universidad de Granada. Apenas unos días más tarde, con una maleta repleta de libros e ilusiones se incorporó como profesor al Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, por entonces Departamento interfacultativo, para impartir las asignaturas de Parasitología y Microbiología de la Licenciatura de Farmacia. Sus primeras semanas en Sevilla, prácticamente las consumió sin salir de su atalaya del Colegio Hernando Colón, afanado en la preparación del cuantioso número de temas que debía impartir. En cuanto sus obligaciones docentes se lo permitieron, sacando tiempo de donde no lo había, empezó a portar su experiencia y conocimientos en la línea de investigación sobre fijación de nitrógeno que de manera incipiente se había iniciado en el mismo Departamento un año antes de su llegada a Sevilla. Desde el curso 1978 y de forma continuada hasta escasamente cuarenta y ocho horas antes de su fallecimiento, impartió la asignatura Microbiología Clínica. Hasta el último instante de su vida siempre dio ejemplo de lo que según sus principios un docente debía hacer: preparar e impartir las clases con la devoción de un debutante.

En 1979 accedió, por oposición, al cuerpo de Profesores Adjuntos Numerarios. Lejos de acomodarse en su merecida plaza de Profesor Numerario y con la preocupación siempre presente de la formación continua, marchó a Estados Unidos donde permaneció dos años en el laboratorio del Profesor Donald Helinski, de la Universidad de California en San Diego.

Desde su llegada a la Facultad de Farmacia, contribuyó decisivamente a la consolidación de la propia Facultad y a la elaboración de los primeros planes de estudio. Se esforzó por mantener las mejores relaciones posibles, tanto con el Colegio de Farmacéuticos como con los Hospitales Virgen del Rocío y Macarena de Sevilla. Fruto de esta colaboración, fue la impartición de numerosos cursos de formación para profesionales farmacéuticos en Microbiología Clínica Hospitalaria en los que participó activamente durante muchos años.

Catedrático de Microbiología desde 1992, de su brillante y fatalmente truncada carrera científica pueden dar testimonio sus numerosas publicaciones en revistas de reconocido prestigio, los proyectos financiados como Investigador Principal, sus 16 Tesis Doctorales dirigidas y sus múltiples contribuciones a Congresos nacionales e internacionales.

Fue socio fundador de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN) y presidente de la misma desde 1989



hasta 1993. Por su altura científica y sus intensas relaciones internacionales se le encomendó la organización para el año 2000 de la *IV European Nitrogen Fixation Conference* que reunió en Sevilla más de 400 participantes y resultó un gran éxito científico y social.

Utilizó en su investigación sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa las últimas tecnologías de cada momento obteniendo importantes resultados en la expresión de genes, tanto de la bacteria como del hospedador, y una buena colección de construcciones (plásmidos, vectores, mini-transposones) solicitadas por muchos laboratorios. Los conocimientos alcanzados los aplicó últimamente a los estudios que, a partir del desastre de Aznarcóllar, llevaba a cabo sobre la posibilidad de utilizar esta simbiosis en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados apoyada económicamente por distintas entidades oficiales.

Por encima de su brillantez como docente y científico, destacaba sin duda su faceta como ser humano. El legado que Antonio nos deja es el de un trabajador incansable, tenaz y honesto. Su imborrable huella deja un vacío difícil de llenar en todos cuantos le admiramos. Continuar su labor se presenta como una misión casi imposible. Desde el dolor que tu ausencia nos produce como compañeros y amigos, descansa en paz, admirado Maestro.

Miguel Angel Caviedes¹ y Jose Olivares²

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

²Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada

Biodeterioro y Biodegradación

Presidente: **Diego A. Moreno**

La Junta Directiva del Grupo de Biodeterioro y Biodegradación ha decidido en su última reunión convocar **dos vocalías** que había vacantes. Es deseo de la Junta que el perfil de los candidatos sea en áreas de trabajo diferentes a las de los actuales vocales. Así serán bienvenidos aquellos que tengan ganas de participar activamente en un Grupo Especializado de la SEM y que trabajen en **“Biodegradación de hidrocarburos y/o contaminantes recalcitrantes”**, así como aquellos que realicen su actividad en **“Biorremediación de aguas y/o suelos contaminados”**. En breve todos los miembros de la SEM recibirán esta información. Aquellos miembros de la SEM que estén interesados y que todavía no pertenezcan al Grupo de Biodeterioro y Biodegradación pueden solicitar su inscripción al mismo antes de presentar su candidatura. Para mayor información pueden contactar con el Presidente del Grupo Diego A. Moreno (diego.moreno@upm.es).

Microbiología de los alimentos

Presidente: **Miguel Ángel Asensio**

XVI Congreso Nacional de Microbiología de los alimentos

La próxima reunión bienal del Grupo de Alimentos tendrá lugar en Córdoba, en el Palacio de la Merced, del 14 al 17 de septiembre de 2008, organizada por el Prof. José Fernández-Salguero Carretero, de la Universidad de Córdoba.

Programa Científico Preliminar

Conferencia inaugural: Professor Ewen Todd *“Challenges for food safety”*

Ponencias de las Mesas redondas programadas:

- Risk assessment in the context of industrial food safety management.
- Recientes avances sobre los mecanismos patogénicos de *L. monocytogenes*.
- Microsistemas para la detección rápida de patógenos.
- Microorganismos en la producción de alimentos vegetales fermentados.
- Control de microorganismos alterantes en alimentos madurados.
- Normalización en microbiología de alimentos. Presente y futuro.
- Vino y seguridad alimentaria.
- Nuevos sistemas de control microbiológico en enología.
- La inmovilización celular en enología.
- Tendencias en la Investigación Española en el Área de Alimentos.
- Análisis microbiológico por técnicas de PCR a tiempo real.
- Alimentación y salud en Europa: de la seguridad a la eficacia.

Conferencia de clausura: *Política científica y desarrollo tecnológico*.

La inscripción incluye la documentación, *coffee break*, visita turística, recepción y cena de gala. Las cuotas van de los 230 euros para los jóvenes (hasta 35 años) socios de la

SEM, hasta los 300 euros para los no socios de la SEM, para las inscripciones hasta el 16 de junio de 2008.

Se puede obtener más información a través de la página web del congreso en:

<http://www.proyectosycongresos.net/Microalimentos2008/>

Elecciones a cargos de la Junta Directiva del Grupo de de Microbiología de Alimentos

Según se establece en los estatutos, corresponde renovar los siguientes cargos de la Junta Directiva:

Presidente: Actualmente el Dr. Miguel Ángel Asensio Pérez Vocales:

1. Actualmente, la Dra. Begoña Pérez Villarreal.
2. Actualmente, el Dr. Francisco José Carballo García.

Tesorero: Actualmente, la Dra. Esther Bermejo Remón.

El Presidente y una vocal (Begoña Pérez-Villarreal) no pueden ser reelegidos, dado que ya habrán cumplido dos mandatos de cuatro años. El otro vocal (Francisco José Carballo) y la tesorera (Esther Bermejo) podrían ser reelegidos por un periodo adicional de cuatro años.

Los candidatos a los cargos vacantes deberán ser miembros del Grupo de Microbiología de los Alimentos y ser propuestos por un mínimo de diez miembros del mismo, y el Tesorero deberá residir en Madrid.

Las candidaturas deberán remitirse antes del día 1 de junio a:

Juan Miguel Rodríguez Gómez

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Veterinaria

Universidad Complutense de Madrid

28040 Madrid

Se remitirá por correo la información correspondiente para las votaciones y el recuento de votos tendrá lugar durante la celebración del XVI Congreso de Microbiología de los Alimentos, en Córdoba, del 14 al 17 de septiembre de 2008.

Microbiología Clínica

Presidente: **Ernesto García**

El II Congreso de Microbiología Clínica se celebrará entre los días 9 y 11 del próximo mes de julio de 2008 en Valencia. Tal y como consta en la página Web del Congreso (<http://www.uv.es/~gmcsem/>): “Para esta segunda reunión, que ha obtenido el reconocimiento de interés sanitario por parte de la *Consellería de Sanitat* de la *Generalitat Valenciana*, se ha diseñado un programa científico con una serie de áreas temáticas en donde se encuentran representados, en la medida de lo posible, los diferentes grupos

que en nuestro país trabajan en líneas de investigación, tanto básica como aplicada, dentro del ámbito de la Microbiología Clínica, en diferentes entornos profesionales. Por otro lado, se ha procurado facilitar y favorecer la asistencia y participación activa de los investigadores jóvenes, para los que se ha establecido una cuota de inscripción lo más ajustada posible.”

El Comité Organizador presidido por el Prof. José Pedro Martínez García, (Departamento de Microbiología y Ecología; Facultad de Farmacia, UVEG) ha realizado un gran esfuerzo para tratar de aunar esfuerzos y fomentar la colaboración entre los miembros de nuestro Grupo Especializado y de otras Sociedades. El ingreso estará a cargo de la Prof. M. Carmen Rubio Calvo del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública (Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza) con el título de: “Bacteria: de lo desconocido a la celebridad actual”.

Durante el Congreso tendrán lugar, además de sesiones de comunicaciones en panel, seis simposios en los que participarán destacados especialistas sobre diversos temas de interés (Anidulafungina: una nueva equinocandina para el tratamiento de la infección fúngica; Diagnóstico molecular; La microbiología en la clínica: más allá del diagnóstico; Microbiología clínica de microorganismos inusuales; Bases moleculares de la patología y virulencia microbianas).

El Prof. Rafael Sentandreu Ramón (Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia, UV) pronunciará la Conferencia de Clausura titulada: “¿Se pueden controlar las infecciones fúngicas? Dianas para el diagnóstico y para agentes antifúngicos”.

Además de los aspectos científicos antes mencionados está previsto un atractivo programa complementario de actividades sociales.

Desde la Junta del GEMC os animamos a participar activamente en este Congreso.

Microbiología industrial y biotecnología microbiana

Presidente: **Tomás González Villa**

El Grupo Especializado en Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana se encuentra preparando activamente diversos foros científicos que se celebrarán durante los últimos meses del año en curso. En primer lugar, deseamos destacar la gran labor que están realizando los Prof. Javier Pastor y Pilar Díaz, de la Universidad de Barcelona, que tienen muy avanzado el que será el II Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana, y que tendrá lugar en Barcelona los días 12, 13 y 14 de Noviembre 2008. Podéis consultar toda la información sobre las mesas redondas y *symposia*, así como todo

lo relativo al envío de comunicaciones en la web: www.ub.edu/CMIBM2008.

Asimismo, el Grupo Especializado participa en la organización del 2nd *International Symposium BIOTECHNOLOGY: NEWER TOOLS FOR A NEWER ERA*, bajo el patrocinio de la Fundación Ramón Areces. Ésta es la segunda edición del *Symposium* celebrado a finales de 2006 en Santiago de Compostela, y que gozó de una gran acogida por parte de alumnos de último curso y de postgraduados. Para esta edición, programada para los días 27 y 28 de noviembre de 2008 y a celebrar en la Universidad de Santiago, se cuenta con la participación de seis destacados ponentes internacionales, que disertarán sobre temas de gran actualidad en el campo de la biotecnología microbiana y áreas afines. Podéis solicitar información a los Profesores Tomás G. Villa (mpvilla@usc.es) y Jorge Barros Velásquez (jbarros@usc.es).

Finalmente, el Grupo Especializado participa también en la organización de las I Jornadas de Enología, a celebrar en el próximo mes de diciembre de 2008 en el Centro de Estudios Avanzados de la Universidad de Santiago de Compostela. El programa, que cubrirá todos los aspectos relacionados con la microbiología del vino, cerveza, sidra y otras bebidas fermentadas. Podéis contactar con la Prof. Pilar Calo Mata (mppcalo@usc.es), para ampliar información sobre este evento.

Hongos Filamentosos y Levaduras (Micología)

Presidenta: **M^a Isabel-Reyes González Roncero**

Se está organizando, conjuntamente con la Asociación Española de Micología (AEM), el IX Congreso Nacional de Micología que se celebrará en Córdoba del 17 al 19 de septiembre, 2008. La conferencia inaugural estará a cargo del Dr. Peter Philippson (Biozentrum, Universidad de Basilea, Suiza) y la de Clausura la impartirá la Dra. M. Carmen Rubio Calvo (Universidad de Zaragoza). Se han organizado dos Sesiones plenarias y tres *Workshops* específicos para cada Grupo.

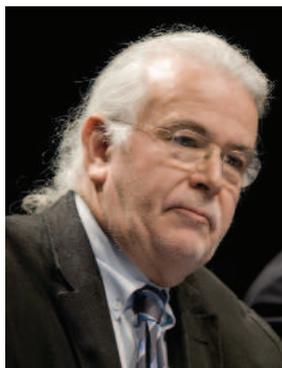
Durante dicho Congreso se celebrará el 25^o Aniversario de la Revista Iberoamericana de Micología.

La reunión de la directiva del grupo con sus miembros asistentes tuvo lugar en Sevilla en septiembre de 2007, coincidiendo con el XXI Congreso de la SEM. Durante éste se hizo entrega del 2^o premio “Fleming”, concedido a la mejor publicación en el área de la microbiología de hongos durante el año 2007, al trabajo presentado por J.A. Vizcaíno, F.J. González, M.B. Suárez, J. Redondo, J. Heinrich, J. Delgado-Jarana, R. Hermosa, S. Gutiérrez, E. Monte, A. Llobell y M. Rey. El ganador del premio ha sido invitado a presentar los resultados de su trabajo en el IX Congreso de Micología en Córdoba.

VISITE LA PÁGINA WEB DE LA SEM: www.semico.es

Encontrará información actualizada sobre congresos, reuniones, cursos y becas.

COMISIÓN DE NORMALIZACIÓN Y VALIDACIÓN



Entre los Congresos de la SEM de Cáceres (2005) y Sevilla (2007) las actividades de la Comisión de Normalización y Validación (CNV) estuvieron bastante polarizadas en sus relaciones con el Ente Nacional de Acreditación (ENAC), en virtud del Convenio previamente suscrito entre SEM y ENAC. Entre el Congreso de Cáceres y la reunión de la Junta Directiva de la

SEM de 3 de noviembre de 2006 el Presidente de la CNV era el Dr. José Martínez Peinado y el Vicepresidente el Dr. Ferran Ribas Soler. En la citada reunión de noviembre del 2006 se produjo el relevo del Dr. Peinado en la presidencia de la CNV por el Dr. Ribas. Hasta la reunión de la Junta Directiva correspondiente al Congreso de Sevilla (septiembre 2007) estuvo vacante el cargo de Vicepresidente, en cuyo momento se aprobó la elección del Dr. David Tomás.

Uno de los trabajos más interesantes llevados a cabo entre congresos por la CNV es el “Estudio de equivalencia de métodos de análisis de bacterias coliformes y *E. coli* en agua”, organizado conjuntamente con la Asociación Española de Abastecimiento y Saneamiento (AEAS) y coordinado por el Dr. Ribas. Este estudio se había iniciado ya en 2004 y sus resultados previos se habían presentado en 2005 tanto en las Jornadas de AEAS de Palma de Mallorca como en el Congreso de la SEM de Cáceres. Los resultados definitivos y el correspondiente informe fueron presentados en una Jornada patrocinada por el Ministerio de Sanidad y Consumo el 10 de mayo de 2006.

La oportunidad de los estudios de equivalencia obedece a la posibilidad contemplada en la Directiva europea de aguas potables de 1998 de que los países miembros de la Unión Europea utilicen métodos alternativos de análisis bacteriológico a los de referencia si se demuestra que son equivalentes o tienen mejores prestaciones. Por este motivo, los resultados del estudio fueron remitidos a la Unión Europea para que su Grupo Experto en Microbiología (EGM) emitiera su dictamen favorable. Este dictamen, ya en 2007, ha sido de felicitación y el equipo redactor del estudio está participando en una propuesta de Orden Ministerial por la que se aprueben como alternativos los dos métodos de análisis de bacterias coliformes y *E. coli* que superaron con éxito los ejercicios de equivalencia: Colilert y Chromocult.

Por otro lado, ya en su día ENAC se mostró interesado en el estudio de equivalencia, que les fue presentado en su sede antes de la presentación oficial en el Ministerio de Sanidad y Consumo, en el doble sentido de aceptar los criterios de equivalencia para la validación de métodos a acreditar y del reconocimiento a la labor de los laboratorios participantes en el estudio ante su posible acreditación.

En la Reunión de la Junta Directiva de la SEM del 3 de noviembre de 2006 se aprobaron también otros dos docu-

mentos de la CNV, correspondientes a estudios solicitados por ENAC en virtud del citado convenio: un informe sobre “Cepas de trabajo en el laboratorio de análisis microbiológico” y otro relativo a la “Normalización de métodos moleculares basados en la PCR, aplicados al análisis de agua y alimentos”. Este último estudio fue precisamente coordinado por el Dr. David Tomás, actual Vicepresidente de la CNV.

A la reunión convocada por ENAC el 10 de noviembre de 2006 para la presentación a varias instituciones (entre ellas SEM) del documento “Directrices para la evaluación de laboratorios que solicitan acreditación para ensayos microbiológicos” asistieron tanto el Presidente saliente (Dr. Peinado) como el entrante (Dr. Ribas) y se aprovechó para hacer entrega a ENAC del estudio de las cepas de trabajo, mientras que el de normalización de métodos moleculares, como estaba pendiente de una última revisión, no se entregó a ENAC hasta más adelante vía correo electrónico.

A mediados de 2007, ENAC elaboró la versión definitiva de sus Directrices para la evaluación de laboratorios, asumiendo algunas de las sugerencias de la SEM (elaboradas a través de la CNV) y otras instituciones consultadas.

Por parte de la Asociación Española de Normalización (AENOR) se invitó a la SEM por primera vez, a través de la CNV, a enviar un experto a la reunión celebrada en septiembre de 2006 en Cape Town (Sudáfrica) para la elaboración de normas ISO de Microbiología de Aguas (la reunión corresponde a ISO TC 147, Calidad del Agua), a la que asistió el Dr. Ribas. Para la propuesta de una nueva norma ISO sobre bacterias coliformes y *E. coli* en aguas (posible nueva ISO 9308-4 o sustituta de la ISO 9308-1) se tuvieron en cuenta los resultados del ejercicio español de equivalencia. Ha continuado la colaboración en el seno de este grupo y la última reunión ISO TC 147 (las reuniones tienen lugar cada año y medio) a la que se ha asistido ha tenido lugar recientemente (abril 2007) en Niagara-on-the-Lake (Canadá).

Mientras que la actividad del Dr. Ribas como Vicepresidente y posteriormente como Presidente propició en su día la actividad de la CNV en el campo de la Microbiología del Medio Acuático, el más reciente nombramiento del Dr. Tomás como Vicepresidente de la CNV ha permitido una mayor incidencia en el campo de la “Microbiología de los Alimentos”. Tanto uno como otro son miembros de AENOR y el Dr. Tomás es, además, auditor de ENAC.

De cualquier modo, estamos convencidos de que, aunque los grupos de “Microbiología de los Alimentos” y de “Microbiología del Medio Acuático” son los más directamente implicados en cuestiones de normalización, es probable que otros grupos de trabajo de la SEM tengan ocasión o incluso necesidad de intervenir más en un futuro. Que sirva este breve informe como una llamada a la colaboración de estos otros grupos. Estamos abiertos a vuestras sugerencias.

Dr. Ferran Ribas Soler

Presidente de la Comisión de Normalización y Validación

VI Workshop “Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria” (<http://quiro.uab.es/workshopMRAMA>)

Marta Capellas Puig y Josep Yuste Puigvert *Universitat Autònoma de Barcelona*

Del 20 al 23 de noviembre de 2007, tuvo lugar el VI *workshop* sobre Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria (MRAMA), en la sala de actos de la Facultad de Veterinaria de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB; Bellaterra, Cerdanyola del Vallès), dirigido por los Drs. Marta Capellas Puig y Josep Yuste Puigvert, profesores de Tecnología de los alimentos, y organizado por el *Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments* (CERPTA) y el Departamento de Ciencia animal y de los alimentos de la UAB. Celebrado anualmente, el *workshop* MRAMA, de un contenido aplicado y de futuro, amplía y difunde los conocimientos teóricos y prácticos sobre métodos innovadores para detectar, contar, aislar y caracterizar rápidamente los microorganismos habituales en los alimentos y el agua.

Como cada año, el ponente principal fue el profesor Dr. Daniel Y. C. Fung, de la *Kansas State University* (KSU; Manhattan, Kansas, EUA). El Dr. Fung es profesor de Ciencia de los alimentos del *Department of Animal Sciences and Industry*; su especialidad es la microbiología de los alimentos y, dentro de este campo, es un científico de prestigio internacional en el ámbito de los métodos rápidos y miniaturizados y la automatización. Además, es director del *workshop* internacional sobre Métodos rápidos y automatización en microbiología, que también tiene lugar anualmente en Manhattan, KS y que cumplió su 27ª edición el pasado junio. Ganador del Premio Internacional del *Institute of Food Technologists* (IFT) en 1997 por la organización de esta serie única de *workshops* internacionales, el Premio al Mejor Educador Waksman de la *Society for Industrial Microbiology* en 2001, el Premio a la Excelencia en la Docencia Universitaria del *College of Agriculture* de la KSU en 2005, y el Premio Carl R. Fellers del IFT en 2006 por su excepcional trayectoria en Ciencia y tecnología de los alimentos. En julio de 2007, recibe el Premio Inaugural al Mejor Educador en Seguridad Alimentaria de la revista *Food Safety* y ConAgra Foods Inc, por su carrera docente: más de 18.000 alumnos y director de 100 estudiantes graduados (33 doctorados y 67 másters). Es Editor de *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* y miembro de la *American Academy of Microbiology*, el IFT y la *International Academy of Food Science and Technology*. En 1995, fue invitado a dar una conferencia en el Instituto Pasteur de París (Francia) con motivo de la conmemoración del 100º aniversario de la muerte de Louis Pasteur. El Dr. Fung tiene, pues, una larga experiencia en el tema de

este *workshop*, lo que permitió ofrecer ponencias de gran calidad, de contenidos muy ricos y completos sobre las diversas disciplinas de la microbiología alimentaria. De hecho, al Dr. Fung, también se le conoce como el “padre” de los métodos microbiológicos miniaturizados, porque en este campo fue pionero y actualmente es uno de los investigadores más expertos y especializados del mundo, y ha ensayado con resultados positivos y ha aportado un alto número de técnicas innovadoras. Indudablemente, su presencia fue muy provechosa, y contribuyó a un buen aprendizaje de los métodos microbiológicos más recientes y eficaces.

El *workshop* contó con otros conferenciantes de renombre. El Dr. Armand Sánchez Bonastre, director del Servicio veterinario de genética molecular de la UAB y profesor de nuestro Departamento, habló sobre la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método genético puntero para la detección y la identificación microbiológicas. El Dr. Daniel Ramón Vidal, profesor de investigación en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Burjassot, transmitió a los asistentes sus amplios conocimientos sobre el desarrollo, el uso y la detección de alimentos transgénicos, y la nutrigenética y la nutrigenómica en alimentación. La Sra. Montse Vila Brugalla, responsable del Departamento de Control de calidad de Central de Cocinados CATAR SA, en Mollet del Vallès, nos acercó a los modelos de crecimiento e inactivación microbianos y la aplicación de la microbiología predictiva en la industria alimentaria. La Dra. Rosa Maria Pintó Solé profesora del Departamento de Microbiología de la *Universitat de Barcelona*, habló sobre los métodos de detección de virus, de interés creciente en el sector alimentario. Y el Dr. Ferran Ribas Soler, responsable del Área de Microbiología del laboratorio de la *Societat General d'Aigües de Barcelona* (AGBAR), participó con una interesante ponencia sobre los ejercicios de equivalencia entre métodos de análisis microbiológico.

Además, asistieron importantes empresas de microbiología, que proyectaron diversas presentaciones multimedia y mostraron sus equipos y sus productos, para explicar su funcionamiento, sus ventajas y limitaciones y las técnicas en que se basan. Estas empresas, que patrocinaron el VI *workshop* MRAMA, fueron: 3M España SA, AES Chemunex España SA, Applied Biosystems, BC Aplicaciones Analíticas SL, Becton Dickinson SA,

bioMérieux España SA, Bio-Rad Laboratories SA (y Bio-Rad Laboratories SA-NV –Bélgica–), Bioser SA (que invitó a participar a Microbial SL y Tepnel BioSystems Ltd), IZASA SA, MicroPlanet Laboratorios SL (distribuidor de BioControl Systems Inc y LIOFILCHEM srl), Oxoid SA (parte de Thermo Fisher Scientific Inc), Roche Diagnostics SL, y Vitaltech Ibérica SL (que invitó a participar a Neogen Europe Ltd). También asistió Millipore SAS (Francia).

El *workshop* ha sido una actividad exitosa, tanto por los ponentes y sus ponencias, como por la asistencia de público y la participación de las empresas de microbiología. Asistieron 186 personas, de diversos colectivos nacionales e internacionales:

a) Numerosos laboratorios, consultorías e industrias agroalimentarias: entre otros, de los sectores cárnico y avícola, lácteo, productos de la pesca, comidas preparadas, congelados, bebidas analcohólicas (aguas, zumos de frutas, bebidas refrescantes) y alcohólicas (cervecero, vitivinícola), alimentación animal; y algunos de ámbito no alimentario: cosmético, productos de limpieza.

b) Administración: el Laboratorio municipal del *Concello de Vigo*, y el *Department of Chemistry* (Petaling Jaya, Malasia).

c) Personal técnico, profesores y estudiantes de la UAB (Ciencia y tecnología de los alimentos, Veterinaria, Biotecnología, y tercer ciclo) y otras instituciones, como el *Institut d'Ensenyament Secundari* (IES) Poblenou (Barcelona), la *Universitat de Girona*, la Universidad Politécnica de Valencia, la Universidad de Zaragoza, la Universidad de Salamanca, la Universidad Complutense de Madrid, y la *University of Plymouth* (Inglaterra).

d) Otros centros de investigación: el *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* (Barcelona); el *Centre Nacional de Microelectrònica* (CNM) de la UAB y el IATA (Burjassot y Paterna), ambos del CSIC; el *Centre Balear de Biologia Aplicada* (Palma de Mallorca); el Centro Tecnológico de la Industria Cárnica de La Rioja (CTIC; Alesón); el Instituto

Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA; Madrid); el *Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia* (INTECMAR; Vilagarcía de Arousa); el *Danish Meat Research Institute* (Roskilde, Dinamarca); y el *State Veterinary Institute Olomuc* y el *State Veterinary Institute Prague* (Olomuc y Praga, respectivamente, Chequia).

También estuvieron presentes la *Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació* (ACCA), entidad colaboradora con el *workshop* MRAMA, y EyPASA – *Revista Alimentaria*, publicación oficial del *workshop*.

Durante los dos últimos días, se realizaron unas sesiones prácticas en el laboratorio, en las que se trabajó con algunos aparatos y los productos más innovadores dentro del campo de los métodos rápidos y la automatización. Y se organizaron otras dos actividades: visitas a una empresa de biología molecular, para aplicaciones de la PCR en tiempo real; y demostraciones sobre extracción automática de ADN.

Hubo una mesa redonda con el Dr. Fung, el Dr. Ribas y profesionales de empresas de microbiología, moderada por el Dr. José Juan Rodríguez Jerez, director del Observatorio de la seguridad alimentaria de la UAB y profesor de nuestro Departamento. Con la mesa redonda, sobre la instrumentación en microbiología de los alimentos, las tendencias del mercado mundial y otros temas de actualidad del sector, y las diversas ponencias del *workshop*, se constató que el número de ensayos microbiológicos aumenta año tras año, con grandes progresos en el desarrollo de métodos fáciles de usar y que garantizan rapidez, precisión, sensibilidad y especificidad en la obtención de los resultados, a un coste moderado. Los métodos microbiológicos rápidos y automatizados permiten a las industrias ofrecer sus productos más rápidamente al mercado, garantizando su seguridad y su conservación.

El VII *workshop* MRAMA se celebrará del 25 al 28 de noviembre de 2008.



VI Workshop "Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria"
Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

Caracterización microbiológica y molecular de cepas de *Colletotrichum* responsables de la antracnosis en fresas

Carlos Garrido Crespo

Directores: **Jesús Manuel Cantoral Fernández y María Carbú Espinosa de los Monteros.**

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz.

El género *Colletotrichum* engloba a un gran número de especies y constituye uno de los hongos fitopatógenos más importantes en todo el mundo. Uno de los cultivos afectados por este hongo es el cultivo de fresa, en el cual tres especies han sido descritas como responsables de causar la enfermedad conocida como antracnosis, *C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*. Este hongo es responsable de más del 80% de la muerte de las plantas en los invernaderos, y ocasiona pérdidas que alcanzan los 100 millones de euros al año en el suroeste de España (Huelva y Cádiz).

En primer lugar se realizó un muestreo de las provincias de Huelva y Cádiz, donde se tomaron muestras de plantas y frutos presentando síntomas típicos de antracnosis. Se aislaron más de 300 cultivos monoconidiales y se identificaron mediante PCR. Se puso de manifiesto que *C. acutatum* era la especie responsable de la antracnosis en fresa en esta región. Se realizó una caracterización morfológica de los aislados y se estudió la patogenicidad de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* mediante un bioensayo *in planta*, en las variedades de fresa *Fragaria ananassa* var. Camarosa y var. Ventana. Las cepas de *C. acutatum* presentaban niveles similares de patogenicidad y las cepas de la especie *C. gloeosporioides* presentaron una mayor patogenicidad que las de *C. acutatum*.

Una amplia colección de cepas de *C. acutatum* procedentes de diferentes orígenes geográficos fue estudiada y caracterizada usando tres estrategias o metodologías: i) análisis del gen 5.8S y los espaciadores ITS1-ITS2; ii) estudio de la variabilidad genética mediante la hibridación *Southern-blot* usando una sonda específica para la secuencia telomérica y iii) establecimiento del cariotipo electroforético mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE). El análisis de PFGE estableció que las cepas presentaron entre seis y nueve cromosomas, con tamaños genómicos totales entre 36 y 29 Mb. El análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante la hibridación *Southern-blot* corroboró los resultados anteriores.

Tras la caracterización molecular, se realizó el diseño y la optimización de un protocolo para la identificación y detección temprana de *Colletotrichum*, y que supusiera una mejora en tiempo y sensibilidad de los métodos empleados hasta la fecha. La metodología elegida fue la PCR a tiempo real, con tecnología TaqMan®.

La detección e identificación de *Colletotrichum* spp. se completó con la optimización de un protocolo de extracción de ADN directamente de material vegetal. La sensibilidad del nuevo método de detección fue del orden de 10 a 100 veces más sensible que los protocolos de PCR convencional publicados hasta la fecha. Este nuevo sistema de detección se comparó con la metodología de detección existente para la especie *C. acutatum* basándose en el ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), y se puso de manifiesto la mayor robustez y fiabilidad que supone el nuevo protocolo frente a los disponibles hasta la fecha para la detección de este hongo, incluso directamente de material vegetal.

Parte de este trabajo ha sido publicado en: Garrido *et al.*, *European J. of Plant Pathology*, DOI 10.1007/s10658-007-9224-7.

Implicación de la proteína DivIVA en el crecimiento polar de *Corynebacterium glutamicum*

Michal Letek Polberg

Directores: **José Antonio Gil Santos y Luis Mariano Mateos Delgado.**

Universidad de León, Facultad de Biología, Departamento de Biología Molecular.

Los promotores de los genes *gnt* de *Corynebacterium glutamicum* han servido para controlar la expresión de genes esenciales en este microorganismo. Utilizando estos promotores se ha conseguido reducir la expresión del gen esencial *divIVA*, obteniéndose cepas con morfología cocoide como consecuencia de una ausencia total de crecimiento polar. La falta de *DivIVA* en las cepas de expresión reducida de *C. glutamicum* sólo fue complementada por *DivIVAs* de otros actinomicetos, pero no por proteínas *DivIVA* de *Bacillus subtilis* o *Streptococcus pneumoniae*. Las cepas de corinebacterias de expresión reducida también pudieron ser complementadas por proteínas *DivIVA* quimera que presentaban un dominio de *DivIVA* de *B. subtilis*, a pesar de las diferencias de tamaño entre las respectivas regiones *coiled-coil*. Los cambios en la expresión del gen *divIVA* conducen a una segregación aberrante del cromosoma, aunque la proteína *DivIVA* no parecía estar directamente implicada en este proceso ya que se localizaba en el septo de división una vez iniciada la biosíntesis de peptidoglicano y cuando los nucleoides se encontraban totalmente segregados. Además, se ha observado que en *C. glutamicum* la localización de *FtsZ* en el septo de división no está regulada por el sistema de oclusión por nucleóide o por cualquier otro regulador temporal o espacial conocido. Finalmente, como aplicación práctica de los resultados obtenidos, se ha utilizado el gen *divIVA* como diana de amplificación por PCR con objeto de identificar corinebacterias patógenas.

The *gnt* promoters from *Corynebacterium glutamicum* were used to control the expres-

sion of essential genes in this microorganism. Using these promoters we obtained partially depleted *DivIVA* strains, which showed coccoid morphology as a consequence of the total lack of polar growth. The partial depletion of *DivIVA* in *C. glutamicum* was complemented by *DivIVAs* from actinomycetes, but not by *DivIVAs* from *Bacillus subtilis* or *Streptococcus pneumoniae*. The partially depleted *Corynebacterium* strains were also complemented by quimeric versions of the *DivIVA* protein, in which a conserved region was exchanged with the corresponding domain of *DivIVA* from *B. subtilis*, despite the great difference in size of the respective coiled-coil regions. Changes of the *divIVA* level of expression lead to an aberrant chromosome segregation, but *DivIVA* seems to be indirectly involved in this process because it localizes at the midcell only when the peptidoglycan synthesis has started and nucleoids are completely segregated. In addition, in *C. glutamicum* the localization of *FtsZ* at the septum is not negatively regulated by nucleoid occlusion or other temporal and spatial known regulators. Finally, as a practical application of these results, the *divIVA* gene was used as a target for PCR amplification in order to identify pathogenic corynebacteria.

Modificación de la respuesta biológica por telitromicina

M^a Magdalena Leiva Arjona

Directores: **Alfonso Ruiz-Bravo López y María Jiménez Valera**

Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

Numerosas clases de antimicrobianos, particularmente los macrólidos y algunas quinolonas han demostrado poseer efectos moduladores en células inflamatorias. El creciente número de estudios clínicos y experimentales llevados a cabo ha demostrado la relevancia de los efectos inmunomoduladores de los agentes antimicrobianos en la terapia de infecciones, principalmente en las del tracto respiratorio. La telitromicina es el primer miembro de una nueva familia de antibióticos, los ketólidos, estructuralmente relacionados con los macrólidos. Fue diseñada específicamente para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio. En el presente estudio se demuestra que la telitromicina, independientemente de su actividad antimicrobiana, posee una interesante actividad antiinflamatoria. La telitromicina inhibe la producción de mediadores de inflamación, entre los que se encuentra la citokina proinflamatoria TNF- α o la quimiocina murina MIP-2, homóloga de la IL-8 humana, por macrófagos y por células epiteliales; también modifica la producción de radicales oxidantes como el NO. Esta actividad antiinflamatoria la ejerce actuando a nivel de la activación de los factores de transcripción implicados en la respuesta inflamatoria, como es NF- κ B entre otros; además favorece la apoptosis, implicada en la resolución de los procesos inflamatorios.

Desarrollo de sistemas vector/hospedador en bifidobacterias

Pablo Álvarez-Martín

Director: **Baltasar Mayo Pérez.**

Tutora: **Covadonga Barbés Miguel.**

Centro de Realización: **Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC).**

Centro de Presentación: **Facultad de Biología, Universidad de Oviedo.**

Las bifidobacterias constituyen una de las poblaciones microbianas dominantes en el intestino humano y de otros animales, donde ayudan a mantener el equilibrio microbiano por medio de sus variadas actividades metabólicas y contribuyen a preservar el estado de salud. El conocimiento de los mecanismos de probiosis es fundamental para apoyar científicamente su acción beneficiosa, así como para la utilización racional de las bifidobacterias en el diseño de productos probióticos. Para llevar a cabo estos propósitos son necesarias diversas herramientas genéticas, cepas hospedadoras adecuadas y mecanismos eficientes de transferencia de ADN. En estos momentos, los plásmidos son la única fuente de replicones para el género *Bifidobacterium*. De esta forma, el conocimiento de éstos y su caracterización molecular se revela fundamental para el desarrollo de nuevas y más versátiles herramientas genéticas.

En esta Tesis, analizamos en busca de plásmidos una serie de 72 aislados intestinales pertenecientes a siete especies distintas. Se encontraron plásmidos en 19 aislados con 6 perfiles distintos: dos perfiles con un solo plásmido y cuatro con, al menos, dos. Debido a su pequeño tamaño, el buen rendimiento plasmídico de la cepa portadora y su estabilidad, el plásmido pBC1 de la cepa *Bifidobacterium catenulatum* L48 fue seleccionado para una posterior caracterización. Su secuenciación reveló una molécula circular de 2.540 pb con un contenido G+C del 64%. En el origen de replicación se identificaron una repetición de 24 nucleótidos repetida tres veces y media y cinco repeticiones invertidas, con una organización similar a la de los plásmidos que replican por el modo theta. El análisis de la secuencia reveló también la presencia tres ORFs capaces de codificar péptidos de más 50 aminoácidos: *repB*, que codifica una replicasa de 315 aminoácidos, un gen transcripcionalmente acoplado (*orfX*-like) similar a los genes *orfX* de los plásmidos de lactococos, y *copG*-like con un dominio conservado de las proteínas de la familia CopG. La homología de RepB de pBC1 mostró una gran similitud con la de los plásmidos pMB1 y pDOJH10S de *B. longum*, y un parentesco lejano con la de los plásmidos theta-replicativos ColE2 de *Escherichia coli* y pXZ10142 de *Corynebacterium glutamicum*. Mediante hibridación se demostró que el replicón de pBC1 no estaba relacionado con el resto de los plásmidos detectados.

Para determinar el replicón mínimo de pBC1 y la funcionalidad de las distintas ORFs y secuencias, se amplificaron fragmentos del plásmido mediante PCR y se clonaron en el vector pBif (derivado de pUC que no replica en las bifidobacterias). Todos los derivados que incluían

repB y las regiones inmediatas anteriores replicaban en bifidobacterias. Sin embargo, la interrupción de *repB* suponía la pérdida de la replicación. El número de copias de pBC1 se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real y resultó ser de 30 por cromosoma equivalente. Alguno de los derivados, sin embargo, presentaba un número de copias menor (entre 3 y 23), de lo que dedujimos que *orfX*-like y *copG*-like juegan un papel importante en la replicación y estabilidad del plásmido.

Basados en pBC1, se desarrollaron varios vectores de clonación; capaces, la mayoría, de replicar en *E. coli* y bifidobacterias. Todas las construcciones mostraron una estabilidad segregacional y un número de copias similar a los del plásmido original. El vector pAM4 se introdujo en ocho especies de bifidobacterias, incluyendo *B. dentium*, *B. pseudolongum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. pseudocatenulatum*, *B. thermophilus*, *B. animalis* y *B. adolescentis*. Con el propósito de comprobar la funcionalidad de los vectores, el gen de la α -L-arabinofuranosidasa de *B. longum* B667 se clonó en pAM1 y se expresó en cepas de *E. coli* y *B. pseudocatenulatum*, en las que presentó una actividad enzimática unas 100 veces mayor que en la cepa original.

Estudio de la función y regulación de las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 de la ruta de integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*

María Jiménez Sánchez

Directores: **Víctor Jiménez Cid y María Molina Martín**

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* responde a daños en la pared celular y otros estreses gracias a la activación de la ruta de integridad celular. Esta ruta consiste en un módulo de tres quinasas que consta de la MAPK Slt2, las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 y la MAPKKK Bck1, que es activada por la proteína quinasa C, Pkc1. La activación de esta ruta da lugar a la expresión de genes necesarios para el mantenimiento de la homeostasis de la pared celular. Esta ruta de MAPKs es la única en *S. cerevisiae* que presenta dos MAPKKs. En este trabajo hemos comprobado que tanto Mkk1 como Mkk2, así como proteínas químicas obtenidas por el intercambio de sus dominios catalíticos y regulatorios, son capaces de mantener eficientemente la transmisión de la señal, confirmando que ambas tienen una función equivalente en la ruta. Además, en respuesta a la activación de esta ruta, Mkk1 y Mkk2 son fosforiladas de manera dependiente tanto de sus activadores como de su propia diana de fosforilación, la MAPK Slt2. Hemos demostrado que Slt2 es capaz de fosforilar in vitro a Mkk1 y Mkk2 y que la serina en 50 de Mkk2 es una diana directa de esta fosforilación. Sin embargo, Mkk2 es fosforilada en otros residuos adicionales que, aunque diferentes de los residuos consenso de fosforilación por MAPK, (S/T)-P, dependen también de Slt2. Se ha caracterizado un dominio D (*Docking*) de interacción con MAPKs en el extremo N-terminal de Mkk2,

esencial para su interacción con Slt2 y para la retrofosforilación. Nuestros datos demuestran que las MAPKKs de la ruta de integridad celular son sustratos de su MAPK, sugiriendo la existencia de un complejo mecanismo de regulación por retroalimentación a este nivel.

El bucle microbiano en las lagunas someras esteparias de Castilla y León: importancia ecológica e influencia de la eutrofización

Ana Conty Fernández

Director: **Eloy Bécares Mantecón**

Área de Ecología, Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental, Universidad de León

Esta tesis aborda el estudio del bucle microbiano en lagunas someras esteparias de Castilla y León. El objetivo fue estudiar como influye la eutrofización así como el porcentaje del volumen de la laguna ocupado por macrofitos sumergidos (PVI) en la estructura de la red trófica microbiana (MFW) y en sus relaciones con el resto de organismos planctónicos. Para ello se seleccionaron 34 lagunas situadas en un amplio rango de valores de fósforo total (PT) y clorofila a planctónica (Cla). Los muestreos se realizaron en el verano de los años 2003 (34 lagunas) y 2004 (23 lagunas). El análisis de abundancia y biomasa de bacterias se realizó mediante tinción DAPI y análisis de imagen, y el análisis de la comunidad se efectuó mediante CARD-FISH. La cuantificación de flagelados heterótrofos (HNF) se realizó mediante tinción con primulina y el análisis de ciliados mediante QPS. Los principales resultados de la tesis indican que: 1) La Cla es más importante que la concentración de PT al describir las variaciones de la biomasa de los componentes del MFW. 2) En las lagunas más eutrofizadas, la alta depredación de los protozoos sobre las bacterias no sólo controla su biomasa sino que parece contribuir al desarrollo de bacterias de mayor tamaño resistentes a la depredación. 3) Las variables que determinan la composición de la comunidad bacteriana dependen del estado trófico de las lagunas así como del PVI. Los ciliados y los cladóceros son los principales grupos depredadores que condicionan la estructura de la comunidad bacteriana. 4) Los HNF parecen estar controlados fundamentalmente por depredación por cladóceros en las lagunas menos eutróficas, mientras que las bacterias y la competencia con los ciliados serían las variables de control en las lagunas más eutróficas. 5) El PVI condiciona los efectos de la eutrofización sobre los valores de diversidad y riqueza de taxones de la comunidad de ciliados. 6) El valor de la pendiente de la recta de regresión entre la abundancia de ciliados y la Cla indica que en las lagunas someras analizadas existe una mayor abundancia de ciliados para una misma concentración de Cla con respecto a los lagos de latitudes mayores, hallándose valores más parecidos a los encontrados en lagos de zonas subtropicales. 7) Tanto en PVI como el estado trófico de las lagunas condiciona la estructura de la comunidad de ciliados, la cual se define fundamentalmente

por variables relacionadas con los recursos. La depredación, especialmente por cladóceros, parece tener importancia en la estructura de los tamaños de los ciliados. 8) Los cladóceros dominan la biomasa del zooplancton en las lagunas menos eutrofizadas, siendo responsables fundamentales en la estructura de las comunidades de ciliados, así como del control de las poblaciones de HNF. 9) Los protozoos, y de forma especial los ciliados, tienen su principal papel en ambos extremos del gradiente de Cla, y de forma especial en las lagunas más hipereutróficas donde llegan a suponer el hasta 70% de la biomasa del zooplancton. Dado el carácter somero y el uso agrícola-ganadero de su entorno, el papel de las bacterias y sus depredadores parece ser fundamental para la transferencia de materia orgánica y nutrientes inorgánicos hacia niveles tróficos superiores. Obviar su estudio en el análisis del plancton supone un sesgo importante en los resultados que se obtengan.

Application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of *Haemophilus parasuis*

Alexandre Olvera van der Stoep

Directora: **Virginia Aragón Fernández**
Centro de realización: *Centre de Recerca Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA.*
Centro de presentación: *Departament de biologia molecular i bioquímica.*

Haemophilus parasuis is the etiological agent of Glässer's disease, but this bacterium causes other clinical outcomes and can also be isolated from the upper respiratory tract of healthy pigs. Isolates of *H. parasuis* differ in phenotypic features (e.g. protein profiles, colony morphology or capsule production) and pathogenic capacity. Differences among strains have also been demonstrated at the genetic level. Several typing methods have been used to classify *H. parasuis* field strains, but they showed resolution or implementation problems. To overcome these limitations, different DNA sequence based techniques were evaluated. Consequently, the final goal of this study was to improve *H. parasuis* typing and examine the association of groups of strains with disease outcome.

In the first chapter of this work, a partial sequence from the heat shock protein 60 kDa (*hsp60*) gene was assessed as epidemiological marker in a single locus sequence typing (SLST). We compared enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR patterns, partial sequences of *hsp60* and 16S rRNA genes from 103 strains of *H. parasuis* and other related species. In the second chapter of this work, we developed a multilocus sequence typing (MLST) system using partial sequences of the house-keeping genes *mdh*, *6pgd*, *atpD*, *g3pd*, *frdB*, *infB* and *rpoB*. Eleven reference strains and 120 field strains were included in this latter study.

Our results showed that *hsp60* is a reliable marker for epidemiological studies in *H. parasuis*, and the analysis of its sequence is a better approach than fingerprinting methods. Surprisingly, the 16S rRNA gene showed enough

variability to be used, not only for species identification, but also for typing. Furthermore, the analysis of the *hsp60* and 16S rRNA sequences revealed the presence of a separated lineage of disease-associated strains. Both SLST and MLST studies indicated the occurrence of lateral gene transfer among *H. parasuis* and *Actinobacillus* strains invalidating the use of single gene approaches in the phylogenetic analysis of these species. MLST analysis revealed the existence of 6 clusters. When the clinical background of the isolates was examined, one cluster was statistically associated with nasal isolation, while another cluster was associated with isolation from lesions. The latter cluster was the same disease-associated cluster identified by *hsp60* and 16S rRNA gene analysis. Finally, although a freely recombining population structure was reported, two divergent branches were found when a neighbour-joining tree was constructed with the concatenated sequences. The latter, supports the results obtained by 16S rRNA gene sequencing and indicate that *H. parasuis* is more likely to have a cryptic speciation than a true panmictic population structure.

Diversidad microbiana de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba.

Félix Daniel Andueza Leal

Directoras: **Carmen De la Rosa y Angeles Mosso**
Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Se ha estudiado la diversidad microbiana de cinco manantiales de aguas mineromedicinales pertenecientes a los Balnearios de Serón, Sicilia y La Virgen, en la localidad de Jaraba (Zaragoza). Las muestras se tomaron durante las distintas estaciones del año, en un período de dos años. Con el fin de conocer la composición y características de la microbiota de interés sanitario y ecológico de estos manantiales, se han estudiado los microorganismos indicadores de calidad así como diferentes grupos microbianos que intervienen en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre. El número de microorganismos totales ha sido bajo, con valores entre $1 - 25 \times 10^4$ microorganismos por mL, estando la mayoría vivos (71 - 100 %), con un valor medio de 90 %. Se observó muy poca fluctuación estacional, lo que evidencia una población microbiana constante en el tiempo. El número de bacterias heterótrofas aerobias ha sido inferior a 14 ufc/mL, manteniéndose constante a lo largo de las estaciones del año. No se han detectado microorganismos de interés sanitario como: coliformes totales, coliformes fecales, enterococos, *Clostridium* sulfito reductores, *Salmonella*, *Legionella pneumophila* ni *Staphylococcus aureus*. El número de cepas de bacterias heterótrofas aisladas ha sido de 478 de la que se han identificado el 87 % que corresponden a bacterias Gram. negativas (66,1 %) y bacterias Gram positivas (33,9%). En las bacterias Gram negativas han predominado las Gammaproteobacterias (45,7 %) Los géneros principalmente identificados han sido: de los bacilos Gram negativos, *Enterobacter* (34,7 %) y

Pseudomonas (29,5 %), de los cocos Gram positivos, *Staphylococcus* (66,2 %), y de los bacilos Gram positivos, *Cellulomonas* (8,3 %). La mayoría de los manantiales presentan una gran diversidad microbiana, excepto el manantial La Peña. En relación a los microorganismos de interés ecológico, los más abundantes han sido los amonificantes (media anual: 42 -296 NMP/100 mL), seguidos de los amilolíticos (media anual: 8,2 - 100,9 NMP/100 mL,) y proteolíticos (media anual: 11 - 61 NMP/100 mL). Los celulolíticos se han detectado en número muy bajo (media anual: 0,7 - 20 NMP/mL). No se han detectado bacterias sulfato-reductoras. Las bacterias halófilas se han detectado en número muy bajo, con un promedio anual entre 1 y 5,8 ufc por 100 mL de agua. Se han identificado como pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Photobacterium*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Se han encontrado mohos en todos los manantiales en número bajo, con un valor medio anual entre 0,8 - 5 ufc/100 mL. Los principales géneros aislados son *Penicillium*, y *Cladosporium*. No se han detectado actinomicetos en ningún manantial. Se encontraron algas y cianobacterias en los manantiales San Vicente y San José, donde se aislaron en otoño cianobacterias del género *Synechocystis* y algas verdes del género *Chlorococcum*. En los depósitos calcáreos formados en los manantiales se han observado microorganismos endolíticos, pertenecientes a cianobacterias esféricas (*Synechocystis* y *Chroococcus*) y filamentosas (*Anabaena* y *Lyngbya*).

Estudio de CaCwt1 de *Candida albicans* homólogo al factor de transcripción Rds2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Inmaculada Moreno Gimeno

Directores: **Eulogio Valentín Gómez, Rafael Sentandreu Ramon y Luis Carlos Castillo Barahona**
Centro de Realización: *Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia.*
Centro de Presentación: *Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.*

Candida albicans es el principal hongo patógeno en el ser humano, principalmente en pacientes en los que su sistema inmunitario está comprometido. En la actualidad la candidiasis invasiva es la causa más común de infecciones nosocomiales, asociada a una mortalidad del 40%. *C. albicans* es un hongo polimórfico que presenta la facultad de crecer como levadura, hifa y pseudohifa.

Uno de los aspectos por los que *C. albicans* puede comportarse como comensal o como agente patógeno es su capacidad para responder a los cambios del medio ambiente. Para comprender los mecanismos de adaptación en hongos patógenos a los cambios ambientales continuos dentro del ser humano, es especialmente importante que factores transcripcionales y/o mediadores estén implicados.

Mediante un análisis *in silico* del genoma de *C. albicans*, se han detectado 70 teóricos facto-

res transcripcionales de la familia Zn(II)₂Cys₆. Uno de ellos, IPF3781 (a partir de aquí Cwt1), se eligió para su estudio dada la elevada homología que presenta con el factor de transcripción Rds2 de *Saccharomyces cerevisiae*. El análisis fenotípico del mutante nulo *cwt1/cwt1* indica que Cwt1 está implicado en la arquitectura de la pared celular de *C. albicans*, así como en la morfogénesis de esta levadura, sobre todo en medios sólidos. Adicionalmente a los estudios sobre pared celular realizados, se ha estudiado la expresión y regulación, mediante micromatrices de ADN, de diferentes genes en las fases exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento con el fin de poder elucidar más fehacientemente el papel de Cwt1. Un total de 460 genes en fase exponencial y 666 genes en fase estacionaria tenían alterada su expresión, de los que 121 genes eran comunes a ambas fases de crecimiento de la levadura. Este distinto perfil transcripcional podría explicar el pleiotropismo encontrado en el mutante nulo *cwt1/cwt1*. El estudio *in silico* de las regiones promotoras de los genes cuya expresión estaba alterada indica que las secuencias AGGGCT/AGCCCT podría ser la secuencia de unión de Cwt1 a ADN.

Cabe señalar que gran parte del estudio realizado versa sobre la pared celular, dada la importancia que esta estructura tiene en los primeros pasos de una infección, así como para el diseño de nuevos fármacos antifúngicos.

Detección molecular de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo. Estudio de la diversidad genética y virulencia de cepas aisladas.

Jaime Navas Fernández

Directores: **Joaquín V. Martínez Suárez y Victoria López Alonso**

Centro de realización: **Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos.**

Centro de presentación: **Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria.**

Entre los factores importantes a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos cabe destacar:

- a) La elevada incidencia de *L. monocytogenes* en algunos alimentos (como los productos elaborados con carne picada de pollo), en los cuales suele estar presente, sin embargo, en números muy bajos.
- b) La dificultad del cultivo de las células de *L. monocytogenes* que pueden encontrarse dañadas debido al procesado de los alimentos.
- c) La presencia en un mismo alimento contaminado de cepas diferentes, que pueden tener diferente capacidad patogénica.

Teniendo en cuenta lo expuesto, el trabajo presentado en esta tesis doctoral consistió en:

1. Detectar en carne de pollo células de *L. monocytogenes* sometidas a tratamiento térmico y de altas presiones, comparando la detección mediante cultivo y PCR. Únicamente mediante la combinación de 24 horas de enri-

quecimiento selectivo y la detección por PCR fue posible lograr un nivel de sensibilidad próximo al de los métodos microbiológicos convencionales. La detección de células de *L. monocytogenes* dañadas subletalmente en carne de pollo procesada mediante altas presiones se logró empleando el medio cromogénico ALOA.

2. Analizar la contaminación natural por *L. monocytogenes* en productos comerciales elaborados con carne picada de pollo, empleando protocolos de enriquecimiento selectivo y PCR a tiempo real. Se encontraron muestras con resultados discrepantes entre ambos métodos de detección. El principal factor relacionado con la obtención de resultados negativos falsos por PCR fue el bajo número de células de *L. monocytogenes* presente en la muestra. La presencia de un número elevado de UFC de otras especies de *Listeria* se pudo relacionar con algunos resultados negativos falsos de la detección de *L. monocytogenes* por cultivo.

3. Estudiar la diversidad genética de cepas de *L. monocytogenes* aisladas a partir de productos frescos elaborados con carne de pollo. El análisis de los subtipos moleculares de 120 aislados mediante el estudio por PCR de los grupos de serotipos principales y la técnica de electroforesis en gel en campo pulsante, permitió diferenciar 11 pulsotipos o cepas (R1-R11).

4. Caracterizar la capacidad patogénica de un grupo de cepas genéticamente diferentes de *L. monocytogenes* aisladas de hamburguesas de pollo comerciales. La presencia de codones prematuros de parada en la secuencia del gen de la internalina A de tres de las cepas (R1, R8 y R10) (40% de los aislados) se relacionó con la ausencia de la proteína completa, así como con la escasa invasión de células humanas. La cepa R10 (4'4% de los aislados) fue la única que careció de actividad hemolítica y lecitinasas, fue incapaz de multiplicarse intracelularmente en células en cultivo, y fue avirulenta en ratones inmunocomprometidos. La secuenciación del gen del regulador central de la virulencia PrfA de la cepa R10 reveló la existencia de una inserción de 7 nucleótidos en el codón 171, mutación que permite explicar la pérdida de la capacidad patogénica en esta cepa de *L. monocytogenes* aislada de alimentos.

Estudio epidemiológico y caracterización genética del virus de la hepatitis E en explotaciones porcinas

M. Salceda Fernández-Barredo y del Amo

Directores: **María Teresa Pérez Gracia y Ángel García Muñoz**

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Cardenal Herrera-CEU.

This study describes the distribution of Hepatitis E virus (HEV) in a naturally infected swine population and the genetic relatedness of HEV strains on swine farms in Spain. Of fecal and serum samples collected from 191 pigs and manure-ditch samples collected from 21 farms, HEV was detected in 19%, 12%, and 38%, respectively, for an overall prevalence rate of 25%. The maximum prevalence rates for feces and serum

were in pigs 13 to 16 wk old. A high prevalence of the virus in feces (18%) was observed in sows. Gene sequencing was performed on 30 strains from feces, serum, and manure ditch: the nucleotide identities varied from 85% to 99% when compared with those of other strains of genotype 3 isolated from swine. This is the first study in Europe to show the variation in virus distribution by age in feces and serum in a naturally infected swine population.

Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas

María Esther Rodríguez Jiménez

Directores: **Jesús Manuel Cantoral Fernández y Laureana Rebordinos González.**

Laboratorio de Microbiología y Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz.

El empleo de cepas de levaduras autóctonas para producir vinos con propiedades organolépticas típicas de una región productora es una práctica que cada vez tiene más importancia en las bodegas. Hasta el año 2001, en una Bodega situada en el suroeste de España se realizaban las fermentaciones de un vino joven de la Tierra de Cádiz de forma espontánea. Dada la importancia comercial de este vino surgió la necesidad de controlar el proceso de fermentación mediante la selección de levaduras autóctonas y producir así un vino con propiedades sensoriales mejoradas.

Para este fin se llevó a cabo la caracterización genética de las cepas de levaduras implicadas en la fermentación espontánea del vino objeto de estudio mediante la utilización de la técnica molecular de Electroforesis en Campo Pulsante (PFGE), y tener así un conocimiento más amplio de las cepas de levaduras más representativas del proceso. Tras este estudio se preseleccionaron cuatro cepas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* de entre aquellas que mostraron los patrones moleculares o cariotipos electroforéticos más abundantes.

Posteriormente, se aplicaron algunos criterios de interés enológico como por ejemplo inhibición por etanol, poder fermentativo, factor "killer" y capacidad de implantación para seleccionar, de las cuatro cepas elegidas inicialmente, las más adecuadas para conducir las fermentaciones en condiciones industriales. Se seleccionaron por tanto 3 cepas con cariotipos P2, P3 y P5 para inocular las fermentaciones durante 5 años consecutivos. El seguimiento de las levaduras inoculadas se realizó mediante la técnica de PFGE, una vez finalizadas las vendimias, comprobándose que la cepa con patrón P5 fue la que predominó en las fermentaciones de tres de las vendimias estudiadas, obteniéndose en ellas un producto final con características organolépticas mejoradas con respecto al obtenido de las fermentaciones espontáneas.

A medida que se fueron obteniendo los resultados de las fermentaciones inoculadas y se mostró el comportamiento de las cepas de

levaduras seleccionadas en condiciones industriales fueron surgiendo nuevas cuestiones, como por ejemplo, si estas cepas se mantenían estables genéticamente durante las fermentaciones. Analizando la estabilidad del cariotipo de las levaduras seleccionadas se comprobó que la de patrón P5 era estable genéticamente. Por otro lado, ante la posibilidad de que, durante las fermentaciones inoculadas, la cepa seleccionada no fuera la conductora de la fermentación, fue necesario aplicar un método de control microbiológico que nos pusiera de manifiesto si la cepa inoculada era la que estaba llevando a cabo la fermentación o no. La técnica molecular del Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt) a muestras tomadas directamente del mosto fermentando sin necesidad de realizar aislamientos fue decisiva para este fin y tener un mayor control del proceso.

Respuesta inmunitaria protectora frente a *Candida albicans*. Análisis del transcriptoma, proteoma y tráfico intracelular tras su interacción con el macrófago.

Elena Fernández-Arenas Hervás

Directora: **Concha Gil García.**

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista capaz de causar varios procesos infecciosos que dependen del estado inmunitario del paciente (1). Especial importancia tiene la contribución de las respuestas innata (macrófagos) y adaptativa celular en la resolución de las candidiasis sistémicas (2), sin embargo, actualmente la contribución de la respuesta humoral está siendo reevaluada (3).

En un primer lugar se analizó el papel de los anticuerpos en la resolución de las candidiasis sistémicas utilizando un modelo murino de infección sistémica y diferentes cepas avirulentas del hongo, como posibles “cepas vacunales”. Con estos experimentos se demostró que no todas las cepas de baja virulencia presentan una capacidad para vacunar, indicando que la estimulación de una respuesta inmune protectora es debida a la expresión de determinados epítopos antigénicos dependientes del fondo genético de la cepa mutante empleada. Es más, ensayos de vacunación con el mutante de *C. albicans* de baja virulencia CNC13 se puso de relieve la importancia de la colaboración entre las respuestas inmunitarias celular y humoral en la inducción de una protección duradera.

En paralelo, mediante el empleo de técnicas proteómicas (2D-PAGE [geles bidimensionales] en combinación con “immunoblotting” y espectrometría de masas) se definió por primera vez un *inmunoma* protector de *C. albicans*. Algunas de estas proteínas antigénicas identificadas podrían ser posibles candidatos en el diseño de una futura vacuna o ser empleados como marcadores de diagnóstico (4, 5).

Para entender mejor la compleja interacción entre *Candida* y el hospedador, se estudió la respuesta del hongo tras su interacción con el

macrófago. Para ello se puso a punto a) un modelo *in vitro* de fagocitosis, b) un método de tinción diferencial para poder distinguir entre levaduras internalizadas y no-internalizadas, y c) un protocolo de enriquecimiento en las levaduras fagocitadas. En dicha muestra se realizó por primera vez un análisis conjunto del transcriptoma y del proteoma de *Candida* y así obtener una visión global e integrada de los estadios iniciales del proceso infeccioso. Mediante la integración de los datos genómicos y proteómicos junto con el empleo de herramientas bioinformáticas (redes de interacción):

-hemos descrito como diferentes procesos biológicos (metabolismo y energía, defensa frente a estrés oxidativo y morfogénesis y diferenciación celular) modulan su expresión, en un intento de adaptación de la levadura al entorno hostil que la rodea (el fagosoma).

-además, hemos formulado por primera vez un modelo hipotético de muerte celular por apoptosis de *Candida* tras interaccionar con el macrófago, poniendo de relieve la interconexión entre el citoesqueleto de actina, la mitocondria y la autofagia en la regulación de dicho proceso (6).

Por último, y con objeto de profundizar en el estudio de la interacción *Candida*-macrófago (comentado previamente), e investigar el papel de diferentes factores de virulencia en el proceso de maduración del fagosoma, realizamos un estudio comparativo del tráfico intracelular de dos cepas (virulenta/avirulenta) de *C. albicans* mediante microscopía confocal. Dicho estudio nos permitió definir:

-mecanismos de supervivencia comunes a ambas cepas relacionados con el proceso de maduración del fagosoma (bloqueo de la acidificación e inhibición de la síntesis de óxido nítrico).

-mecanismos de supervivencia específicos de la cepa virulenta ligados a su capacidad de filamentación (rotura de la membrana fagosomal y plasmática del macrófago) y de bloqueo de la fusión del fagosoma con el lisosoma (Fernández-Arenas E. et al., enviado).

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Pfaller, M.A. and Yu, W.L. (2001). *Infect. Dis. Clin. North Am.* 15, 1227-1261.
- (2) Romani, L. (1999). *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 363-367.
- (3) Cassone, A., et al., (2005). *Curr. Mol. Med.* 5, 377-382.
- (4) Fernández-Arenas, E., et al., (2004). *Proteomics* 4 (10), 1204-1215.
- (5) Fernández-Arenas, E., et al., (2004). *Proteomics* 4 (10), 3007-20.
- (6) Fernández-Arenas, E., et al., (2007). *Mol. Cell. Proteomics* 6, (3) 460-478.

Factores de virulencia y patogénesis de *Vibrio vulnificus* biotipo 2 serovar E

Esmeralda Valiente Conejero

Directores: **Carmen Amaro González**

y **Jesús Lamas Fernández**

Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia.

Vibrio vulnificus biotipo 2 comprende las cepas de *Vibrio vulnificus* capaces de causar vibriosis en peces. En los últimos años, se han realizado avances importantes en el conocimiento de la biología de este patógeno, sin embargo, no se han estudiado los factores de virulencia importantes en la patogénesis de la

vibriosis producida por esta bacteria. En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado el papel del plásmido pR99, recientemente descrito, y el de factores de virulencia seleccionados, la cápsula, el LPS y la metaloproteasa Vvp en la patogénesis de la vibriosis causada por este patógeno. Para ello se ha obtenido una cepa deficiente en el plásmido pR99, así como cepas deficientes en cada uno de los factores y se han comparado con la cepa parental en ensayos de virulencia así como de colonización y de resistencia a las defensas innatas de la anguila.

Hemos demostrado que la metaloproteasa en *V. vulnificus* biotipo 2 es un factor de colonización que media quimiotaxis hacia el moco que recubre la agalla, probablemente al unirse a mucina y degradarla. Los estudios histopatológicos realizados con el mutante en metaloproteasa nos indican que esta proteína no tiene ningún papel en la producción de hemorragias. El antígeno-O tiene un papel en el establecimiento de agrupaciones bacterianas en la superficie de las agallas que, al estar recubiertas de moco, resistirán mejor las condiciones adversas. En contraposición, la cápsula no tiene un papel tan claro en la colonización de la superficie externa. Ambas estructuras de naturaleza polisacáridica son muy importantes en el proceso de colonización del medio interno. Con respecto al plásmido, éste codifica para un sistema de resistencia a los mecanismos de inmunidad innata que es específico de hospedador.

También, hemos demostrado que *Vibrio vulnificus* produce autoinductores del tipo acil-homoserinas lactonas (AHL) implicados en el sistema de *quorum sensing*. Estos compuestos se producen cuando se simulaban las condiciones de supervivencia en el medio natural y se sobreexpresan añadiendo compuestos de la sangre que la bacteria puede utilizar como fuente de hierro para crecer, pudiendo tener un papel en la virulencia. Los intentos por demostrar la base genética para la producción de AHL en la especie fueron infructuosos, aunque los resultados sugieren que podrían radicar en genes completamente nuevos. Finalmente demostramos que todos los biotipos pueden producir AI-2, detectando en ellos el gen *luxS*. El árbol construido a partir de las secuencias reportadas en varias especies de vibrios para este gen reconstruye el árbol filogenético de los vibrios lo que sugiere que puede tratarse de un gen ancestral conservado a nivel de especie.

El patógeno causa una vibriosis que se diferencia de la vibriosis clásica en que la sintomatología está asociada a muy pocas bacterias. Ésta consiste en hemorragias externas e internas. Los síntomas principales de esta vibriosis pueden ser simulados inyectando los productos extracelulares, lo que sugiere que los factores tóxicos que produce la bacteria durante su crecimiento *in vivo* están presentes en los productos extracelulares y que no se requiere de la bacteria viva para simular el proceso infeccioso.

Con el objeto de detectar portadores sanos y disminuir el riesgo para el consumidor que la presencia de una bacteria zoonótica puede suponer en el pescado, hemos puesto a punto un método de detección que no requiere el sacrificio del animal.

En conclusión, los factores de virulencia estudiados juegan un papel importante en la virulencia de *V. vulnificus* biotipo 2 serovar E.

Este patógeno desarrolla diversas estrategias para la invasión de su hospedador generando fuertes hemorragias en los tejidos. Un método de detección rápido y eficaz que no requiere el sacrificio del animal supone un gran avance para la lucha frente a este patógeno en anguicultura.

Glicoproteínas y viabilidad celular en *Campylobacter jejuni*. Relación del proceso de glicosilación con el proceso de supervivencia

Cecilia Girbau Iturralde

Directores: **Aurora Fernández-Astorga** y **Rodrigo Alonso Monsalve**

Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

Campylobacter jejuni está considerado como una de las principales causas de gastroenteritis de origen microbiano en humanos. Bajo condiciones ambientales adversas, como la limitación nutricional o las bajas temperaturas, *C. jejuni* es capaz de entrar en el estado viable no cultivable (VNC) como estrategia de supervivencia. Bajo este estado pierde la capacidad de crecer en los medios de cultivo no selectivos en los que normalmente crece pero mantiene actividad metabólica detectable. Además del interés científico intrínseco, el estudio del estado VNC cobra interés a la hora de valorar sus repercusiones en salud pública.

Durante mucho tiempo la glicosilación proteica ha sido considerada un fenómeno específicamente eucariota, sin embargo en la actualidad la existencia de glicoproteínas procariontas es un hecho firmemente establecido. *C. jejuni* posee dos sistemas de glicosilación proteica: el sistema de glicosilación de la flagelina y el sistema de glicosilación general o N-glicosilación, en la que se centra este trabajo.

Los genes responsables de la N-glicosilación están englobados en el locus genético *pgl*. El enzima clave de este sistema de glicosilación es la proteína PglB, que probablemente actúe como una oligosacárido transferasa responsable de la transferencia del azúcar a la cadena peptídica.

Está demostrado que la lectina SBA se une específicamente a los residuos N-acetilgalactosamina de las N-glicoproteínas de *C. jejuni*. Este hecho ha permitido elaborar útiles herramientas para la purificación de N-glicoproteínas.

El objetivo global de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar la relación existente entre la N-glicosilación y la supervivencia de *C. jejuni* en condiciones adversas de nutrientes y baja temperatura.

Para la consecución de este objetivo se construyó una cepa de *C. jejuni* con el gen *pglB* inactivado por la inserción de un casete de resistencia a kanamicina. Posteriormente se estudiaron los efectos derivados de dicha inactivación sobre el crecimiento y la capacidad de supervivencia de la cepa mutante y de su homóloga salvaje. Mientras que la inactivación del gen *pglB* no afectó a los parámetros de crecimiento de la cepa mutante, sí afectó negativamente a su capacidad de supervivencia, acortando el tiempo

promedio de entrada en el estado VNC. Estos resultados son, por tanto, indicativos de la implicación de la N-glicosilación proteica en la supervivencia de *C. jejuni*.

Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue la caracterización del glicoproteoma de *C. jejuni* mediante el análisis comparativo de los perfiles de glicoproteínas reactivas frente a la lectina SBA, así como la identificación de glicoproteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en células cultivables y viables no cultivables.

El estudio comparativo de los perfiles de glicoproteínas puso de manifiesto una clara disminución de la capacidad de glicosilar proteínas en la cepa mutante, confirmando la implicación del gen *pglB* en el proceso de N-glicosilación. La ausencia de glicosilación en la cepa mutante de ciertas proteínas como serin-proteasa HtrA, SucD o PEB3, sí glicosiladas en la cepa salvaje, justificaría la menor capacidad de supervivencia de la cepa mutante. De este modo, se establece una relación entre la N-glicosilación proteica y la supervivencia bajo condiciones adversas de nutrientes y baja temperatura en *C. jejuni*.

La identificación de las proteínas ADK, DnaK, CheW, PEB4, Ycel, RibH, serin-proteasa HtrA y SucD, no descritas hasta este trabajo como N-glicoproteínas de *C. jejuni*, contribuye a la ampliación del conocimiento del glicoproteoma de este organismo, poniendo a su vez de manifiesto la necesidad futura de un estudio más pormenorizado en el campo de la N-glicosilación.

Estudio de la lisogenia doble de fagos-STX2

Ruth Serra Moreno

Directores: **Joan Jofre Torroella** y **Maita Muniesa Pérez**
Universitat de Barcelona.

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es agente causal de enfermedades como la colitis hemorrágica, el Síndrome de Uremia Hemolítica y la Púrpura Trombótica Trombocitopénica.

Su principal reservorio es el ganado de vacuno y la vía de transmisión al hombre es por consumo de alimentos contaminados o mal cocinados.

El principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga. Estructuralmente es similar a la que expresa *Shigella dysenteriae* serotipo I. Esta toxina se encuentra codificada en el genoma de fagos de tipo lambdaoide, que se establecen como profagos en STEC (fagos-stx) y se expresa tras la activación del ciclo lítico.

Cierto porcentaje de las STEC aisladas de medio ambiente y/o de alimentos es portador de más de un profago-stx en su genoma, lo que hace necesario el estudio de la doble lisogenia en estas cepas, así como posibles interacciones entre estos fagos y sus repercusiones en la patogenicidad.

Por este motivo los objetivos de la tesis doctoral fueron:

1. Caracterizar fagos-stx de origen animal atendiendo a su morfología, tamaño del genoma, patrón RFLP, secuencia del gen *stx*, espectro de huéspedes y capacidad de conversión lisogéni-

ca en cepas de laboratorio. Los resultados muestran heterogeneidad de los fagos analizados, si bien el gen *stx* estaba muy conservado (Muniesa et al., 2004. Microbiol).

2. Obtención de fagos-stx recombinantes, a los que se les introdujo un gen de resistencia a antibiótico que permitiera la mejor selección de lisógenos y que a su vez pudiera hacer distinguible un fago-stx de otro (recombinante). (Serra-Moreno et al., 2006. BMC Mol. Biol.)

3. Estudio de la lisogenia doble de fagos-stx. A partir de este conjunto de fagos pudimos realizar experimentos de conversión lisogénica en los que seleccionamos la presencia del fago recombinante. Nuestros resultados muestran que en la mayoría de los casos la incorporación del segundo profago está más favorecida que si éste mismo se incorporara en la misma cepa, pero sin el primer profago. Con una frecuencia similar se observó la sustitución del primer fago-stx por el segundo. Y en sólo tres casos de ochenta la incorporación del fago recombinante en la cepa sin profago-stx fue superior. Esto nos indicó que, existía algún tipo de interacción génica entre los dos profagos que facilitaba la inserción del segundo (en los casos en que la doble lisogenia era favorecida). Los análisis posteriores de mutagénesis dirigida demostraron que el gen *cl* del primer profago está implicado en esta función. Su eliminación implicaba la no generación de dobles lisógenos mientras que su complementación restituía los valores iniciales. Además se observó que los dobles lisógenos tienen una tasa menor de inducción del ciclo lítico, lo que supone una menor producción de partículas víricas y de toxina Shiga, tal y como mostraron nuestros análisis. (Serra-Moreno et al., 2008. J. Bacteriol. en revisión).

4. Lugares de inserción ocupados por los fagos-stx. Se analizaron los lugares de inserción ocupados por los fagos caracterizados en sus cepas de origen STEC y en distintas cepas de laboratorio. Se observó que podían ocupar *loci* diferentes dependiendo de la cepa, el mismo hecho se repetía en el caso de los dobles lisógenos. En este caso si dos profagos solían ocupar el mismo *loci* (en sus respectivos lisógenos simples), en el lisógeno doble uno de los fagos pasaba a ocupar un *loci* secundario. Experimentos de mutagénesis en los que se eliminó uno de los lugares preferentes de inserción demostraron que, independientemente del tipo de tirosin recombinasa que posea el fago, éste se integra en un *loci* determinado dependiendo de su disponibilidad y accesibilidad en la cepa huésped (Serra-Moreno et al., 2007. J. Bacteriol)

Las conclusiones que de este trabajo se derivan es que la presencia de dos profagos en el genoma de STEC es un hecho frecuente y que puede ser un elemento de diversificación en estas cepas, puesto que al disminuir su capacidad de inducción del ciclo lítico disminuye la expresión de la toxina y por tanto su patogenicidad, pero al mismo tiempo mantienen el carácter *stx*, que de otra manera la expresión de la toxina implica en última instancia la muerte bacteriana. Por tanto la doble lisogenia podría actuar como un primer paso para la incorporación del nuevo material genético, lo que puede aumentar la eficacia biológica de la cepa a corto plazo.

El genoma sintético de la *factoría Venter*



Víctor de Lorenzo
Centro Nacional de Biotecnología, Madrid

Hay mucho de nuevo pero también algo de chocante en la muy pregonada síntesis química en la *factoría Venter* de un genoma microbiano funcional¹. Desde un punto de vista tecnológico es una proeza digna del libro Guinness: la secuencia de ADN más larga jamás ensamblada artificialmente, más de 558 kbp. Las técnicas asociadas al proceso (sobre todo el maridaje de segmentos de DNA primero en BACs y luego en levaduras) son extraordinariamente creativas. Y ciertamente se abre la puerta a la síntesis rutinaria de largas secuencias de DNA, algo que revolucionará a la Biología Molecular y la Biotecnología –empantanada desde hace 30 años en el problema de las ligaciones ineficientes de ADN. Pero esta no es la primera vez que se sintetiza un genoma. El mismo grupo había ya publicado en 2003² (sí bien con una fanfarria en los medios mucho menor) la manufactura completa del genoma del bacteriófago Φ X174, de un tamaño casi 100 veces menor que el de *Mycoplasma genitalium*. Así que el gran salto adelante es verdaderamente impresionante. La visibilidad conseguida por el flamante genoma sintético ha sido también un éxito de *marketing* que sin duda atraerá nuevos inversores a *Synthetic Genomics*, la empresa que Venter creó hace unos años para capitalizar este trabajo. Hasta aquí todo bien, aunque no deja de sorprender que varios medios hayan difundido la idea de que a partir del genoma sintético solucionaremos todos los problemas energéticos y medioambientales. Por supuesto, estas expectativas no se mencionan como tal en el trabajo publicado en *Science*, pero lo cierto es que la *factoría Venter* las ha popularizado a los cuatro vientos a través de una bien organizada campaña de prensa.

Pero ¿cuál es el significado científico de esta publicación? Lo dicho: *técnicamente*, este trabajo es una proeza. Pero paradójicamente, su relevancia científica es prácticamente nula. Un sistema vivo tiene al menos tres componentes: un programa, una codificación material de ese programa y una maquinaria que lee y ejecuta ese programa. En esto, las células son una clase particular de la *máquina de Turing*, en la que se basan los ordenadores. Una publicación previa del mismo equipo, que presentaba un método para transplantar un cromosoma de una especie a otra³ tiene una trascendencia mucho mayor. Este trabajo demostró *formalmente* que se pueden disociar las instrucciones codificadas en el ADN de la maquinaria que las interpreta. Lo que la *factoría Venter* ha hecho ahora es copiar fielmente las instrucciones y el código (sin saber

muy bien como funciona el programa....) y utilizar la maquinaria lectora proporcionada por una célula viva preexistente. La noción de que con este trabajo se ha sintetizado una bacteria viva en el laboratorio es una exageración estrepitosa. Es como si perforáramos manualmente una de las antiguas tarjetas de programación usando como molde una que ya estaba perforada. Seguro que la tarjeta copiada funciona como la original pero... ¿podemos argumentar que hemos creado un ordenador? No sabemos ahora más sobre la Biología de los Microorganismos, ni sobre el Origen de la Vida ni sobre los genomas mínimos ni sobre la reprogramación de redes biológicas... ni siquiera están aún a la vista las aplicaciones biotecnológicas tan publicitadas.

Tarde o temprano se creará vida en un tubo de ensayo, pero ni estos experimentos lo han hecho aún ni se sabe todavía lo suficiente para lograrlo. La secuencia de los genomas nos proporciona un catálogo completo de todos los componentes de la célula, una especie de *dramatis personae*. También conocemos algunas de las frases del texto e incluso varios episodios del drama. Pero aun falta entender el guión completo y poder escribir otros argumentos con los mismos o con distintos personajes. Tal y como insiste Antonie Danchin en su extraordinario libro *The Delphic boat*⁴, lo que define a los sistemas vivos no son sus componentes, sino la *relación* entre sus componentes. Esto no se deduce automáticamente de las secuencias, aunque debe estar también codificado en ellas. El gran reto es entender el mapa y la *coreografía* de los elementos de la célula que están sobreimpuestos a la secuencia del genoma. Es este mapa el que evita que choquen todas las bailarinas por el camino. Para crear *vida sintética* (e insisto que lo veremos en un futuro no muy lejano) se necesita comprender no sólo las partes y funciones básicas de los sistemas vivos (a lo que se ha dedicado la *Biología Molecular* en los últimos 50 años), sino también las conexiones entre esas partes (algo que la *Biología de Sistemas* está intentando en la actualidad), para finalmente crear algo que antes no existía (como lo pretende la *Biología Sintética*).

Hay un detalle en esta publicación que, curiosamente, ha pasado desapercibido en las noticias que se han dado sobre ella. Y es que los Autores del genoma sintético han

firmado su obra tomando las abreviaturas de una letra de los aminoácidos (C: cisteína, R, arginina, A: alanina etc) e insertando las correspondientes secuencias de ADN en el cromosoma artificial⁵. Quizá, como antes le ocurrió a Watson y a Mullis, el personaje Venter empieza a prevalecer sobre el científico Venter. ¡ Esos nombres impresos en el genoma me recuerdan mucho más a las marcas con las que los vaqueros hierran las reses de su propiedad, que a las firmas que ponen los artistas en sus cuadros !

Cine y microbiología

En las lecciones introductorias del programa de Microbiología, se suele explicar como la invisibilidad al ojo humano constituye el carácter esencial de los microorganismos. Por tanto, para su observación, el microbiólogo necesita disponer de instrumentos ópticos de precisión. Fiel a este rasgo definitorio, la presencia subliminal del mundo microbiano resulta palpable –particularmente en su papel como agentes etiológicos de enfermedades infecciosas- en las múltiples facetas de la creatividad humana, desde el arte a la literatura pasando por la música o el cine. Por restricciones de espacio, mencionaremos como botón algunas muestras de esta, inaparente pero fundamental, contribución microbiológica al denominado Séptimo Arte.

El bacilo endoesporulado histotóxico *Clostridium perfringens* debiera haber figurado en los créditos de numerosas películas, incluyendo la inmortal epopeya “Lo que el viento se llevó”. En una escena cumbre, Scarlett O’hara, la seductora y coqueta protagonista que trabaja como enfermera voluntaria por la causa confederada, abandona espantada el hospital, incapaz de contemplar la amputación de una pierna necrosada por la gangrena gaseosa debida al anaerobio estricto; mientras se oye de fondo las voces del médico reclamando su presencia y los aullidos del soldado pidiendo que no le corten la pierna.

Desde las plagas bíblicas (*Los diez mandamientos*, *Sinhué el egipcio*), hasta las actuales epidemias víricas (*Estallido*, *Virus*), el cine ha prestado gran atención a las consecuencias catastróficas generadas por la expansión de las infecciones, soslayando su etiología microbiana. *Mycobacterium leprae*, el bacilo de Hansen, no fue nominado al oscar secundario por *Ben Hur*, otro título inolvidable. Recordemos como la madre y la hermana del recientemente desaparecido Charlton Heston, contraen la lepra al cabo de varios años encarceladas en las mazmorras romanas como cruel represalia del pérfido Messala. Cumpliendo el código de Moisés de aislar a los infectados de la población sana, las dos mujeres son confinadas a un valle cerrado destinado a los leprosos. La naturaleza transmisible de la lepra y el pavor al contagio se reflejan en la escena donde Ben Hur, buscando su curación milagrosa,

Referencias

- ¹Gibson DG y cols. 2008. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, DOI: 10.1126/science.1151721
- ²Smith HO, Hutchison CA, Pfannkoch C y Venter JC. 2003. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: FX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci* 100: 15440-15445.
- ³Lartigue C y cols. 2007. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 317: 632-638.
- ⁴Danchin, A y Quayle, A 2003. *The Delphic Boat: what genomes tell us*. Harvard University Press.
- ⁵DNA signature. Comentario en *New Scientist* del 2 de febrero de 2008 (página 4).

Juan Carlos Argüelles

Área de Microbiología, Universidad de Murcia

las lleva a presencia de Jesús camino de la cruz. Dan limosna a un ciego que les orienta, pero éste al escuchar el grito de “¡leprosas!” tira la moneda del cuenco. La estigmatización social de las enfermedades microbianas y su impacto en la vida personal y laboral de los pacientes, ha recibido un amplio tratamiento cinematográfico, acentuado desde la irrupción de la pandemia de SIDA. La totémica “*Philadelphia*” es un ejemplo representativo.

La enterobacteria *Yersinia pestis* ocupa una posición estelar entre las estrellas microbiológicas al servicio del cine. El agente causal de la peste bubónica transmitida al hombre desde las ratas por medio de las pulgas como insecto vector, ha protagonizado multitud de películas. En la espléndida “*El séptimo sello*” un caballero feudal (Max von Sydow) regresa de Las Cruzadas; atormentado por la búsqueda de Dios y las dudas existenciales. Queriendo dar sentido a su vida, el caballero se disputa con la Muerte, en una partida de ajedrez, las vidas de una población devastada por la peste negra, denominación de la terrible pandemia que asoló Europa a mediados del siglo XIV, diezmado un tercio de su población y provocando graves disturbios sociales. Por cierto, en el film aparecen “los flagelantes”, movimiento medieval que preconizaba el castigo corporal y la recreación de la pasión como medio de purificación para evitar el contagio de la peste por *Y. pestis*. El Papa Clemente VI los declaró herejes.

El brote de cólera causado por *Vibrio cholerae*, el vibrión Gram negativo, anaerobio facultativo, sirve de trasfondo argumental en “*Muerte en Venecia*”. Esta delicada alegoría visual sobre la belleza, retrata con singular maestría el fracaso y la delicada sensibilidad del personaje central –basado en Gustav Mahler y bordado en la interpretación por Dirk Bogarde-, que se siente renacer al enamorarse platónicamente de un hermoso adolescente de facciones turbadoras, con quién no intercambiará jamás una sola palabra. Sin oponer resistencia al avance del cólera, el protagonista contempla su decadencia física irreversible en paralelo con el deterioro de la propia ciudad de los canales. La música de Mahler y la cuidada fotografía –e indirectamente también los organismos microscópicos- constituyen el complemento perfecto para esta obra de culto.

Juan Marcilla

Presidente fundador de la SEM

Alfonso V. Carrascosa Santiago

Departamento de Microbiología
Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC

Juan Marcilla Arrazola (1886-1950) fue el primer presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, fundada en 1946, que con el paso del tiempo terminaría denominándose Sociedad Española de Microbiología. Probablemente para muchos microbiólogos de la SEM, Marcilla sea un perfecto desconocido, por lo que tal vez este artículo pueda resultar ilustrativo.

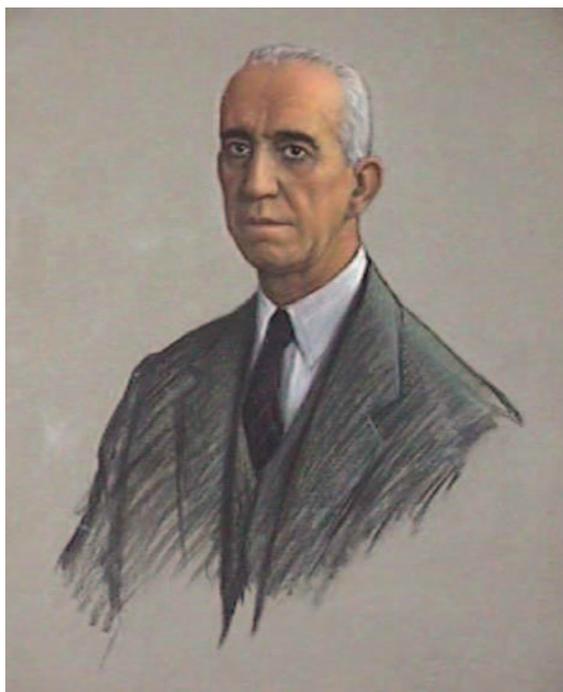
MARCILLA Y LA VITIVINICULTURA

Marcilla nació 29 años después de que Pasteur escribiese su *Mémoire sur la fermentation alcoolique*, en la que describía cómo la causante de la fermentación vínica era la levadura. Con toda seguridad, Marcilla es la figura más relevante de la vitivinicultura española de la primera mitad del siglo XX. Juan Marcilla Arrazola nació en Madrid el 27 de diciembre de 1886. Único varón de cinco hermanos, quedó huérfano a los 14 años. Hubo de costearse sus estudios, incluida la carrera de piano, con el sobre esfuerzo añadido de dar clases particulares de matemáticas. Culminó brillantemente su formación académica como Ingeniero Agrónomo en 1910, conquistando el nº 1 de su promoción.

Inmediatamente su vida profesional se orientó hacia la vitivinicultura, trasladándose a la Estación Enológica de Villafranca del Penedés. Y es que el sector vitivinícola atra-

vesaba una profunda crisis, relacionada con la ocupación francesa, de cuya finalización se cumplen ahora precisamente dos siglos.

Hundido por las guerras napoleónicas, el sector vitivinícola español fue recuperándose lentamente. Pero casualidades de la historia, la aparición del oidio y, sobre todo, de la filoxera, hundió el sector en Francia, y esto ocasionó un aumento de la demanda exterior muy grande, entre 1860-1870, lo que permitió soñar con hacer de España “la bodega del mundo” (Pan Montojo, 1994). Primando la cantidad sobre la calidad, poco se pensó en cuestiones técnicas o en renovación de instalaciones, y mucho menos en investigación, hasta que la filoxera llegó a España y la demanda exterior disminuyó. El refuerzo químico de la producción, iniciado en 1860, y una tímida renovación técnica que condujo a la diversificación de producto,



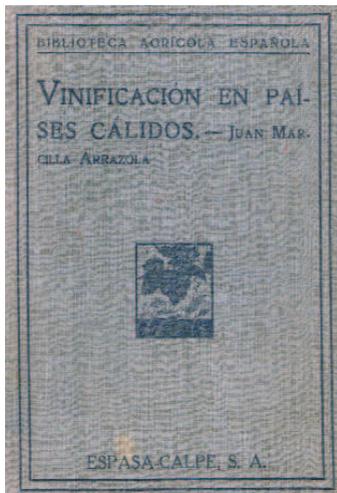
con el desarrollo de la industria del brandy en Jerez, y del champán en Cataluña, fueron los únicos avances tecnológicos destacables de la época.

El equilibrio no se recuperó hasta la primera década del siglo XX. Al final de la Restauración se comenzó a practicar una política agraria que promovió, entre otras cosas, la

vertebración asociativa. Poco a poco la producción de cantidad se vio fortalecida por el inicio de la producción de calidad, y la llegada de los conocimientos de la moderna microbiología, que había nacido en Francia de la mano del químico Louis Pasteur, fue fundamental para que con ella comenzase el desarrollo de la microbiotecnología alimentaria española. Todo esto ocurrió de la mano del genial Juan Marcilla, con quien surge la microbiología enológica española como disciplina de investigación científica y asignatura docente universitaria, y con quien se propaga el concepto de pie de cuba y sus limitaciones, como a continuación veremos.

Decía que la llegada de la filoxera a nuestro país hizo surgir la necesidad de reconversión del sector, en la que cobran protagonismo las estaciones enológicas junto con los servicios vitícolas y, como vamos a ver, juega un papel crucial nuestro personaje.

En 1915, y tras haber realizado una estancia en el extranjero, concretamente en la Estación Vitivinícola de Montpellier, fue destinado a la Estación Ampelográfica Central de Madrid, en la que se habían centralizado los antiguos Servicios Vitícolas. En esta etapa se especializó en la lucha contra la filoxera, necesidad acuciante del sector, mediante el empleo de portainjertos americanos. Este período de formación académica y profesional lo culminaría escribiendo dos de sus obras fundamentales *Vinificación en países cálidos* y *Química, viticultura y enología*, ambas publicadas en 1922, y en las que se incluían sus ya entonces abundantes conocimientos sobre microbiología enológica.



Pabellón central de la nueva ETSI Agrónomos, finalizado en 1925 (Archivo ETSI Agrónomos).

MARCILLA PROFESOR

En 1924 ganó por concurso-oposición la Cátedra de Viticultura y Enología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid. Por iniciativa suya se creó en 1928 la Cátedra de Microbiología Agrícola, que resultaba ser la tercera a nivel nacional dedicada a esa disciplina y la primera que abordaba la microbiología de productos vegetales, y de la cual fue catedrático hasta su muerte. Se consolidaría a partir de aquí su etapa formativa y docente junto a su vocación científica, que dedicaría a la microbiología enológica.

Conjugó como pocos coetáneos sus tareas docentes y profesionales ya que, además de las clases en la Escuela, promovió la formación de cooperativas vitivinícolas, la construcción de modernas bodegas (Cintruénigo, Peñafiel, La Seca, Arganda, Alcázar de San Juan, Santa María de los Llanos, Aranda de Duero...) y la impartición de un sinnúmero de cursos de capacitación agraria en los que cobró una importancia creciente la transmisión de conocimientos en microbiología enológica. En parte por su actividad de capacitación, en parte por su esfuerzo y apoyo a la reinjertación del viñedo filoxerado, y en parte también por sus profundas convicciones católicas, fue considerado un auténtico apóstol en la profesión.



Juan Marcilla. Defectos, alteraciones y enfermedades de los vinos. (1930). Servicio de Capacitación y Propaganda del Ministerio de Agricultura. Madrid.

MARCILLA Y LA JAE

Por estos años comenzó sus investigaciones científicas sobre la microbiología de los vinos generosos de Andalucía Occidental, centrandose su atención en el estudio de las denominadas levaduras de flor. La precariedad económica de la universidad le obligó a solicitar una ayuda económica a la recién creada Fundación Nacional para Investigaciones Científicas y Ensayos de Reformas (FENICER), organismo ligado a la Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas (JAE). Castillejo, a la sazón secretario de la FENICER, aprovechó la ocasión para no sólo concederle la ayuda económica solicitada, sino para crear el Centro de Investigaciones Vinícolas (CIV) con el objetivo de "...el estudio científico de vinos españoles y

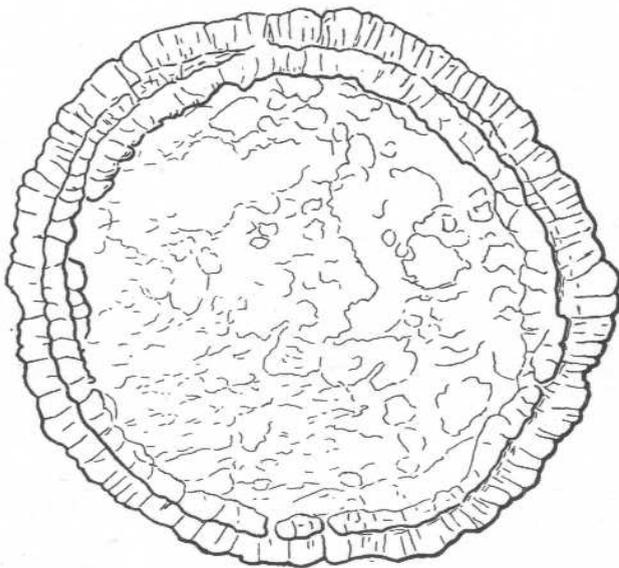


Figura 17.—Colonia gigante de la levadura F-4 sobre gelatina al mosto de uva peptonado. (Dibujo a la cámara clara.)

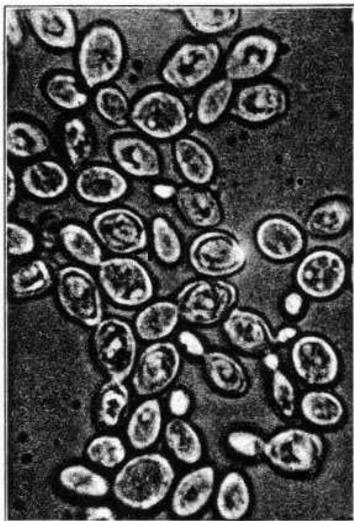


Figura 49.—Células del mismo velo. Coloración al yodo. (Ver pág. 69.) Aumento: $\times 1.250$.

Esquema de una colonia de Saccharomyces beticus, nueva especie de levadura que Juan Marcilla descubrió en los velos de vino de Andalucía Occidental (J. Marcilla, G. Alas y E. Feduchy: "Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico". Anales del Centro de Investigaciones Vinícolas Vol. I, nº 1, 1939).

los experimentos y ensayos de aplicaciones industriales, a fin de mejorar, diversificar y abaratar su producción" (Acta de constitución), y del cual Juan Marcilla Arrazola fue inmediatamente nombrado director en 1933 (Formentín y Rodríguez, 2001).

Pretendía el CIV que se trabajase sobre las aplicaciones de la ciencia a un nivel que no alcanzaban las ya creadas Estaciones Enológicas. Se pidió a la escuela de Agrónomos el empleo de sus laboratorios para la realización del traba-

jo del personal del CIV, pensando que también les compensaría la utilización del material asignado a la mejora científica en la docencia en dicha Escuela. Fue así como pasó a desempeñar cargos de gestión en la investigación al más alto nivel de la época, actividad que como veremos se vio obligado a llevar a cabo más adelante.

De los pocos logros (acaso el único) que tuvo en publicaciones la FENICER, destaca el boletín donde Marcilla dio cuenta de los resultados de sus investigaciones, en los Anales del Centro de Investigaciones Vinícolas Vol. I, nº 1 con el título "Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico", escrito por Juan Marcilla, Genaro Alas y Enrique Feduchy, que publicado en 1939, fue la primera publicación científica de microbiología enológica española en particular, y de microbiotecnología alimentaria española en general, ya que recogía resultados de ensayos en los que utilizaba una cepa de la especie de levadura *Saccharomyces beticus* que él mismo descubrió, para realizar la fermentación controlada con levadura seleccionada y la posterior formación de la flor o velo típica de la zona de vinificación investigada.

MARCILLA Y EL CSIC

Los lamentables sucesos de 1936 afectarían no poco esta trayectoria que ya se había consolidado tanto en su vertiente profesional, como docente, científica y de gestión a alto nivel, pero todo lo aprendido y desempeñado tuvo mucha utilidad en años posteriores. En 1939 le vino el reconocimiento internacional siendo nombrado Vicepresidente de la *Office Internationale de la Vigne et du Vin*, actual OIV, máxima autoridad internacional sobre cuestiones vitivinícolas.

Su actividad científica la retomaría acabada la Guerra Civil, en los laboratorios de Fisiología Vegetal del Real Jardín Botánico. Por esta época la vida le daría otro duro revés, enviudando el 22 de enero de 1943 a los 57 años con once hijos, que sacaría adelante con no poco esfuerzo y dedicación. Su experiencia en gestión le llevó a asumir una Vicepresidencia en el recién creado CSIC y a ser nombrado miembro del Consejo Técnico (CT) del recién creado Patronato Juan de la Cierva (PJC). Las funciones del CT eran a) definir los problemas de investigación técnica, b) estudiar la relevancia económica de los proyectos c) plantear centros que debieran crearse y d) inventariar los centros existentes relacionados con los problemas y proyectos definidos. Una de las temáticas iniciales del CT fue la de Fertilizantes y aprovechamiento Industrial de Productos del Campo, que dirigió por Juan Marcilla. El CT pretendía ser como una incubadora de institutos, mientras que el Instituto Nacional de Industrias (INI) lo era de empresas, en las que se explotaban las patentes del PJC. En 1951 la CT dictaminó sobre la organización de un Instituto del Vino y de las Fermentaciones. En la actualidad dicha iniciativa parece por fin haber cristalizado con la creación del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) en La Rioja, centro mixto CSIC-Univ. de la Rioja-CIDA.



Juan Marcilla impartiendo clase (Archivo ETSIA).

les gustos y aromas, las calidades todas de un vino dado, ¿pueden ser obtenidas con una sola clase de levaduras puras o son más bien el resultado que deriva, inicialmente y en parte, de una fermentación mixta producida por dos o más especies o razas?” para contestar con la clave que permite entender el posterior trabajo del grupo de los Profesores de Investigación Dr. Baldomero Iñigo y Dr. Francisco Bravo en zimología y bacteriología enológica respectivamente: “Creemos que jamás se podrá contestar a esta pregunta con carácter de generalidad. Es casi seguro que para muchos vinos comunes bastaría con una levadura pura, ...pero para los Chianti italianos autoridades como nuestro colega y amigo el prof. Castelli (T.) dudan

Finalmente las investigaciones de Marcilla se integrarían como Sección de Fermentaciones por él dirigida, primero en el Instituto de Biología Santiago Ramón y Cajal, después pasando como tal al nuevo Instituto de Microbiología Aplicada del CSIC, creado en 1946 y del que sería nombrado director.

En 1966, la Sección de Fermentaciones fundada por Marcilla en el Instituto Jaime Ferrán de Microbiología pasó a integrarse como Departamento de Fermentaciones Industriales al nuevo Centro Nacional de Química Orgánica. Fue en 1967 cuando el departamento pasó a ser a Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI) (CSIC), y a incluirse junto con otros centros en el proyecto científico del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (INCYTA), proyecto que no prosperaría mucho tiempo, pero que por primera vez coordinaría científicamente los centros del CSIC que formarían con posterioridad la actual Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

MARCILLA Y LA MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA ACTUAL

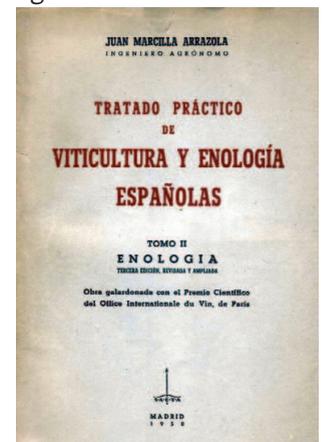
Marcilla trae a España la microbiología vínica europea. Dentro del panorama de la misma, comenzaba a destacar el enfoque abordado por los microbiólogos italianos, interesados en conocer la microbiota autóctona italiana, que buscando la forma de emplear levadura seleccionada en las fermentaciones vínicas, se interesaron por describir la realidad espeziológica de sus caldos. Marcilla, sensible a todos los adelantos y nuevos desarrollos en materia de microbiología enológica, recoge en su obra magna “Tratado de viticultura y enología españolas” (1942), que “...aún muy escaso conocimiento que poseemos acerca de la flora microbiana espontánea en los mostos de uva de cada comarca vitícola”. Reconociendo los límites de la microbiología, aun en perjuicio propio, admite que “... Los especia-

mucho que puedan ser obtenidas las mejores y más típicas calidades con una sola levadura pura, y es seguro que lo mismo ocurrirá para muchos vinos finos españoles y extranjeros”. El esfuerzo científico de Iñigo se desarrollará en parte como búsqueda de la respuesta a esa pregunta, y precisamente de la mano del mencionado microbiólogo italiano, el Prof. Tomasso Castelli, en cuyo laboratorio estuvo trabajando.

Castelli, con quien Marcilla había contactado con anterioridad, procuró relacionar las especies de los mostos italianos con el clima y lo consiguió, algo que serviría para el posterior desarrollo de la teoría ecológica del vino español, para la puesta en práctica de la misma mediante la elaboración del vino ecológico, y para la constitución de la colección de levaduras españolas del IFI-CSIC, parte de la cual ha sido recientemente depositada en la CECT, todo ello llevado a cabo por el grupo de los Dres. Iñigo y Bravo.

MARCILLA Y EL PIE DE CUBA

Marcilla continuó su dedicación a la docencia, pasando a asumir también tareas de gestión como Director de la Escuela de Agrónomos que permitieron, entre otras cosas, reconstruirla por haber quedado muy dañada por los combates. Pero en este y otros aspectos, lo que constituiría su obra cumbre, mencionada con anterioridad, fue la publicación en 1942 del que seguramente fuera el libro español más importante en viticultura y enología del siglo XX, el “Tratado práctico de viticultura y enología españo-



las”, premiado por la Office International du Vin (OIV), donde aúna conocimientos científico-técnicos de una forma magistral, demuestra sus dotes didácticas de forma incontestable e incluye todo lo que en la época se conoce sobre microbiología enológica, tanto en el empleo de pies de cuba con levadura seleccionada como en la determinación del origen microbiano de importantes alteraciones del vino.

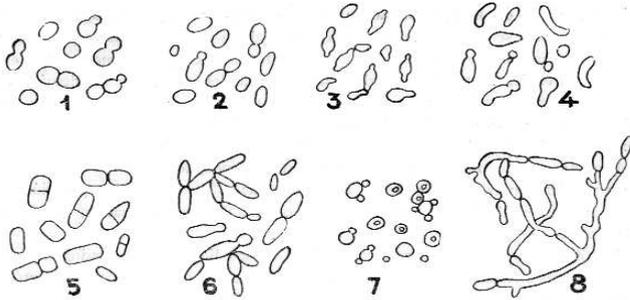


FIGURA 23.—Formas más frecuentes de las levaduras.
 1. Forma redondeada o “cerevisiae”.
 2. Forma elíptica o “ellipsoideus”.
 3. Forma apiculada.
 4. Formas mazudas o en salchicha (Pasteurianus).
 5. Forma “Schyzosaccharomyces”.
 6. Forma “Mycoderma”.
 7. Forma “Tórula”.
 8. Forma micelilar o “Mycotórula”.

1ª clave de clasificación morfológica de levaduras enológicas (Marcilla, J. 1942. “Tratado práctico de viticultura y enología españolas”)

En sus libros de 1922, “Vinificación en países cálidos”, y “Química, viticultura y enología”, escrita con el también ingeniero agrónomo Nicolás García de los Salmones, Juan Marcilla refleja sus conocimientos sobre el empleo de levaduras en enología, y en concreto, de la preparación y fines del pie de cuba. Pero será en su obra magna, seguramente el libro español más importante en viticultura y enología del siglo XX, escrita en 1942, “Tratado de viticultura y enología españolas” (1942), donde aúna conocimientos científico-técnicos de una forma magistral, y demuestra sus dotes didácticas de forma incontestable. En el capítulo IX de dicha obra en el que, al hablar de los “Métodos para mejorar las fermentaciones espontáneas de los mostos de uva”, hará mención al pie de cuba en los siguientes términos:

“Pies de cuba.- Un pie de cuba no es más que un mosto en plena fermentación, conducida en las mejores condiciones posibles, para procurar el predominio de buenas levaduras. Este mosto, se adiciona en proporciones variables (del 2 al 6 %, por ejemplo) a los mostos que van a fermentar, asegurando con ello el rápido y fácil arranque de la fermentación y tendiendo a conseguir, desde el principio, un predominio de las levaduras más convenientes.

La preparación de un pie de cuba es muy sencilla: unos cuantos días antes se recolectan racimos sanos y bien maduros, de los que se obtiene mosto en el que, si es preciso, se corrige la acidez en caso de ser escasa (La adición de 6 a 8 g de fosfato amónico por cada 100 L de mosto, para pie de cuba, puede ser aconsejable, para procurar mayor multiplicación de levaduras. Siempre se procederá a sulfitar en proporciones que basten a un buen desfangado y se trasegará el

mosto claro, aireándolo mucho, a una vasija no azufrada, en la que arrancará y proseguirá la fermentación, que debe ser asiduamente vigilada, sobre todo en lo que se refiere a la temperatura”.

Respecto a las dificultades de su preparación comenta que puede parecer difícil tenerlos activos durante toda la vendimia, por lo que propone lo siguiente:

“El problema se resuelve preparando, al mismo tiempo que el primer pie de cuba, una cantidad suficiente de mosto azufrado (sulfitado) con la proporción de sulfuroso suficiente para que no arranque la fermentación espontánea en bastantes días. Con este mosto, bien aireado (o mejor, calentado a 60°C y jarreado para airearlo bien y desulfitarlo parcialmente), se van alimentando los pies de cuba a medida que se van consumiendo, obteniéndose de este modo un pie de cuba en fermentación continua”.

Resumiendo la utilidad del uso del pie de cuba concluye más adelante:

“Los pies de cuba pueden ser muy útiles:

1º En vendimias de frutos averiados, enmohecidos, lesionados por granizadas, etc., porque hacemos predominar desde la iniciación de las fermentaciones una población de levaduras sobre la flora microbiana, abundante y poco adecuada en esta clase de vendimias; y

2º Para hacer arrancar la fermentación en mostos a temperaturas inferiores a 15°, en bodegas y climas de otoño muy fresco o frío. “

Continúa refiriéndose al tema en el Cap. XXI “Los vinos espumosos”, al caso particular de la fermentación en botella, donde la tradición de no inocular está siendo sustituida por el empleo de levadura seleccionada, con cuya inoculación se consigue la plena seguridad de la producción de la espuma y mayor constancia en los resultados.

MARCILLA Y LA SEM

Poco después, y en continuidad con su papel institucionalizador de la microbiología científica, fue Presidente fundador de la Sociedad Española de Microbiología (SEM), en 1946, cuya extraordinaria labor continúa en nuestros días.

Diversificó mucho sus líneas de investigación, abordando el aprovechamiento de residuos agrícolas mediante la fermentación microbiana, aspecto éste en el que fue un auténtico pionero en lo que a biorremediación se refiere, algo tan en boga hoy día para asegurar la sostenibilidad de la actividad industrial. Recibió múltiples condecoraciones, entre las que cabe destacar la Cruz al Mérito Agrícola y la Cruz de Alfonso X El Sabio. En 1945 tomó posesión como académico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Preparándose para asistir en Rio de Janeiro al V Congreso Internacional de Microbiología, al que llevaba el estudio “Contribución al estudio del metabolismo carbonado de las levaduras multiplicadas en anaerobiosis sobre prehidrolizados de residuos agrícolas”, escrito por él mismo, L. Hidalgo y J. Garrido, falleció en Madrid el 16 de agosto de 1950.



Juan Marcilla supervisando tareas de campo (Archivo ETSIA).

El personaje fue pionero e institucionalizador, tanto a nivel docente como científico, de la microbiología enológica española y de la microbiotecnología alimentaria, algo realmente difícil de encontrar en la misma persona, sin duda el protagonista y máximo exponente de la vitivinicultura española de la primera mitad del siglo XX: el Ingeniero Agrónomo Juan Marcilla Arrazola.

AGRADECIMIENTOS

El autor de este artículo cuenta con financiación pública en proyectos del Plan Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AGL2006-0255, AGL2004-06933-CO2-01/ALI; 25506 FUN C FOOD (CONSOLIDER-IMAGENIO 2010), de la Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD-CM S-0505/AGR-0153), merced a los cuales desarrolla actividades de investigación científica transferibles a empresas del sector. Los interesados pueden obtener más información en la web www.ifi.csic.es o contactando directamente con el autor.

BIBLIOGRAFÍA:

- Carrascosa, A.V. (2007). Los orígenes de la microbiología enológica española. *Sem. Vitivin.* 3162, 809-813.
- Carrascosa, A.V. (2007). El Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) y la microbiología enológica española. *Sem. Vitivin.* 3169, 1371-1375.
- Carrascosa, A.V., Muñoz, R. y González, R. (2005). *Microbiología del Vino*. AMV Ediciones, Madrid.
- Formetín, J. y Rodríguez, E. (2001). *La Fundación Nacional para Investigaciones Científicas (1931-1939)*. 196 pp. Ed. CSIC, Madrid.
- Pan Montojo, J. (1994): "La bodega del mundo. La vid y el vino en España, 1800-1936". Alianza/Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

Sociedad Española de Microbiología

Fundada en 1946



Miembro de:

FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGY SOCIETIES (FEMS)
INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES (IUMS)

Representada en numerosos Comités Internacionales relacionados con la especialidad.

Socios protectores de la SEM:

Francisco Soria Melguizo, S.A.
Merck Sharp & Dohme, S.A.
Pfizer, S.A.

Para solicitar más información,
inscripciones o publicidad,
diríjase a la Secretaría de la

Sociedad Española de Microbiología

Vitruvio, 8 - 28006 Madrid

Tel.: 915 613 381

Fax: 915 613 299

E-mail: orgra46@orgc.csic.es

Socios colaboradores de los Grupos Especializados de la SEM:

- AGBAR, S.A.
- BIOETANOL GALICIA
- EMASA
- EMASESA
- Iberdrola, S.A.
- Instituto Tecnológico Agroalimentario
- Iproma, S.L.
- Laboratorio Municipal de Vigo
- Millipore Ibérica, S.A.
- THOR Especialidades, S.A.
- VWR International Eurolab (grupo Merck)

Canibalismo

en poblaciones de *Bacillus subtilis*

José Eduardo González Pastor

Laboratorio de Ecología Molecular
Centro de Astrobiología (CSIC-INTA), Madrid
gonzalezpje@inta.es

Los microorganismos emplean armas químicas como antibióticos u otros agentes antimicrobianos para protegerse del ataque de otras especies o incluso de diferentes cepas de la misma especie. En general, los microorganismos que producen estos compuestos son inmunes a los mismos. En *Bacillus subtilis*, concretamente en poblaciones que entran en fase de esporulación, se ha descrito un comportamiento fratricida mediado por unas toxinas que son producidas por algunas células de la población para eliminar a otras células hermanas, genéticamente idénticas (González-Pastor *et al.*, 2003). El proceso de formación de esporas se inicia por limitación de nutrientes, e implica la división asimétrica de la célula para producir dos compartimentos de distinto tamaño: la célula madre, de mayor tamaño, y la forespora, de menor tamaño que dará lugar a la espora. El compartimiento de la forespora termina incorporándose en el compartimento de la célula madre, que contribuye al desarrollo de la espora. La lisis de la célula madre permite la liberación de la espora (revisado en Piggot y Losick, 2002; Errington, 2003). Un aspecto importante de este proceso es que las células no están comprometidas a esporular hasta que forman el septo asimétrico en uno de los polos. Hasta ese momento, pueden volver a crecer si surgen nuevos nutrientes en el medio. Sin embargo, las células que han pasado el estado de formación del septo asimétrico entran en un proceso sin retorno, y tendrán que completar la formación de la espora pese a la presencia de nutrientes (Parker *et al.*, 1996). El proceso de esporulación es muy complejo, requiere un elevado consumo energético y necesita varias horas para completarse. Por ello, la formación del septo asimétrico se podría considerar como el momento idóneo para decidir si el proceso de esporulación debe continuar o no, haciendo este proceso reversible si aparecen nuevos nutrientes en el medio. Como se ha comentado previamente, se ha descrito un comportamiento de fratricidio en poblaciones que entran en esporulación. En estas poblaciones se ha observado que no todas las células entran de forma sincronizada en esporulación, y aquellas células que han comenzado este proceso producen toxinas que matan a las células hermanas que no han empezado a esporular. El resultado es la

liberación al medio de nuevos nutrientes que proceden de las células muertas, y que son empleados por las células que han producido las toxinas (caníbales) y que habían empezado a esporular pero no habían llegado a la etapa de compromiso, en la formación del septo asimétrico (Figura 1A). Mediante este proceso de fratricidio y canibalismo se consigue retrasar el proceso de esporulación en toda la población, ya que permite que aquellas células que habían empezado a esporular y que no habían completado el septo asimétrico puedan volver a crecer y dividirse (González Pastor *et al.*, 2003).

GENES IMPLICADOS EN LA MUERTE DE LAS CÉLULAS QUE NO ENTRAN EN ESPORULACIÓN

Se han identificado dos grupos de genes implicados en este proceso de canibalismo: i) *skf* (*sporulation killing factor*), y ii) *sdp* (*sporulation delaying peptide*) (González Pastor *et al.*, 2003; Ellermeier *et al.*, 2006). Los dos grupos de genes se expresan al principio del proceso de esporulación, y además su transcripción depende de SpooA (Fawcett *et al.*, 2000), el regulador principal de la entrada en fase de esporulación. Se observó que las mutaciones en genes de cada uno de estos grupos aceleran el proceso de esporulación (Figura 1B). Los estudios clásicos del proceso de formación de esporas se basan en la detección de mutantes defectivos en la formación de esporas, y esta fue la primera vez en la que se estudiaron mutantes que aceleraban este proceso. La posible relevancia biológica de este fenotipo se discutirá más adelante.

El operón *skf* está constituido por ocho genes (A-H) y codifica la producción de una toxina e inmunidad a la misma. Este operón es similar a otros que están implicados en la síntesis de antibióticos peptídicos. El gen *skfA* podría codificar la estructura primaria de la toxina. El gen *skfB*

codifica una proteína similar a otra de *B. subtilis* implicada en la modificación del antibiótico subtilisina. El producto del gen *skfD* contiene el dominio CAAX identificado en una familia de proteasas. Por otra parte, los genes *skfE* y *skfF* codifican un posible transportador de tipo ABC (*ATP binding cassette*). Este tipo de transportadores se encuentran frecuentemente en operones de síntesis de antibióticos, y están relacionados con la secreción del antibiótico y la resistencia al mismo. La toxina producida por el operón *skf*, SKF, no ha podido ser aislada, pero diferentes experimentos han demostrado su actividad: (i) en cultivos mixtos de la cepa natural y la cepa mutante *skf*, la cepa natural mata a la mutante cuando el cultivo entra en esporulación. (La cepa natural produce SKF que mata a la cepa mutante *skf*); (ii) la expresión de los genes que codifican el transportador de tipo ABC, *skfEF*, en la cepa mutante *skf*, permite que estas células se vuelvan resistentes a SKF; (iii) una cepa que puede expresar el operón *skf* bajo el control de un promotor inducible por IPTG, en presencia del inductor, produce un halo de inhibición de crecimiento cuando se incula sobre un césped de la cepa mutante *skf*; y la evidencia más importante, (iv) el operón *skf* es responsable de la muerte de cerca de un 70 % de las células de una población de *B. subtilis* que entra en esporulación, algo que no se observa en una cepa mutante *skf*. Este fenómeno es resultado de la heterogeneidad de las células de una misma población en relación con la activación del regulador principal de fase estacionaria, *Spo0A*, en menos de la mitad de la población se activa este regulador (Chung *et al.*, 1994; Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003). Por tanto, sólo las células con el regulador *Spo0A* activado producen la toxina y la resistencia a la misma, y por ello, las células con *Spo0A* no activado mueren.

El otro grupo de genes implicado en la muerte celular durante esporulación es *sdp*, constituido por dos operones convergentes, *sdpABC* y *sdpRI*. El operón *sdpABC* es responsable de la síntesis y transporte de un péptido de 63 aminoácidos procedente del extremo C-terminal del producto de *sdpC*. El péptido SdpC se ha descrito inicialmente como una señal que retrasa el proceso de esporulación, mediante la inducción de los genes adyacentes *sdpRI* (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003). Recientemente, se ha propuesto que SdpC puede funcionar como una toxina y que los productos de *sdpRI* confieren inmunidad a la toxina (Ellermeier *et al.*, 2006). Las mutaciones en *sdpABC* también confieren un fenotipo de aceleramiento de la esporulación, incluso más rápido que el de las mutaciones en *sdp* (Figura 1B). Mediante experimentos de *microarrays* de ADN se demostró que una mutación en *sdpC* afecta fuertemente a la transcripción del operón convergente *sdpRI*, y esta dependencia se debe a un efecto de

señalización intercelular. El operón *sdpRI* no se transcribe en un mutante *sdpC*, pero su transcripción se restablece si las células productoras de la señal SdpC crecen en su proximidad. SdpC se pudo purificar directamente del medio de cultivo de células que entran en esporulación, y se comprobó que el péptido purificado estimula la transcripción del operón *sdpRI*.

Como se ha mencionado antes, además de la función de señalización, SdpC se comporta como una toxina, y se ha demostrado que SdpI, que es posiblemente una proteína integral de membrana, confiere inmunidad a la misma (Ellermeier *et al.*, 2006). Por otra parte, la proteína SdpR es similar a otras de la familia de reguladores ArsR, y fue inicialmente identificada en una búsqueda de genes que inhiben la transcripción del gene *sigW*, implicado en resistencia a antibióticos y detoxificación. Además, SdpR funciona

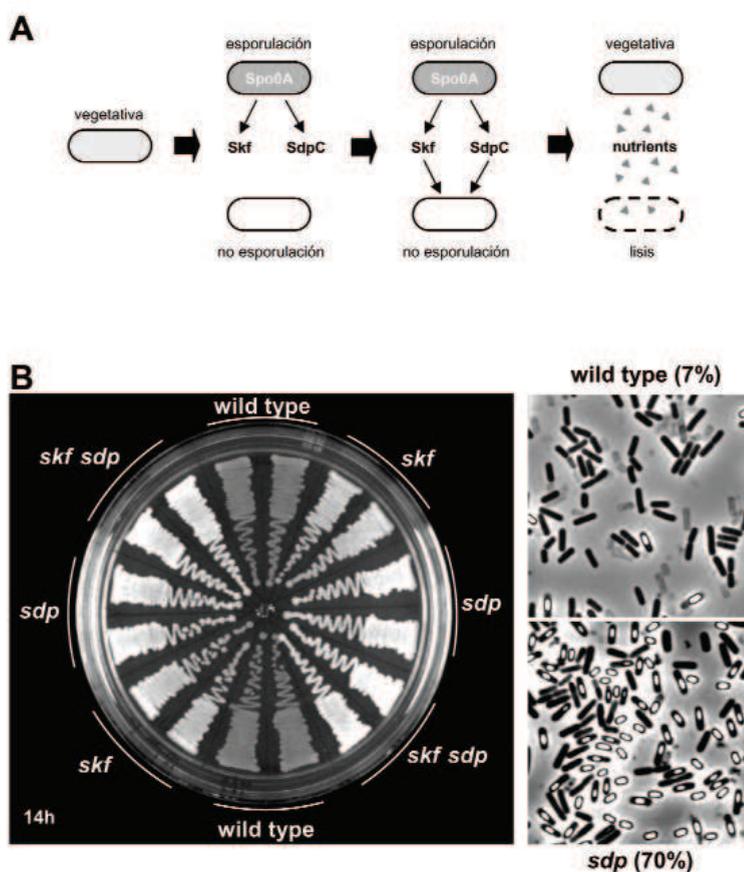


Figura 1. (A) Modelo del comportamiento de canibalismo. (B) Las colonias de mutantes de *B. subtilis* que no exhiben canibalismo (mutantes en los genes *skf*, *sdp* o en los dos) esporulan más lentamente que las colonias formadas por cepas naturales (*wt*). En la fotografía de la izquierda, se observa que las colonias de los mutantes son más brillantes que las colonias de la cepa *wt* y esto se asocia a un mayor número de esporas. En efecto, en el panel de la derecha se observan bacterias procedentes de la cepa *wt* y de mutantes en *sdp*; como se puede apreciar, en el mutante *sdp* hay más bacterias brillantes (con esporas) que en la cepa *wt*. Por otra parte, en la cepa *wt* se aprecia un gran número de bacterias que exhiben menor intensidad (señaladas con flechas blancas) y que corresponden a bacterias muertas. Este tipo de bacterias no se observa en el mutante *sdp*.

Eduardo González Pastor (Madrid, 1967) se licenció en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, y obtuvo el doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular) en la Universidad Autónoma de Madrid en 1998. Realizó la tesis doctoral bajo la dirección del Dr. Felipe Moreno en la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, sobre la estructura y regulación del operón responsable de la biosíntesis y exportación de la microcina C7, un antibiótico peptídico que inhibe la síntesis de proteínas, producido por *Escherichia coli*. Desde 1999 hasta abril del 2003 realizó una estancia postdoctoral en el laboratorio del Prof. Richard Losick, en el Departamento de Biología Molecular y Celular de la Universidad de Harvard (Cambridge, USA). Durante esta etapa investigó en diversos aspectos relacionados con el comportamiento social y multicelular de comunidades de *Bacillus subtilis*. Además participó en la construcción del primer *microarray* de DNA de esta bacteria, que se empleó para investigar los genes controlados por los principales factores sigma y reguladores implicados en el proceso de esporulación. Posteriormente, se incorporó en el 2003 en el Centro de Astrobiología de Madrid como investigador contratado dentro del programa Ramón y Cajal. Sus principales líneas de investigación son: i) estudio del comportamiento social en comunidades microbianas, empleando técnicas genómicas, moleculares y de biología celular, y ii) estudio de los mecanismos moleculares de adaptación de los microorganismos a ambientes extremos, como el río Tinto (un sistema de drenaje ácido de minas), y más recientemente zonas geotermales en Islandia. Para estos estudios se emplean técnicas metagenómicas y moleculares.



de *sdpABC*, también controla *sdpRI* de forma indirecta mediante el represor AbrB. Este represor sólo está presente cuando SpooA no está activado. Por ello, las células que no esporulan, en las que SpooA no está activado, no pueden transcribir *sdpRI*, debido a la acción del represor AbrB, y por tanto no expresan la proteína de inmunidad (Figura 3).

¿POR QUÉ LOS MUTANTES SKF Y SDP ESPORULAN MÁS RÁPIDAMENTE?

¿CUÁL ES EL SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL CANIBALISMO EN LAS POBLACIONES DE *B. SUBTILIS*?

El fenotipo de esporulación acelerada de los mutantes *E_{skfK}* y *sdp* indica que la cepa natural no es muy eficiente en cuanto a la velocidad de esporulación. Las toxinas producidas por estos operones matan a aquellas células en las que SpooA no está activado. Los nuevos nutrientes liberados al medio procedentes de la lisis de esas células son empleados por aquellas células que habiendo empezado a esporular todavía no han llegado al punto de no retorno. Estos nutrientes les permiten volver a crecer y duplicarse. En este escenario, el proceso de formación de esporas se paraliza hasta que de nuevo se vuelven a agotar los nutrientes en el medio. De nuevo, esto producirá una población heterogénea en cuanto a la actividad de SpooA, y nuevos episodios de muerte celular tendrán lugar, hasta que gran parte de la población se haya transformado en esporas. Este ciclo de múltiples eventos de muerte celular es responsable del retraso en el proceso de esporulación de la cepa natural. Si una o dos de las toxinas está ausente, las células que no tienen SpooA activado no mueren, no se introducen nuevos nutrientes en el medio y por tanto no se detiene el proceso de esporulación, lo que explica su mayor velocidad en las cepas mutantes *sdp* o *skf*.

como un auto-represor, ya que se ha demostrado que se une a la región promotora del operon *sdpRI* e inhibe su transcripción. En un mutante en *sdpC* no se transcribe el operon *sdpRI*, pero si se introduce una mutación en *sdpR* se restablece la transcripción. Integrando diversas observaciones, se ha propuesto un modelo (Figura 2) en el que la toxina SdpC interacciona con la proteína de inmunidad SdpI, y este complejo induce el secuestro del regulador SdpR en la membrana. En efecto, se confirmó que SdpR, fusionado a la proteína verde fluorescente se localiza en membrana en presencia de la toxina SdpC, pero no en su ausencia. El secuestro de SdpR en la membrana impide que reprima la transcripción de *sdpRI*, facilitando la expresión de la proteína de inmunidad SdpI. En ausencia de la toxina SdpC, SdpR no se secuestra en la membrana, reprime *sdpRI*, y por tanto evitaría la producción innecesaria de la proteína de inmunidad SdpI (Ellermeier *et al.*, 2006).

En resumen, ¿por qué las células que esporulan son inmunes a las toxinas que producen? En el caso del operón *skf*, las células que expresan SKF son inmunes porque además producen el transportador de tipo ABC, codificado en el mismo operón, que confiere resistencia a la toxina. ¿Qué ocurre en el caso de la toxina SdpC? En principio, la señal SdpC podría inducir la expresión del gen de inmunidad SdpI en todas las células de la población. Esto no sucede porque el regulador SpooA que controla la transcripción

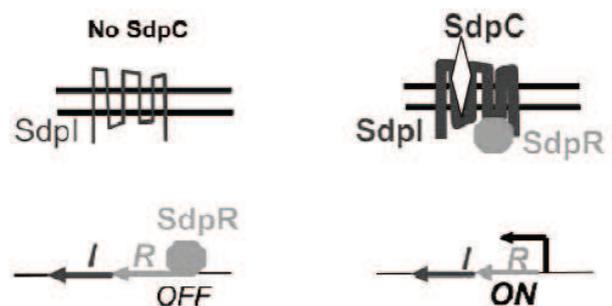


Figura 2. Modelo de secuestro propuesto para explicar como la señal extracelular SdpC induce la expresión del operón de inmunidad *sdpRI*. La flecha gruesa en el panel de la derecha sobre el promotor de *sdpRI*, indica el nivel elevado de transcripción de este operón. El mayor grosor del símbolo de SdpI en el panel superior de la derecha indica que se expresa en mayor cantidad.

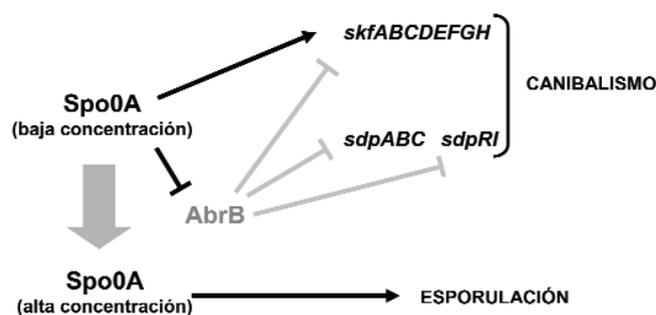


Figura 3. El canibalismo y la esporulación están controlados por diferentes niveles del regulador Spo0A. Los operones *skf* y *sdp* implicados en el canibalismo, están regulados por una baja dosis de Spo0A. El operón *skf* además está reprimido por AbrB. *sdpABC* y *sdpRI* están regulados de forma indirecta por Spo0A, ya que están reprimidos por AbrB. Por otra parte, la activación del proceso de esporulación requiere niveles más elevados de Spo0A.

¿Por qué las cepas naturales presentan este comportamiento fratricida? ¿Qué ventajas puede aportar? A diferencia de lo que se pensaba, hemos propuesto que el proceso de esporulación es posiblemente el último resorte que *B. subtilis* quiere activar en respuesta a la ausencia de nutrientes. Como se ha explicado previamente, el proceso de esporulación es complejo y requiere un importante consumo de energía y de tiempo para ser completado. Además es un proceso que se convierte en irreversible a partir de una etapa muy temprana. Para una comunidad de *B. subtilis*, podría ser desfavorable que todos los miembros de la población entrasen de forma rápida y sincronizada en este proceso a la menor señal de ausencia de nutrientes, que es el fenotipo observado en los mutantes *sdp* y *skf*. Este proceso de canibalismo ayuda a retrasar la formación de esporas y además mantiene durante un mayor tiempo una población mixta con un pequeño porcentaje de esporas y un mayor porcentaje de células que están en fase de crecimiento. El mantenimiento de una población de este tipo podría ser más beneficioso para la comunidad a la hora de competir con otras poblaciones microbianas. En su entorno natural, estas comunidades compiten con otros microorganismos, muchos de los cuales, no producen esporas. Las células que ya se encuentran en la fase irreversible de la esporulación y las esporas podrían tardar mucho más tiempo en recuperarse y crecer rápidamente si nuevos nutrientes aparecen en el medio, por lo que estarían en desventaja con otros microorganismos no productores de esporas. Por otra parte, las toxinas producidas por las células que esporulan podrían matar no sólo a las células hermanas de *B. subtilis* que no esporulan sino también otros microorganismos que estuviesen en la proximidad, favoreciendo la liberación de nuevos nutrientes, lo que ralentizaría el proceso de esporulación.

LOS GENES IMPLICADOS EN EL CANIBALISMO SE INDUCEN POR NIVELES BAJOS DEL REGULADOR SPO0A, ANTES QUE LOS GENES ESPECÍFICOS DE ESPORULACIÓN

El regulador SpooA se conoce principalmente por su función en el control del inicio del proceso de esporulación en *B. subtilis*, y regula directamente 121 genes. Sin embargo, no todos estos genes responden de la misma manera a SpooA. Algunos se activan con una baja concentración de SpooA y otros requieren una elevada concentración

(Chung et al., 1994). Mediante *microarrays* de DNA se identificaron todos los genes que están en estas categorías (Fujita et al., 2005). En resumen, se observó que los genes que desempeñan una función directa en el proceso de esporulación requieren una elevada dosis de SpooA ya que sus promotores tienen una elevada afinidad de unión a este regulador. Por otra parte, los genes que requieren una concentración baja de SpooA, o bien tienen un sitio de unión de alta afinidad, o son regulados de forma indirecta por SpooA, a través del represor AbrB. En presencia de SpooA, no se expresa AbrB y de esta forma se desreprimen los promotores controlados por AbrB. Dentro de esta categoría de genes que requieren una dosis baja de SpooA están los genes implicados en el canibalismo, *skf* y *sdp* (Figura 3). El promotor del operón *skf* tiene alta afinidad por SpooA, y además es reprimido por AbrB, y el operón *sdpABC* está bajo el control negativo de AbrB. Por ello, la existencia de estos distintos tipos de activación de SpooA podría tener un significado biológico. En una etapa temprana, las células producen SpooA en bajas concentraciones, y se inducen genes auxiliares en el proceso de esporulación, como por ejemplo los de canibalismo. Un incremento progresivo en los niveles de SpooA, llevaría a inducir los genes que participan directamente en la esporulación (Figura 3). Esta compleja regulación refleja nuevamente que la decisión de esporular se elabora de una forma muy controlada.

OTROS EJEMPLOS DE FRATICIDIO EN MICROORGANISMOS

Recientemente se ha descrito otro caso de fratricidio en el patógeno *Streptococcus pneumoniae* (Guiral et al., 2005; revisado junto al canibalismo por Claverys y Håvarstein, 2007). En condiciones de alta densidad celular, y en respuesta a un péptido señal secretado al medio, *S. pneumoniae* entra en un estado de competencia genética. Al igual que en el proceso de esporulación de *B. subtilis*, sólo una fracción de las células en la población se vuelve competente, y producen una bacteriocina responsable de la lisis de las células no competentes en la población. Se ha postulado que las células lisadas liberan al medio DNA, nutrientes, pneumolisina y otros factores de virulencia que podrían facilitar la invasión del huésped.

Por otra parte, en *Myxobacteria*, que también forma esporas, se ha descrito que los cultivos que entran en fase estacionaria experimentan un proceso de autólisis.

Aproximadamente se lisa un 80 % de la población inicial (Wireman y Dworkin, 1977). Las toxinas implicadas en esta muerte celular se denominan autocidas, y no son activas contra ninguna otra bacteria u hongos, pero sí contra la especie productora y otras cercanas. Será interesante investigar si esta muerte celular en *Myxobacteria* se debe a un comportamiento fratricida. Este podría considerarse un caso de muerte celular programada o apoptosis como los que se describen en organismos multicelulares eucariotas.

CONCLUSIONES

Nuestra percepción del mundo bacteriano tiende a ser reduccionista. Los estudios realizados en condiciones de laboratorio proporcionan información sobre los genes, su regulación transcripcional, rutas metabólicas, que no se explican ni integran en el contexto del tipo de vida de estos organismos en el medio ambiente. El proceso de esporulación se ha estudiado extensamente desde un punto de vista unicelular, aunque ya se conocía que requiere señales de densidad celular: una bacteria aislada no puede entrar en esporulación. Este comportamiento fratricida que hemos denominado canibalismo refleja un control por parte de la comunidad bacteriana para retrasar el mayor tiempo posible la decisión de esporular. Por otra parte, este trabajo ha proporcionado una visión más amplia de la función del regulador SpooA, tradicionalmente vinculado de forma exclusiva al proceso de esporulación a nivel unicelular. Las complejas propiedades de la regulación mediada por SpooA, que controla la entrada en un programa de desarrollo dependiendo de la concentración de proteína activada, recuerdan a las de los reguladores del desarrollo en organismos eucariotas.

BIBLIOGRAFÍA

- Chung, JD, Stephanopoulos, G, Ireton, K, and Grossman, AD. 1994. Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. *J. Bacteriol.* **176**, 1977-1984.
- Claverys, JP y Håvarstein, LS. 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 219-229.
- Ellermeier, CD, Hobbs, EC, González-Pastor, JE y Losick, R. 2006. A three-protein signalling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. *Cell* **124**, 549-559.
- Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *B. subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 117-126.
- Fujita, M, González-Pastor, JE y Losick, R. 2005. High- and low-threshold genes in the SpooA regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**, 1357-1368.
- González-Pastor, JE, Hobbs, EC y Losick, R. 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**, 510-513.
- Guiral, S, Mitchell, TJ, Martin, B y Claverys, J.P. 2005. Competence-programmed predation of noncompetent cell in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8710-8715.
- Parker, GF, Daniel, RA y Errington, J. 1996. Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **142**, 3445-3452.
- Piggot, P y Losick, R. 2002. Sporulation genes and intercompartmental regulation. In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*, Sonenshein, AL, Hoch, JA, and Losick, R. eds. (Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.), pp. 483-517.
- Wireman, JW y Dworkin, M. 1977. Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **129**, 796-802.

Nuevos socios de la SEM

Altas del 21/11/07 al 24/4/08

Abriouel Hayani, Hikmate
Balcázar Rojas, José Luis
Benito Pescador, David
Benomar El Bakali, Nabil
Cachaldora Sieriro, Aida
Cáliz Gelador, Joan
Coque González, María Teresa
D'Orazio, Valentina
Fonseca Balvis, Sonia

García Gonzalo, Diego
García Tagua, Víctor
Gutiérrez Preciado, Ana Lucia
Jofre i Fradera, Anna
López Baena, Francisco Javier
Lucas López, M^a Rosario
Martín Juárez, Belén
Martínez Rodríguez, Adolfo
Mata Martín, Ana Isabel

Olmedo López, María
Ramos Morales, Francisco
Ramos Sevillano, Elisa
Santoyo Santos, Francisco
Torés Montosa, Juan Antonio
Vega Bartol, José Javier de
Velásquez Pérez, M^a de la Encarnación
Vinué Santolalla, Laura
Yuste Lobo, José Enrique

Socios que deben actualizar datos

Abad Lozano, José Luis
Bertolín Serra, Francisco Javier
Bordes Benitez, Ana
Fernández Orts, Eva María
Ferrer Bazaga, Santiago

Lafarga Capuz, Bernardo
López Ponce, Francisco José
Medieros Almendros, Jesús
Miranda Casas, Consuelo
Rubio Vallejo, Manuel Francisco

Sagardia Redondo, M^a Begoña
Sesma Bea, Begoña
Vázquez Domínguez, Evaristo

Los datos correspondientes a cambios de dirección o de la domiciliación bancaria deben enviarse a la Secretaría de la SEM por correo electrónico, normal o fax (ver www.semico.es).



CECT, año 2007

Esperanza Garay
Colección Española de Cultivos Tipo

SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

Como continuación de la certificación obtenida en 2004 según la norma ISO 9001:2000 para “la preparación, venta y distribución de cultivos microbianos (bacterias, hongos y levaduras)”, la CECT ha superado satisfactoriamente en noviembre la primera auditoria de renovación tras hacer lo propio en las auditorias de seguimiento de 2005 y 2006.

INVESTIGACIÓN

La CECT ha participado en dos proyectos de investigación a nivel nacional y pertenece a la Red Valenciana de Investigación Vinculada (REVIV). Ha publicado 6 artículos en revistas internacionales (Más detalle sobre las publicaciones en la página web), y su personal ha participado en 10 reuniones o congresos científicos nacionales e internacionales.

FORMACIÓN

El personal de la CECT ha impartido en su totalidad o colaborado en la impartición de 2 cursos de formación especializada, y ha asistido a diversos cursos de formación. Cabe destacar el Seminario impartido por Jose Miguel López Coronado titulado: “Tratado de Budapest sobre el reconocimiento Internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de Patentes y su implementación”, en México DF (México), en noviembre de 2007.

MEJORAS EN EL PERSONAL

Lo más destacado ha sido, aparte de la jubilación de M^a Dolores García López, la obtención de dos ayudas del MEC para la contratación de personal técnico de apoyo a infraestructuras para dos personas (M. Carmen Macián e Inmaculada Ferrer). Se han renovado los contratos ya vigentes y se ha contratado a una nueva Oficial de Laboratorio, M^a del Pilar Giner Jiménez.

CONVENIOS VIGENTES CON ORGANISMOS OFICIALES O EMPRESAS

La CECT tiene suscritos dos convenios con empresas.

SERVICIOS PRESTADOS

Depósitos con fines de patente como Autoridad Internacional:	46
Nuevas cepas en depósito público:	154
Nuevas cepas en depósito restringido:	38
Identificaciones:	162
Cepas liofilizadas por encargo:	11
Cepas suministradas:	4169
Cepas suministradas a laboratorios, empresas y centros españoles:	3984
Cepas enviadas a países extranjeros:	185

CEPAS CERTIFICADAS Y NUEVAS PRESENTACIONES

Las ‘cepas certificadas’, cuya información apareció como ‘Novedades’ en la página web (www.cect.org), se han añadido nuevas cepas que ya han sido comprobadas. Es importante resaltar que dichas cepas han sido seleccionadas entre las de mayor demanda por su uso como cepas de referencia en controles de calidad, y que se han comprobado sus características fenotípicas tanto en cuanto a su morfología en los medios de cultivo selectivos recomendados como al perfil bioquímico que presentan con los sistemas multitest miniaturizados de uso más frecuente. Las que presentan el perfil más característico son las que finalmente se han certificado, y toda la información está recogida en la web.

Las nuevas presentaciones, ACTICULT[®] 3R y CECT[®] 6R, de las que se envió un folleto informativo en el número de diciembre de Actualidad SEM, están teniendo muy buena acogida, debido a la combinación de disponer de un cultivo crecido y de los crioviales a punto para poder ser inoculados y constituir las cepas de reserva a partir del cultivo de referencia (caso del Acticult 3R), u obtener los crioviales ya inoculados en la CECT, que constituyen las cepas de reserva directas desde la colección (caso del CECT 6R).

Visítenos en www.cect.org

PROBIÓTICOS

Aspectos críticos de su eficacia sobre la salud

Elena Puertollano, María A. Puertollano, Gerardo Álvarez de Cienfuegos y Manuel de Pablo*

Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaen
mapablo@ujaen.es

INTRODUCCIÓN

El aparato gastrointestinal de los seres humanos alberga más de 400 especies de microorganismos patógenos y no patógenos (Tannock, 1999). De la misma forma que algunos de estos microorganismos ejercen efectos adversos sobre la salud de los humanos, otros están relacionados con efectos protectores (Sartor, 2004). Centrándonos en estos últimos, existen varios grupos de microorganismos que se desarrollan en diferentes hábitats, entre ellos el aparato digestivo, y que por sus características promueven un efecto beneficioso sobre la salud, ya que compiten con microorganismos potencialmente patógenos. Estos microorganismos a los que se les atribuye propiedades beneficiosas sobre la salud han sido denominados de forma genérica con el nombre de probióticos y tienen asociadas una serie de características de gran importancia para los humanos (Tabla 1).

Diferentes estudios han demostrado como los probióticos poseen

un papel determinante en la composición de la microbiota intestinal de individuos sanos, particularmente en niños pero también en adultos, reduciendo la proporción de microorganismos potencialmente patógenos (Tannock, 1999). Las investigaciones realizadas en los últimos años han permitido definir a los probióticos como microorganismos con propiedades muy beneficiosas. Por este motivo la organización de las Naciones Unidas para la

Agricultura y los alimentos (FAO) y la organización mundial de la salud (WHO) han precisado esta definición detallando que los probióticos son microorganismos vivos que cuando son administrados en adecuadas cantidades producen efectos beneficiosos

sobre la salud de los humanos (FAO/WHO, 2001). Por lo tanto, la administración de probióticos ha sido intrínsecamente involucrada en la regulación de numerosos factores y mecanismos como son: equilibrio de la homeostasis intestinal, interferencia con microorganismos patógenos en la colonización de la mucosa intestinal, modulación de la respuesta inmune,

Ejercer efectos beneficiosos sobre la salud
Ausencia de patogenicidad y/o toxicidad
Resistencia a ácidos y a secreciones gástricas, biliares y pancreáticas
Mantenimiento de la viabilidad durante el transporte y el almacenamiento
Producción de sustancias con actividad antimicrobiana
Destrucción de receptores de toxinas
Desarrollo competitivo con agentes patógenos
Fortalecimiento de la función barrera
Regulación de diferentes funciones inmunes
Aumento de la secreción de inmunoglobulina A

Tabla 1. Características principales de los probióticos.

*Correspondencia:

Dr. Manuel Antonio de Pablo Martínez,
Universidad de Jaén,
Facultad de Ciencias Experimentales,
Departamento de Ciencias de la Salud,
Área de Microbiología.
23071 Jaén (Spain)
Tel. +34 953 212 003
Fax. +34 953 212 943
e-mail: mapablo@ujaen.es

estabilización y el mantenimiento de la barrera intestinal, inhibición de la actividad procarcinogénica, alteración de la movilidad y de la función intestinal, reducción de los niveles de colesterol y mejora de la tolerancia a la lactosa (Figura 1).

La administración de probióticos en individuos sanos generalmente es segura y ejerce efectos beneficiosos en estos consumidores, pero precisamente por su aplicación en un amplio abanico de individuos pueden desencadenarse algunos problemas, los cuales se restringen a aquellos sujetos que presentan un mayor riesgo de sepsis, como por ejemplo pacientes inmunodeprimidos, neonatos o incluso individuos que manifiestan trastornos de movilidad intestinal,

así como en pacientes que exhiben inconvenientes relacionados con translocación bacteriana (aquellos individuos a los que se les ha implantado catéteres venosos centrales o válvulas cardiacas) (Isibashi y Yamazaki, 2001), en los cuales la eficacia de los probióticos no está totalmente establecida. Aunque muchos estudios apoyan firmemente la idea del papel potencial de los probióticos como agentes inmunomoduladores, sin embargo otros muchos muestran un gran escepticismo sobre la interpretación de los resultados obtenidos y las conclusiones que se han aportado hasta el momento. Algunos de estos estudios plantean conflictos de diseño experimental que se fundamentan en la carencia de controles apropiados, rutas de administración incorrectas, utilización de ensayos *in vitro* y una duración corta de los ensayos *in vivo* (Meydani y Ha, 2000). En este artículo vamos a tratar a los probióticos desde un enfoque crítico mostrando por supuesto las ventajas acreditadas de los mismos en el tratamiento y prevención de diversas patologías, pero también las limitaciones de estos microorganismos. Adicionalmente uno de los objetivos planteados es el de evaluar su eficacia frente a un proceso patológico, y especialmente describir los riesgos derivados de la administración de los probióticos en situaciones muy especiales.

EFICACIA DE LOS PROBIÓTICOS EN LA SALUD HUMANA

Los probióticos han sido aplicados en el tratamiento y en la prevención de numerosos desórdenes que abarcan

desde la gastroenteritis hasta la neoplasia intestinal. Uno de los aspectos en los que más se ha incidido para demostrar los aspectos beneficiosos de estos microorganismos se centra en el tratamiento o en la prevención de las diarreas, de manera que la administración de probióticos

reduce el tiempo medio de esta sintomatología. Sin embargo, estos microorganismos se han aplicado también en el tratamiento de diarreas asociadas con el consumo de antibióticos, infecciones gastrointestinales, enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), pouchitis, cáncer de colon, infec-

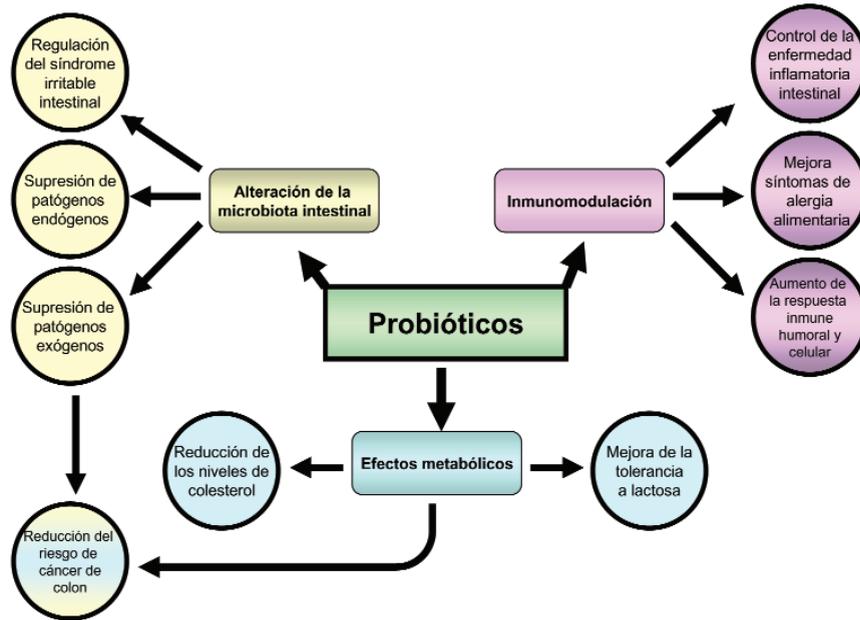


Figura 1. Efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud.

ción con *Helicobacter pylori*, eczema atópico, infecciones urogenitales, etc. En la literatura científica encontramos una gran variedad de resultados en función de los criterios y condiciones de utilización. Los estudios llevados a cabo hasta el momento se diferencian en las especies utilizadas, el número de microorganismos por dosis o la vía de administración. Es importante resaltar que muchas investigaciones resaltan la eficacia de los probióticos en la resolución de determinados desórdenes para acortar el curso de la diarrea en niños y en adultos, en el tratamiento de la pouchitis y en la estimulación de la función inmune. Sin embargo, no existen datos sólidos que evidencien la eficacia de los probióticos en el tratamiento de la colitis ulcerosa o en el síndrome irritable intestinal. Por último no existe hasta el momento ningún resultado que evidencie de forma definitiva la eficacia de los probióticos en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*, enfermedad de Crohn, intolerancia a la lactosa o en la reducción de los factores de riesgo cardiovasculares (Tabla 2).

PAPEL DE LOS PROBIÓTICOS EN DIFERENTES PATOLOGÍAS: ASPECTOS CRÍTICOS

Como se ha indicado con anterioridad, los probióticos son capaces de regular la colonización de muchos microorganismos en el aparato gastrointestinal, pero estos microorganismos también ejercen una importante acción reguladora en determinados estados patológicos. Así, en procesos en los que se produce un incremento de



Elena Puertollano es Licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada (2003) y becaria predoctoral FPU del Ministerio de Educación y Ciencia. En la actualidad está finalizando su tesis doctoral, basada en la evaluación de la acción del probiótico *Lactobacillus plantarum* sobre la respuesta inmune.



María Ángeles Puertollano es Doctora en Biología por la Universidad de Jaén (2004) y en la actualidad es investigadora contratada del programa Juan de la Cierva en el Instituto del Frío de Madrid (CSIC), donde desarrolla estudios sobre el efecto que la obesidad y el sobrepeso en adolescentes ejercen sobre el sistema inmune.



Gerardo Álvarez es Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada (1983), diplomado en Sanidad por la Escuela Nacional de Sanidad y Especialista en Microbiología y Parasitología. Ha sido Profesor Titular de la Universidad de Granada y también de la Universidad de Jaén donde actualmente desempeña el cargo de Catedrático de Microbiología. En la actualidad dirige el grupo de investigación CTS-105.



Manuel Antonio de Pablo es Doctor en Biología por la Universidad de Jaén (1995) y Premio Extraordinario de Doctorado de esta Universidad en 1997. En 1998 realizó una estancia postdoctoral en el *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) de París. En la actualidad es Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Jaén. Además es evaluador de varias publicaciones entre las que destacamos *The Journal of Infectious Diseases*, *Peptides* y *British Journal of Nutrition*.

Este grupo posee una dilatada experiencia investigadora en el campo de la inmunonutrición, especialmente sobre los efectos de distintas dietas lipídicas en la respuesta inmune frente a bacterias patógenas (área en la que el grupo es un referente nacional e internacional) y, más recientemente, en la acción de probióticos sobre el sistema inmune. Desde su creación en enero de 1995 el grupo ha participado en seis proyectos de I+D, publicado más de 60 trabajos en revistas nacionales e internacionales y participado en numerosos congresos nacionales e internacionales con 45 comunicaciones. Asimismo, el grupo ha elaborado cinco libros y cinco capítulos de libro.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA (CTS-105) DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

la permeabilidad de la mucosa intestinal, la administración de lactobacilos es capaz de reducir la permeabilidad. Otra característica importante de estos microorganismos para inhibir el crecimiento de patógenos se centra especialmente en la producción de bacteriocinas, en la reducción

del pH intraluminal, producción de peróxido de hidrógeno o biosurfactantes. Por lo tanto, la competencia con otros microorganismos reduce la adherencia de bacterias patógenas en el epitelio intestinal y en definitiva inhibe el crecimiento de patógenos.

Sin embargo, no todos los probióticos ejercen los mismos efectos sobre la salud humana, por ello durante los últimos años uno de los objetivos prioritarios es el de examinar de forma exhaustiva los diferentes criterios y las distintas especies que cumplen la definición de probiótico, así como el de evaluar los posibles riesgos que puedan derivarse tras la administración de estos microorganismos. Los probióticos se han demostrado muy efectivos en el tratamiento de la enteritis viral aguda infantil, pero las diferentes especies de probióticos analizadas han mostrado distintos grados de eficiencia. Los últimos estudios han demostrado que la administración de probióticos ha sido muy eficaz en los procesos de rehidratación en niños y adultos que sufren diarrea aguda. Diferentes estudios han evidenciado la eficacia de los probióticos en el tratamiento de diarreas asociadas a la administración de antibióticos, sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no han confirmado de manera exhaustiva que la administración de probióticos interfieran con la colonización y crecimiento de *Clostridium difficile* como microorganismo responsable de diarreas asociadas a la administración de antibióticos. Por otra parte, los probióticos sí se han demostrado eficaces en la prevención y tratamiento de ataques moderados en la colitis ulcerosa, aunque diferentes discre-

Patología	Acción
Prevención de diarrea infantil y en adultos	+
Tratamiento de diarrea infantil y en adultos	++
Diarrea asociada a antibióticos	++
Vaginosis	-
Interferencia en el crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	-
Colitis ulcerosa	-
Enfermedad de Crohn	-
Prevención de pouchitis	++
Efectos sobre el síndrome irritable intestinal	-
Prevención de enfermedades cardiovasculares	-
Mejora de la respuesta inmune	+

Tabla 2. Eficacia de los probióticos en diversas patologías.
++ Fuerte evidencia, + Evidencia moderada,
- Estudios inadecuados

Adaptado de Floch et al., 2006.

pancias han sido exhibidas en los últimos años que apoyen la utilización de probióticos en la terapia de la colitis ulcerosa. Este último argumento es también aplicado a la enfermedad de Crohn, de hecho no existen estudios suficientes que demuestren su eficacia en el tratamiento de esta enfermedad (Tamboli *et al.*, 2003).

Pouchitis

Sin embargo, diferentes observaciones han demostrado que la administración de una mezcla de probióticos altamente concentrados o probióticos multicepa (VSL#3, constituido por cuatro cepas diferentes de lactobacilos) es significativamente eficaz en la prevención de la pouchitis, una enfermedad caracterizada por la inflamación no específica del reservorio íleo anal después de la anastomosis íleo-anal que se practica en situaciones de colitis ulcerosa. Por el contrario, en el caso de la diverticulitis o formación de bolsas anormales en las paredes del colon, pocos estudios han sido realizados para poder establecer conclusiones sobre los efectos producidos en esta patología.

Vaginosis

Otro de los capítulos en donde se ha valorado la eficacia de los probióticos es la resolución de la vaginosis una infección vaginal que causa importante morbilidad ginecológica. Estudios llevados a cabo en ensayos *in vitro* han sugerido que ciertas cepas de lactobacilos son capaces de inhibir la adherencia de *Gardnerella vaginalis* al epitelio. Algunas observaciones han demostrado que la administración de diversas cepas de lactobacilos redujo la recurrencia de vaginosis bacteriana y el restablecimiento de la microbiota normal. Sin embargo, otras investigaciones no han encontrado diferencias significativas en las tasas de remisión de vaginosis después de la instilación vaginal de lactobacilos cuando los resultados se compararon con el grupo placebo. Por lo tanto, aunque los resultados respecto a la eficiencia de la administración de lactobacilos en el tratamiento de vaginitis bacteriana son muy positivos, no puede llegarse a conclusiones sólidas que permitan afirmar que los probióticos puedan ser utilizados con este objetivo.

Infección por *Helicobacter pylori*

La infección producida por *Helicobacter pylori* está asociada con gastritis, úlceras gastroduodenales y en general enfermedades de naturaleza gástrica. Algunas investigaciones han demostrado un efecto beneficioso de la utilización de probióticos en la infección promovida por *H. pylori*. Aunque un efecto directo sobre *H. pylori* ha sido descrito, estos se han obtenido a partir de estudios *in vitro* o investigaciones llevadas a cabo en animales, por lo que en la actualidad no podemos afirmar con rotundidad que los probióticos puedan considerarse como una alternativa potencial en el tratamiento frente a la infección promovida por *H. pylori*. Sin embargo, lo que sí han revelado algunos estudios es que la administración de probióticos

puede disminuir los efectos adversos producidos en el paciente y atribuidos a la utilización de antibióticos en dosis moderadas o altas, lo cual favorece que los pacientes completen el tratamiento antimicrobiano.

Síndrome irritable intestinal

El síndrome irritable intestinal está constituido por un conjunto de patologías relacionadas con la funcionalidad intestinal, tales como dolor abdominal, alta frecuencia en la defecación y/o estreñimiento. Diferentes estudios han demostrado alteraciones en la composición de la microbiota intestinal. Así una reducción de lactobacilos, *E. coli* y bifidobacterias y un incremento de anaerobios fecales ha sido detectado en individuos que sufren esta patología. La eficacia de la administración de probióticos no ha sido demostrada en estos pacientes; si bien algunos estudios reflejan una reducción significativa de los síntomas tras la ingestión de una combinación de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium breve*, otros por el contrario muestran que la utilización de VSL 3 no fue particularmente efectivo, así como la administración de *L. plantarum* 299V. La heterogeneidad de los estudios hace muy difícil establecer conclusiones sobre los efectos de los probióticos en el síndrome irritable intestinal.

Metabolismo lipídico

La administración de probióticos puede afectar a los niveles de colesterol en plasma y consecuentemente puede alterar la incidencia de enfermedades coronarias. Al parecer los probióticos interfieren con la absorción de colesterol y con la producción de metabolitos que afectan a los niveles sistémicos de lípidos en sangre. Aunque los estudios llevados a cabo hasta el momento han observado una reducción del colesterol en aquellos individuos que mantienen niveles altos de colesterol en sangre, los resultados obtenidos no permiten establecer conclusiones claras.

Transplantes de órganos

Por otra parte en pacientes sometidos a un transplante hepático se han empleado simbióticos (administración de un producto que contiene probióticos y prebióticos) y tras su aplicación se ha encontrado una disminución significativa en la incidencia de infecciones postoperatorias en estos pacientes.

RIESGOS RELACIONADOS CON LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS

Los principales requisitos para la consideración de un microorganismo como probiótico son la efectividad y la seguridad. Teniendo particularmente en cuenta el considerable incremento en el uso de probióticos en los últimos años es imprescindible evaluar la seguridad de los mismos, especialmente cuando son administrados en estados clínicos muy diversos.

Las características para que un probiótico sea efectivo en el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales son: i) la resistencia a los enzimas pancreáticos, ii) la tolerancia a ácidos y sales biliares, y iii) la capacidad para prevenir la adherencia y el establecimiento, colonización y replicación de patógenos en el aparato gastrointestinal. Atendiendo a estos criterios no todas las cepas de probióticos pueden constituirse como candidatos para denominarse con este término.

En general, los estudios realizados hasta el momento han podido corroborar que la administración de probióticos especialmente de aquellos pertenecientes al género *Lactobacillus* es segura en personas sanas, pero no ocurre lo mismo en individuos que muestran alguna patología. Todos los casos de bacteriemia descritos hasta el momento se han producido en pacientes que presentaban alguna patología como inmunosupresión, endocarditis o una enfermedad crónica. La gran mayoría de estos casos se han resuelto de forma satisfactoria después de la administración de antibióticos, pero en otros casos el paciente ha derivado hacia un shock séptico (Hennequin *et al.*, 2000). Si consideramos los aspectos favorables atribuidos a los probióticos frente a los efectos adversos que puedan ejercer, es evidente que en este sentido podemos corroborar un saldo beneficioso, en donde los riesgos serían muy similares a los inducidos por las cepas de la propia microbiota. Sin embargo, es conveniente tener presente que existen grupos de riesgo muy específicos en los cuales hay que prestar una mayor precaución a la hora de administrar probióticos y estos serían los niños prematuros y pacientes inmunodeprimidos. Basándonos en las diferentes características de los casos clínicos, podemos observar factores de riesgo principales y factores de riesgo secundarios asociados a la administración de probióticos, de manera que la presencia de un factor principal o la presencia de más de un factor secundario debe de constituir una medida de

cautela en la aplicación de probióticos a determinados grupos de riesgo (Tabla 3).

CONTROL DE CALIDAD Y VIABILIDAD

En la actualidad los diferentes productos probióticos que están siendo comercializados varían enormemente en múltiples aspectos como son tipos de microorganismos, densidad bacteriana, propiedades de adhesión de las diferentes cepas, estabilidad de resistencia frente a ácidos y sales biliares y viabilidad después de su procesamiento y almacenamiento. Una gran cantidad de productos obtenidos del mismo fabricante han sido examinados y los resultados han revelado diferencias en las propiedades puestas de manifiesto en diferentes tiempos, mostrando gran variabilidad de viabilidad entre diferentes lotes de la misma cepa.

Los probióticos son considerados como un producto de alimentación (un suplemento en la dieta) por la FDA (*Food and Drug Administration*), y por tanto no están sujetos a las mismas regulaciones que los productos farmacéuticos. Los probióticos necesitan ser evaluados en ensayos clínicos multicéntricos para valorar su eficacia y examinar sus patrones de seguridad, tal y como nos referíamos con anterioridad. Uno de los problemas más importantes relacionados con el control de la calidad y viabilidad de los probióticos es que la concentración y el estado de los microorganismos varían significativamente entre los diferentes productos estudiados. Sin embargo es imposible garantizar las dosis propuestas por los proveedores, para ello debería llevarse a cabo una verificación microbiológica. Este problema puede ser extendido a los probióticos multicepa, los cuales pueden originar un estado de antagonismo bacteriano y reducir la supervivencia de los microorganismos durante su procesamiento y fundamentalmente durante su almacenamiento.

Factores de riesgo principales

Grave inmunodeficiencia agravada por estados de desnutrición y/o cáncer
Neonatos prematuros

Factores de riesgo secundarios

Uso de catéteres venosos centrales
Barrera epitelial intestinal ineficaz (diarreas severas, inflamación intestinal)
Administración de probióticos por yeyunostomía
Administración simultánea de antibióticos de amplio espectro a los cuales los probióticos muestran resistencia (ej. *Lactobacillus* y vancomicina)
Probióticos con capacidad de alta adhesión a la mucosa intestinal o patogenidad conocida (ej. *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces boulardii*)
Enfermedad valvular (únicamente para *Lactobacillus*)

Tabla 3. Factores de riesgo implicados en la administración de probióticos.
Adaptado de Boyle *et al.*, 2006.

CONCLUSIONES FINALES

Es evidente que la administración de probióticos promueve efectos beneficiosos sobre la salud humana, sin embargo diferentes observaciones clínicas han indicado que en algunos casos muy particulares la administración de probióticos debe realizarse de forma cuidadosa, especialmente cuando se suministran a determinados grupos de riesgo. Hasta el momento, los numerosos estudios de carácter clínico realizados tras la administración de diferentes tipos de probióticos han determinado que estos microorganismos son efectivos en la prevención y en el tratamiento de algunas enfermedades (diarrea infantil y en adultos, diarreas asociadas a antibióticos, pouchitis y modulación del sistema inmune), mientras que no ejercen ningún efecto en la resolución de determinados desórdenes (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome irritable intestinal o prevención de patologías cardiovasculares), ya que muchos de los estudios están basados en evaluaciones *in vitro*. Además no existen aun muchos estudios de naturaleza clínica que evidencien un eficiente papel de los probióticos en la mejora de la sintomatología. Otro de los aspectos que hay que tener en cuenta es el relacionado con la seguridad y la viabilidad de los probióticos, factor que es de crucial importancia en la administración de los mismos en determinadas situaciones clínicas. Futuros estudios deben confirmar la eficacia de los probióticos en la prevención o en el tratamiento de determinadas patologías y valorar los riesgos de los mismos cuando son administrados a determinadas poblaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Boyle RJ, Robins-Browne RM y Tang ML. 2006. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* **83**: 1256-1264.
- FAO/WHO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
- Floch MH, Madsen KK, Jenkins DJ, Guandalini S, Katz JA, Onderdonk A, Walker WA, Fedorak RN y Camilleri M. 2006. Recommendations for probiotic use. *J Clin Gastroenterol* **40**: 275-278.
- Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, Viard JP, Ricour C, Jacquemin JL y Berche P. 2000. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 16-20.
- Ishibashi N y Yamazaki S. 2001. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* **73**: 465S-470S.
- Meydani SN y Ha WK. 2000. Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr* **71**: 861-872.
- Sartor RB. 2006. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* **126**: 1620-1633.
- Tamboli CP, Caucheteux C, Cortot A, Colombel JF y Desreumaux P. 2003. Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. **17**: 805-820.
- Tannock GW. 1999. Analysis of the intestinal microflora: A renaissance. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 265-278.

Elecciones a Junta Directiva

Querido amigo/a y compañero/a:

Corresponde a finales del presente año la renovación parcial de la Junta Directiva de la SEM en los cargos de Presidente electo, Tesorero (-a) y tres Vocales. **Solamente el cargo de Tesorero (-a) deberá recaer en una persona residente en Madrid** (Arts. 11 y 15 de nuestros Estatutos).

Según el Art. 14 se pueden efectuar propuestas para cualquiera de estos cargos por **un mínimo de 20 Socios** y es potestativo de la Junta Directiva proclamar las candidaturas recibidas, y si lo estima oportuno, completarlas o proponer otras.

La fecha límite de recepción de propuestas será el **30 de septiembre de 2008**. A continuación, la Junta Directiva efectuará la reunión preceptiva para la proclamación de candidaturas, estableciendo seguidamente el periodo de votación.

Por la Junta Directiva,
El Secretario

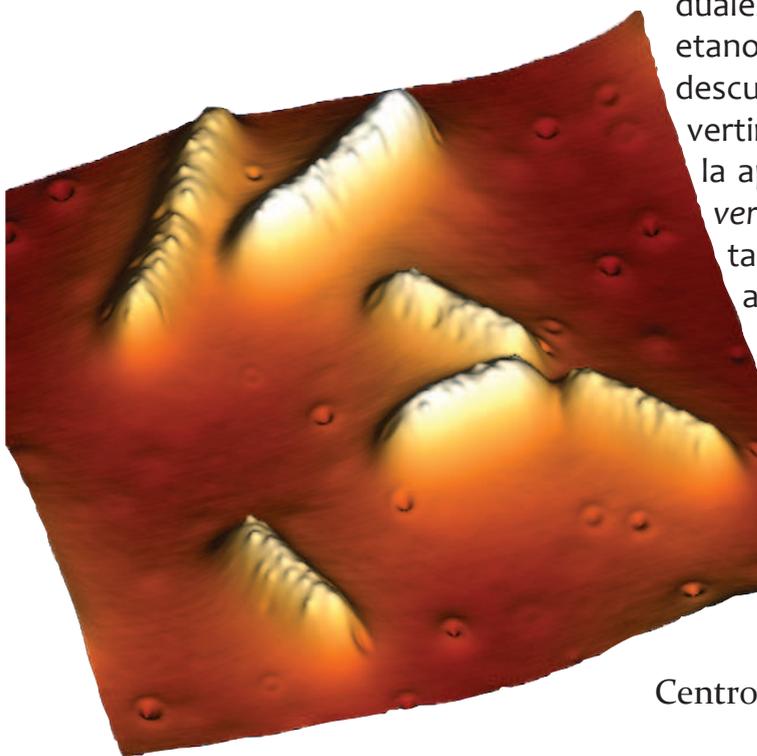


Humberto Martín Brieua

Bacterias productoras de electricidad

Del subsuelo a la pila de combustible

El uso incontrolado de los combustibles fósiles ha disparado una crisis energética global, despertando el interés por obtener fuentes de energía renovables con el mínimo impacto sobre el medio ambiente. Hasta ahora el compromiso energético de la microbiología ambiental se había dirigido a optimizar la producción de hidrógeno, aprovechar el metano generado en los tratamientos de aguas residuales, o generar biocombustibles como el etanol o el biodiésel. Sin embargo, el reciente descubrimiento de bacterias capaces de convertir la energía química en eléctrica sugiere la aparición de una nueva forma de *energía verde*, cuya explotación supondrá un importante reto biotecnológico en los próximos años.



Abraham Esteve-Núñez
Laboratorio de Ecología Molecular
Centro de Astrobiología (CSIC-INTA), Madrid
estevena@inta.es

¿CÓMO CONVERTIMOS LA ENERGÍA QUÍMICA EN ELÉCTRICA UTILIZANDO BACTERIAS?

Aunque este artículo terminará con una sección especial dedicada al diseño y aplicaciones de esta nueva tecnología, he creído conveniente presentar unos principios básicos del proceso electroquímico antes de entrar en los estrictamente microbiológicos.

La conversión de energía química en eléctrica es posible en ciertos dispositivos electroquímicos denominados **células o pilas de combustible (Fuel Cells)**, donde la electricidad se obtiene a partir de una fuente externa de combustible química que suele ser hidrógeno o etanol. Algunos de los vehículos de transporte público de nuestras ciudades utilizan ya esta tecnología limpia que tiene al inocuo vapor de agua como único residuo. Una variante reciente de esta célula de combustible es la **célula de combustible microbiana (Microbial Fuel Cell, MFC)** (Logan *et al.*, 2006). En las MFC se utilizan microorganismos para oxidar el combustible, materia orgánica, y transferir los electrones a un electrodo (ánodo), que está conectado a un cátodo a través de un material conductor que contiene una resistencia. Las cámaras que albergan estos electrodos, la anódica (anaerobia) y la catódica (aerobia), están comunicadas por una membrana de intercambio catiónico que permite el paso de protones. De esta forma, los protones generados en la oxidación de la materia orgánica se combinan con oxígeno y con los electrones que llegan al cátodo para formar agua (Figura 1a). Existe también la posibilidad de alojar una pila de combustible en una hábitat natural y obtener energía eléctrica a partir de las comunidades microbianas naturales. En este caso, el diseño recibe el nombre de **célula de combustible sedimentaria** y requiere el enterramiento del ánodo en un sedimento anaerobio que hace las veces de cámara anódica, mientras que el cátodo queda expuesto en la fase acuosa aeróbica que cubre el sedimento (Figura 1b).

¿QUÉ TIPO DE BACTERIAS PUEDE GENERAR ELECTRICIDAD?

Como suele ocurrir con muchas cuestiones científicas que hoy nos parecen novedosas, las primeras observaciones tuvieron lugar mucho tiempo atrás. Así, el primer ejemplo de actividad eléctrica con microorganismos fue mostrado por Potter en 1910; en sus experimentos recurrió a cultivos de *E. coli* y electrodos de platino para generar corrientes eléctricas que por su pequeña magnitud pasaron desapercibidas para la comunidad científica. Este tipo de procesos no despertó el interés hasta la década de los años ochenta, con la utilización de mediadores redox solubles que aumentaban la producción de corriente y la potencia de estos sistemas. Los mediadores redox son compuestos solubles que actúan transportando los electrones desde la bacteria hasta el electrodo, reoxidándose y quedando disponibles de nuevo para ser reducidos por los microorganismos. Normalmente son de naturaleza

Abraham Esteve Núñez (Murcia, 1972) se licenció en Bioquímica por la Universidad de Murcia (1995) y se doctoró en Bioquímica, con premio extraordinario, por la Universidad de Granada (2000). Su proyecto de tesis doctoral, bajo la dirección del Dr. Juan Luis Ramos, fue realizado en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), donde estudió el metabolismo anaerobio del nitroaromático explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) por bacterias del género *Pseudomonas*. Financiado por una *European Science Foundation fellowship* realizó una estancia en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Konstanz (Alemania), donde identificó por primera vez la respiración microbiana de nitroaromáticos.



Posteriormente, realizó una estancia postdoctoral en el grupo del Dr. Derek Lovley, en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Massachusetts (Amherst, USA, 2001-2005). Su investigación se centró en el estudio de *Geobacter sulfurreducens*, un microorganismo de gran relevancia ambiental por su capacidad para respirar hierro en el subsuelo. El objetivo de esta línea de investigación fue combinar estudios básicos de fisiología microbiana en quimiostatos con técnicas de genómica funcional, proteómica y el uso de un modelo celular *in silico*, con el fin de elucidar cómo *Geobacter* adapta sus redes metabólicas para optimizar la reducción de metales. En la actualidad desarrolla su actividad científica como investigador contratado en el Centro de Astrobiología (CSIC-INTA) de Madrid. Sus principales líneas de investigación son: i) estudiar los aspectos moleculares que intervienen en la respiración microbiana de aceptores insolubles, utilizando como modelo la interacción *Geobacter*-electrodo, y ii) explorar nuevas aplicaciones en el campo de las células de combustible microbianas.

metalorgánica o colorantes, como el rojo neutro, el azul de metileno, la tionina, la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, o incluso el Fe (III)-EDTA. Estos compuestos presentan cierta toxicidad por lo que su aplicación en MFCs se ve limitada por cuestiones ambientales.

Los análisis de comunidades microbianas asociadas a los ánodos de las MFC muestran una gran biodiversidad de géneros bacterianos dependiendo de la naturaleza del inóculo, del combustible y del tipo de MFC utilizada (Logan y Regan, 2006). A pesar de ello, en la mayoría de los casos no podemos asegurar qué organismo muestra una participación activa en el proceso electrogénico ya que parte de esa población recurre probablemente a metabolismos alternativos como fermentaciones del combustible utilizado, y el ánodo es sólo un soporte físico sobre el que crecer. En cambio, cuando se utilizan pilas sedimentarias, tanto en sedimentos marinos como de agua dulce, sí parece existir un consenso que identifica a las δ -proteobacterias, y en concreto a la familia *Geobacteraceae*, como los microorga-

nismos dominantes, con probada actividad electrogénica cuando se ensayan utilizando cultivos puros.

La gran revolución en el campo de las MFC se ha producido en el último lustro, con el descubrimiento de **microorganismos electrogénicos** que son capaces de transferir los electrones al ánodo en ausencia de mediadores redox artificiales (Lovley, 2006). De esta manera, se eliminan los problemas de toxicidad en los dispositivos electroquímicos y los medios utilizados quedan restringidos al combustible orgánico que se desee utilizar y al microorganismo que actúe como catalizador biológico. Podemos distinguir dos tipos de bacterias electrogénicas, aquellas que producen sus propios mediadores redox, que son secretados al medio y reaccionan con el electrodo, y aquellas que interactúan de forma directa con el electrodo sin mediador soluble alguno. Aunque se ha probado la existencia de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* electrogénica productora de fenazinas como mediadores redox, el principal representante de este grupo corresponde a las bacterias reductoras de Fe (III) del género *Shewanella*. Un reciente estudio publicado en los *Proceedings of the National Academy of Sciences* parece haber resuelto el enigma de la actividad electrogénica de *Shewanella*, al identificar a las riboflavinas secretadas por los biofilm como los mediadores redox que establecen la comunicación entre bacteria y electrodo (Marsili et al., 2008). Otras bacterias con probada actividad electrogénica son *Rhodospirillum rubrum*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium butyricum* y *Enterococcus gallinarum*, si bien no existe información sobre la forma en que transfieren los electrones al electrodo. Por último, estarían aquellas bacterias capaces de transferir los electrones por contacto directo con el ánodo, siendo el género *Geobacter* el modelo mejor estudiado dada la disponibilidad de cultivos puros y su dominancia dentro de las comunidades microbianas electrogénicas (Figura 1c).

GEOBACTER COMO MODELO DE ELECTROGÉNESIS

Este tipo de bacterias habita de forma natural en el subsuelo y durante millones de años han utilizado los óxidos de hierro insolubles como aceptores de electrones para la oxidación de la materia orgánica. Los mecanismos responsables de establecer una comunicación redox entre la bacteria y la superficie de los óxidos de hierro han contribuido a “dar forma” a la corteza terrestre, y comprenderlos constituye uno de los retos actuales en el campo de la microbiología ambiental. Esta habilidad microbiana fue probablemente lo que, al comienzo de esta década, llamó la atención del Departamento de Energía estadounidense (DOE, USA), convirtiéndola en una de las estrellas del ambicioso proyecto científico *Genomes to Life*, dedicado a impulsar el estudio de aquellos sistemas vivos con aplicaciones en el campo de la energía. La apuesta de la agencia gubernamental era segura; desde que *Geobacter* fue descubierta por Derek Lovley en un sedimento del río Potomack (Washington, 1987) la bacteria no ha dejado de sorprendernos. A su capacidad para producir magnetita en los ambientes sedimentarios terrestres siguió el descubri-

miento de la respiración de uranio, la biodegradación anaerobia de compuestos aromáticos derivados del petróleo, la respiración de ácidos húmicos en ambientes naturales, la respiración de electrodos conductores con la consiguiente producción de electricidad y la identificación de pili conductores (*nanowires*) como posible mecanismo de transferencia electrónica sobre óxidos de hierro. Todos ellos han llegado a nosotros a través de las páginas de *Nature* y *Science* durante los últimos 20 años. Cuando me incorporé al equipo del Dr. Lovley en 2001, apenas había un par de artículos sobre la fisiología del metabolismo central de *Geobacter*, pero el impulso del Departamento de Energía aceleró de forma determinante la investigación de este microorganismo, haciéndolo traspasar las fronteras biogeoquímicas en la que estaba confinado. En un período relativamente corto de tiempo se secuenció su genoma, se abordó un análisis transcripcional mediante *microarrays* de ADN, y se analizó su proteoma. En paralelo, se optimizó el cultivo de *Geobacter* en quimiostatos lo que permitió estudiar el metabolismo redox en condiciones de relevancia ambiental (Esteve-Núñez et al., 2005), pero también ofrecer la reproducibilidad que el análisis genómico funcional y proteómico requerían. Además, el estudio del metabolismo en quimiostatos, junto a la secuenciación del genoma, permitió la construcción de un modelo celular *in silico*, y con ello la entrada del microorganismo en una nueva disciplina: la biología de sistemas. La modelización del metabolismo central de esta bacteria (Mahadevan et al., 2006) fue desarrollada por la empresa *Genomatica* (San Diego, USA), fundada por el experto en bioingeniería de procesos B. Palsson, y cuya web (www.genomatica.com) es de visita obligada para estar al día en el campo de la modelización celular. Este tipo de modelos ofrece la distribución de flujos metabólicos de la célula (metaboloma) bajo unas determinadas condiciones fisiológicas elegidas por el investigador, permitiendo obtener predicciones o incluso analizar la distribución de flujos en mutantes virtuales. De especial relevancia han sido las predicciones obtenidas para el metabolismo de *Geobacter* cuando se encuentra limitado en aceptor de electrones, unas condiciones que simulan situaciones como la biorrecuperación de acuíferos contaminados con uranio, o como la producción de electricidad en las MFC donde el combustible (acetato) está en exceso frente a la disponibilidad del electrodo que hace las veces de aceptor.

La gran versatilidad de *Geobacter* para transferir electrones fuera de la célula (flujo exocelular) ha sido siempre relacionada con la presencia de citocromos C. No en vano es el organismo secuenciado con mayor número de genes codificantes de estos transportadores de electrones (más de cien). Para estudiar el papel de estas proteínas en el flujo exocelular de electrones recurrimos a la espectroscopía de fluorescencia, a la vez que desarrollamos y patentamos un nuevo método no invasivo, que permite monitorizar *in vivo* el estado redox de estas proteínas. Esta metodología permite el uso de fibra óptica, y por tanto la detección remota de la bacteria basada en su particular espectro de fluorescencia (Esteve-Núñez et al., 2008).

Lo que hace especial a *Geobacter* es la presencia de una red de citocromos C multihemo (algunos de ellos albergan hasta 27 grupos hemo) que, distribuidos entre la membrana interna, periplasma y membrana externa, permitirían transferir electrones desde el citoplasma hasta el exterior de la célula para respirar sustratos extracelulares como el Fe (III). O al menos éste ha sido tradicionalmente el papel otorgado a estas abundantes proteínas en *Geobacter*. No obstante, una serie de hechos ponen en duda que la respiración de Fe (III) extracelular sea la única razón de estas extensas redes multihemo. Expresar un centenar de citocromos distintos supone un coste energético elevado para la célula, que estaría plenamente justificado si el objetivo final es la respiración de sustratos extracelulares; pero ¿cómo interpretar entonces que *Geobacter* sintetice esta misma red de citocromos cuando respira sustratos solubles como fumarato o nitrato, cuya reducción tiene lugar en la membrana interna? Por otro lado, el estudio del genoma de otra δ -proteobacteria respiradora de Fe (III), *Pelobacter carbonilus*, mostró la casi ausencia de citocromos C, lo que demuestra que estas redes multihemo no son necesariamente un requisito para respirar sustratos extracelulares.

¿Para qué produce entonces *Geobacter* tantos citocromos C? Con la intención de esclarecer este punto, realizamos una serie de experimentos que sugerían cómo, en ausencia de otros aceptores de electrones, esta red multihemo podía actuar como sumidero de electrones en la célula, comportándose como un “capacitor biológico” (Esteve-Núñez *et al.*, 2008). Se ha estimado que la red de grupos hemo podría albergar hasta casi 20 millones de electrones por célula, lo que le permitiría consumir el poder reductor del citoplasma (como si de una respiración se tratase), al tiempo que mantendría el gradiente protonmotriz y por tanto la capacidad para producir ATP o hacer rotar el flagelo. La presencia del flagelo es imprescindible para la respiración de óxidos de Fe (III) en *Geobacter*, probablemente para desplazarse de una partícula sólida a otra, una vez agotado el óxido respirable. De este modo, la red de citocromos bien podría conferirle a *Geobacter* un tiempo de motilidad extra que podría ser una interesante ventaja frente a otros respiradores de hierro de su mismo hábitat natural.

Parece razonable pensar que todo este mecanismo de conducción exocelular de electrones tenga algún papel en la capacidad electrogénica de *Geobacter* que le permita oxidar el acetato y transferir a electrodos los electrones generados, con una eficiencia coulombimétrica que se ha comprobado que supera el 90 %. Efectivamente, la implicación de los citocromos C de *Geobacter* ha sido propuesta, pero hasta ahora, la única evidencia experimental se reducía al estudio de un mutante en un citocromo de membrana externa (OmcS) que, si bien probaba su participación en el proceso de transporte, no aportaba información sobre la íntima comunicación redox entre bacteria y electrodo. Para abordar esta interfase bacteria-electrodo recurrimos a un enfoque multidisciplinar, donde la electroquímica tuviera un mayor peso y se concibiera al microor-

ganismo como un elemento redox más. Así, en los últimos dos años hemos realizado avances significativos fruto de la estrecha colaboración entre el Centro de Astrobiología y el Grupo de Electroquímica de la Universidad de Alicante. En primer lugar, mostramos cómo los elementos redox sobre la superficie de *Geobacter* se ven alterados por el potencial de polarización del electrodo, y cómo estos cambios son reversibles e identificables por técnicas clásicas electroquímicas como la voltametría cíclica (Busalmen *et al.*, 2008). Más recientemente, hemos recurrido a las técnicas de espectroscopía de infrarrojo más sensibles (SEIRAS y SNIFTIRS) para estudiar, por primera vez y de forma detallada, los primeros nanómetros en la interfase generada entre una célula viva (*Geobacter*, con su actividad electrogénica intacta) y un electrodo de oro (Busalmen *et al.*, 2008a). El estudio, que acaba de ser aceptado por la prestigiosa revista de química *Angewandte Chemie*, no sólo ha demostrado que los grupos hemo de los citocromos C más externos descargan sus electrones de forma directa sobre la superficie del electrodo (Figura 2), sino que además, supone la presentación de una nueva técnica para estudiar *in vivo* la interacción entre células y materiales conductores, que confiamos hará evolucionar de forma positiva el campo de la bio-nanotecnología.

¿CUÁLES SON LAS APLICACIONES REALES DE LAS CÉLULAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS?

Una vez tratados los microorganismos presentes en las MFC y los mecanismos que utilizan, evaluemos la tecnología y sus posibles aplicaciones. Las MFC son en realidad biorreactores, que albergan la oxidación de un combustible orgánico catalizada por microorganismos. Como en cualquier otro proceso de ingeniería bioquímica, existen distintos diseños que se adaptan a la naturaleza del combustible y a la finalidad del ensayo. Las MFC más sencillas usadas a escala de laboratorio, suelen ser de dos compartimentos y tener forma de H, como la mostrada en la figura 1, pero también las hay planas y tubulares. No obstante, a la hora de escalar el proceso, la búsqueda de reducción de costes y la simplicidad del diseño, aconsejan el uso de MFC de un compartimento único con exposición directa del cátodo al aire. Todos estos diseños permiten tratamientos tanto en condiciones de estanqueidad como en continuo, y las distintas variantes han sido objeto de una reciente revisión (Du *et al.*, 2007). Otro elemento importante en el diseño de estos dispositivos es el material de los electrodos. Aunque el platino produce los mejores resultados, su elevado coste hace que el grafito, en cualquiera de sus variantes (prensado en barra, papel, fieltro, polvo), se haya convertido en el material de referencia. Comparar la eficiencia entre MFCs es complicado, dada la variabilidad de diseños y materiales empleados. No obstante, se ha llegado al consenso de utilizar como magnitud la potencia por unidad de superficie de electrodo (W/m^2) o, en algunos casos, por unidad de volumen de la cámara anódica (W/m^3). Desde el descubrimiento de los microorganismos electrogénicos, la eficiencia de las MFC ha

aumentado más de 1000 veces y en la actualidad se puede lograr una potencia de W/m² frente a los mW/m² obtenidos hace tan sólo unos años. El desarrollo de esta tecnología está todavía en su infancia, por lo que el diseño de dispositivos con menor resistencia interna, el ensayo de nuevos materiales conductores, y el empleo de cepas bacterianas electrogénicas óptimas llevará a MFC de mayor potencia.

Los combustibles que pueden utilizarse para alimentar estas MFC van desde soluciones de compuestos sencillos como el acetato o la glucosa a mezclas complejas ricas en materia orgánica como los residuos vegetales o las presentes en las aguas residuales. Es precisamente la depuración de estas últimas, mediante la utilización de MFC, una de las aplicaciones que más atención está recibiendo en la actualidad (Du *et al.*, 2007). Asimismo, se ha propuesto la adaptación de estas MFC para conseguir, en última instancia, que la corriente eléctrica se emplee en producir hidrógeno dentro del propio reactor (Cheng y Logan, 2007). Estos nuevos dispositivos bioelectroquímicos han sido denominados *Bioelectrochemical Assisted Microbial Reactor* (BEAMR). En ellos, los H⁺ se convierten en los nuevos aceptores de electrones, generándose H₂ en la cámara del cátodo. En la actualidad, y en colaboración con el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá, intentamos sustituir la etapa metanogénica clásica de los tratamientos de aguas residuales por otra bioelectroquímica mediante el uso de bacterias electrogénicas como *Geobacter*, de manera que la depuración microbiana genere la electricidad necesaria para la producción de hidrógeno, un vector energético sin impacto negativo para el medio ambiente. Las MFC sedimentarias, aunque no pueden competir en potencia con las diseñadas para operar como biorreactor, en cambio sí presentan aplicaciones interesantes, ya que son los propios ciclos naturales del carbono los que proporcionan *in situ* una fuente de combustible inagotable. De este modo, es factible alimentar pequeños dispositivos analíticos situados en lugares remotos como fondos marinos o lagos. Algunos de estos han sido diseñados en los laboratorios del Departamento de Defensa estadounidense y se han denominado BUGs (Benthic Unattended Generators, <http://www.nrl.navy.mil/code6900/bug>). Otra variante de pila sedimentaria microbiana, que en la actualidad estoy desarrollando en el Centro de Astrobiología, utiliza el exudado radicular de plantas como combustible natural para bacterias electrogénicas en suelos y sedimentos.

Es importante resaltar que el desarrollo de todas estas tecnologías está todavía en sus comienzos, y que los diseños deben ser estudiados y optimizados para ofrecer

resultados competitivos. No obstante, considero que utilizar microorganismos con fines energéticos debería convertirse en un desafío científico que muestre el compromiso de la ciencia en general -y de la microbiología en particular- por intentar resolver la crisis energética global presente y futura. En el camino para lograr este pragmático objetivo -y por fortuna para los que seguimos creyendo en el valor de la ciencia básica- conseguiremos elucidar uno de los metabolismos más antiguos del planeta: la respiración microbiana anaerobia de aceptores de electrones insolubles.

REFERENCIAS

- Busalmen JP, Esteve-Núñez A y J Feliu. 2008. Electrochemical analysis of the exocellular electron-transfer to graphite electrodes in *G. sulfurreducens*. *Environ Sci Technol.* **42**: 2445-2450.
- Busalmen JP, Esteve-Núñez A, Berná A y J Feliu. 2008. Cytochromes plug electricity-producing bacteria to electrodes. *Angewandte Chemie, en prensa.*
- Cheng S y BE Logan. 2007. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA* **104**: 18871-18873.
- Du Z, Li H y Gu T 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bionergy. *Biotechnol adv* **25**: 464-482.
- Esteve-Núñez A, M Rothermich, M Sharma, y DR Lovley. 2005. Growth of the iron-reducer *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Environ Microbiol* **7**: 641-648.
- Esteve-Núñez A, J Sosnik, P Visconti, y DR Lovley. 2008. Fluorescent properties of c-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Microbiol* **10**: 497-505.
- Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W, y Rabaey K. 2006. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ Sci Technol* **17**: 5181-591.
- Logan BE y JM Regan. 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology* **14**: 512-518.
- Lovley DR. 2006 Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **4**, 497-508
- Mahadevan R, DR Bond, JE Butler, A Esteve-Núñez, MV Coppi, BO Palsson, CH Schilling y DR Lovley. 2006. Characterization of metabolism in the Fe (III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1558-1568.
- Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA y Bond DR. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci. USA* **105**: 3968-3973.

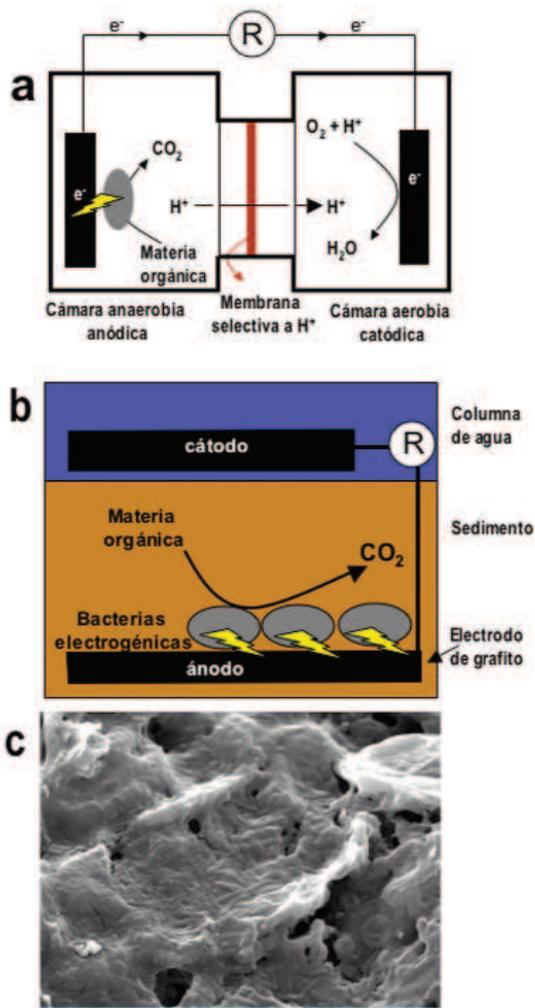


Figura 1. Pila de combustible microbiana (a) y sedimentaria (b). (c) Imagen de SEM de un biofilm electrogénico de *Geobacter sulfurreducens* sobre electrodo de grafito polarizado a 0.6 V.

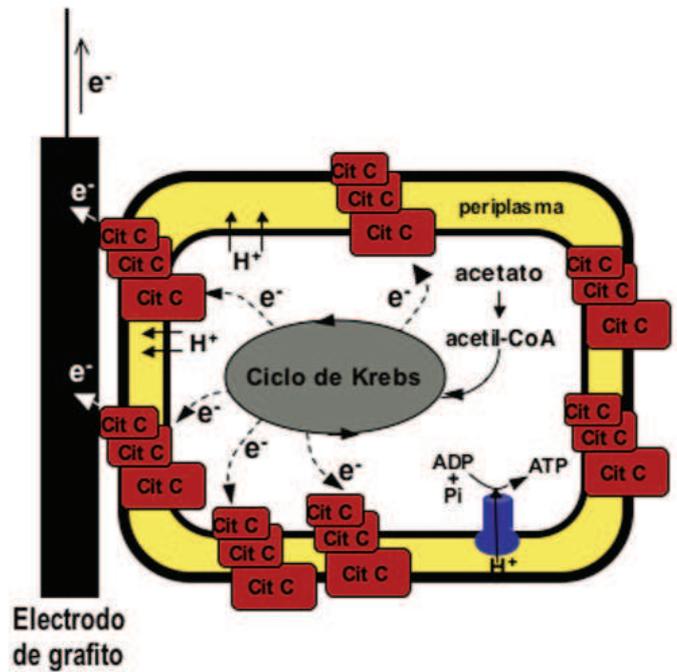


Figura 2. Modelo del metabolismo electrogénico de *Geobacter*. El acetato es completamente oxidado a través del ciclo de Krebs y el poder reductor se emplea en reducir la extensa red de citocromos C multihemo, que conecta el citoplasma con la membrana externa. Los electrones son transferidos de forma directa sobre el electrodo a través de los citocromos más externos. Los cambios redox reversibles en estos citocromos han sido detectados por espectroscopía de infrarrojo. En ausencia de sustrato respiratorio, la red de de citocromos multihemo podría aceptar electrones, actuando como un capacitor que permitiría mantener el gradiente protonmotriz y la síntesis de ATP, para mantener a la célula activa en su búsqueda de nuevos aceptores de electrones.



<http://www.microbiologiaecuador.com>

A QUÉ ESPERAS PARA ENTRAR EN EL SIGLO XXI

entra de lleno en el XXI con
el **material de referencia
bacteriológico**

BACuali

fácil de usar, rápido, seguro,
trazable y cualitativo.



y si lo que buscas es
precisión y medida,

BACuanti

el **material de referencia
bacteriológico**
cuantitativo y certificado
(también para PCR y DNA).

CONTACTA CON NOSOTROS

LABAQUA, S.A.
Pol. Ind. Las Atalayas
C/ Dracma 16-18
03114 Alicante (España)



Tfno. +34 965 10 60 70
Fax +34 965 10 60 80
info@labaqua.com
www.labaqua.com