

Actualidad  SEM

# La taxonomía del siglo XXI

Número 48

Diciembre 2009

# XIV Curso de Iniciación a la Investigación en Microbiología



INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
AGRARIO  
Junta de Castilla y León  
Consejería de Agricultura y Ganadería



Universidad de Burgos

Este curso, organizado anualmente por la SEM, va dirigido a los estudiantes de Ingeniería y Licenciaturas que están en los dos últimos años de carrera, con objeto de estimular en ellos el interés por la investigación en Microbiología. Los profesores invitados impartirán las conferencias propuestas y convivirán con los estudiantes seleccionados, discutiendo con ellos las investigaciones que están desarrollando.

El curso se desarrollará previsiblemente del 6 al 8 de julio de 2010 (ambos inclusive).

La fecha límite para recepción de solicitudes es el 1 de mayo de 2010. Las solicitudes deberán ir acompañadas de un *curriculum vitae* y una carta de presentación de un Profesor de Microbiología.

## Organizadores:

Dr. Juan Ignacio Reguera Useros y  
Dr. David Rodríguez Lázaro

## Dirección de Contacto:

Dr. Juan Ignacio Reguera Useros  
Área de Microbiología,  
Facultad de Ciencias,  
Universidad de Burgos,  
Plaza Misael Bañuelos s/n,  
09001 Burgos.

Tel: 947 258811 - 947 258812

Fax: 947 258831

e-mail: dperez@ubu.es, jiru@ubu.es

Los estudiantes seleccionados recibirán una beca que cubre los gastos de alojamiento y manutención, en régimen de pensión completa.



Patrocinadores:

Fundación Ramón Areces  
Consultoría de Técnicas Ambientales S.L.

# SUMARIO



Autor: Federico Navarro-García.  
Fotografía tomada en el Parque  
Nacional de Yellowstone, EE UU

Visite la página web  
de la SEM:

[www.semico.es](http://www.semico.es)

Encontrará información  
actualizada sobre  
congresos, reuniones,  
cursos y becas

**Socios protectores  
de la SEM:**

**Francisco Soria Melguizo, S.A.  
Merck Sharp & Dohme, 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](mailto:orgra46@orgc.csic.es) o  
[secretaria.sem@semico.es](mailto:secretaria.sem@semico.es)

**Actualidad SEM** Número 48  
Diciembre 2009

<b>Editorial: “La microbiología: E pluribus unum”</b> .....	<b>1</b>
<i>Ricardo Guerrero</i>	
<b>Informes de los grupos</b> .....	<b>2</b>
<b>Tesis doctorales</b> .....	<b>4</b>
Ângela Patrícia da Silva Novais Amorim, Andrea Rodríguez Martín, Amaia González Salgado, Ana González Moreno, Begonya Marcos Muntal, Carolina Galiana Roselló, Blas Blázquez Castiñeira, María Lorenzo Sánchez, Elizabeth Diago Navarro, Francisco Amaro Torres, Esther A. Jiménez Quintana, Efrén Ordóñez del Amo, Mirza Mohammad Reza Sharifmoghadam, Gemma Agustí Adalid, Idoia Ibarburu López, Joseph A. Christie de Oleza, Juan Nogales Enrique, Laura Isabel de Eugenio Martínez, Laura Tomás Gallardo, M <sup>a</sup> Elena Puertollano Vacas, Irene Rodríguez Fernández, María Belén Álvarez Ortega, Mónica Martínez Martínez, María Jose Marín Cuenda, Patricia Fernández Saiz, Miguel Ángel Matilla Vázquez, Nerea García Benzaquén, Patricia Elizaquível Bárcenas, Raquel Tabasco Rentero, Yolanda Pareja Jaime, Santiago Ruiz-Moyano Seco de Herrera, María Luz Vilaríño Becerra, Gonzalo Durante Rodríguez, Miguel Balado Dacosta	
<b>Revisitando el concepto y definición de especie:</b>	
La taxonomía del siglo XXI .....	<b>18</b>
<i>Ramón Rosselló Móra</i>	
<b>Reseñas de congresos:</b> .....	<b>25</b>
• IX Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. <i>Ramón Rosselló Móra</i>	
• Darwin y la vida en condiciones extremas (lecciones de un naturalista). <i>Ricardo Amils</i>	
<b>Nuevos socios de la SEM</b> .....	<b>27</b>
<b>Recursos microbianos: “El caso de la CECT”</b> .....	<b>28</b>
<i>Esperanza Garay</i>	
<b>Congreso de Almería: “De biopelícula en Almería”</b> .....	<b>32</b>
<i>Humberto Martín</i>	
<b>Profetas en su tierra</b> .....	<b>36</b>
<b>Cursos y premios</b> .....	<b>37</b>
<b>Socios que deberían actualizar datos</b> .....	<b>38</b>
<b>Primer Grado de Microbiología de España</b> .....	<b>39</b>

[www.semico.es](http://www.semico.es)

# Junta Directiva de la SEM

## Presidente

### Ricard Guerrero

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 Brieva

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

## Tesorera

### Irma Marín Palma

Departamento de Biología Molecular  
Universidad Autónoma de Madrid  
Cantoblanco, 28049 Madrid. imarin@cbm.uam.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.mas25@gmail.com

### 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

## Vocales

### Jordi Barbé

Dpto. Genética y Microbiología.  
Facultad de Biociencias.  
Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra,  
08290 - Barcelona. Jordi.Barbe@uab.cat

### Rafael Giraldo Suárez

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

### Jesús López Romalde

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

### Emilia Quesada Arroquia

Departamento de Microbiología.  
Facultad de Farmacia. Campus de Cartuja,  
18071 Granada.  
equesada@ugr.es

### Ferran Ribas Soler

Carretera de Capsec, 4.  
17813 La Vall de Bianya, Girona.  
feribsol@hotmail.com

### Antonio Ventosa Ucero

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)

### Amparo Querol

Departamento de Biotecnología de los Alimentos  
Instituto de Agroquímica y Tecnología de  
Alimentos.-46100 Burjassot, Valencia  
aquerol@iata.csic.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.  
tomas.gonzalez@usc.es

### Microbiología de los Alimentos

### Francisco Javier Carballo García

Área de Tecnología de los Alimentos.  
Facultad de Ciencias de Ourense.  
Campus Universitario, s/n. Universidad de Vigo.  
32004 Vigo.  
carbateg@uvigo.es

### Microbiología Molecular

### María Molina Martín

Dpto. Microbiología II.  
Facultad de Farmacia.  
Universidad Complutense de Madrid  
Plaza de Ramón y Cajal s/n.  
28040 Madrid.  
molmifa@farm.ucm.es

### Microbiología del Medio Acuático

### Juan José Borrego García

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

### 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@ibvf.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.

ISSN: 1888-5500

Depósito Legal: 36180-1986

Maquetación e Impresión: Diseño y Control Gráfico, S.L. Tel.: 91 731 05 13. E-mail: info.dcg@design2aa.com

[www.semico.es/ActualidadSEM.htm](http://www.semico.es/ActualidadSEM.htm)

# La microbiología: E pluribus unum

**Ricardo Guerrero**  
Presidente de la SEM

**N**os acercamos al final de este año, 2009. Ha sido un año repleto de actividades en la SEM, tanto nacionales como internacionales. Hemos participado muy activamente en el 3.º Congreso de la Federación Europea de Sociedades de Microbiología (FEMS), convocado bajo el lema *Microbes and Men*, que se celebró en Gotemburgo (Suecia), del 28 de junio al 2 de julio. Se reunieron en el congreso 1746 personas, número que indica la progresión en el interés de participar en los congresos de la FEMS, ya que en el primero (Ljubljana, 2003) hubo 1254 participantes, y en el segundo (Madrid, 2006) hubo 1355. Los países representados fueron 85, y los que más congresistas tuvieron fueron Suecia, con 169 (país anfitrión), España, con 127, y Alemania, con 108. Es de destacar la numerosa participación española, hecho que demuestra la potencia de la microbiología en nuestro país, y el interés de los microbiólogos españoles por formarse y relacionarse con centros e investigadores extranjeros. Como todos los años, el Consejo Directivo de FEMS se reúne a principios de septiembre en distintas ciudades europeas. Esta vez la ciudad escogida fue Barcelona, donde se celebró el 36th FEMS Council, el día 12 de septiembre de 2009. Previamente, los días 10 y 11 de septiembre, miembros del Council y delegados de sociedades nacionales de microbiología de distintos países europeos tuvieron diversas reuniones preparatorias. Todas las sesiones tuvieron lugar en la sede del Institut d'Estudis Catalans (IEC), un palacio barroco de mediados del siglo XVII, dotados de los más modernos servicios propios de las TIC. La FEMS está compuesta actualmente por 46 Sociedades Miembros de pleno derecho, más algunas sociedades adheridas provisionalmente. La SEM es una de las sociedades más numerosas y más activas de la federación europea.

Finalmente, nuestro congreso bienal tuvo lugar en la bella ciudad de Almería los días 21 a 24 de septiembre. Asistieron más de 500 personas y constituyó un gran éxito, tanto científico como de organización. La calidad y el interés de nuestros congresos nacionales siguen en aumento y atraen a muchas personas, en gran parte jóvenes, que contribuyen a dar el mejor ambiente a la reunión.

Entraremos pronto en un nuevo año. Será el año alternativo en el que no hay congreso nacional pero en el que se reúne la mayor parte de los Grupos Especializados. Estas reuniones o congresos nacionales de su especialidad convocan muchas personas interesadas en el tema específico

del grupo, y es de notar que acuden a ellos tanto socios de la SEM como personas que no lo son, y que, frecuentemente, a través de ese primer contacto activo con investigadores de su campo, pasan a formar parte de nuestra Sociedad. La SEM tiene actualmente diez Grupos Especializados. Cada uno realiza diversas actividades de gran calidad, y tiene relaciones con sociedades de temática afín, tanto nacionales como internacionales. La sola mención de los nombres de los grupos muestra la gran diversidad de miembros y especialidades que componen nuestra Sociedad, haciendo de nuevo válida la frase de *E pluribus unum*, tomada de un poema menor de Virgilio (*Moretum*, versos 103-104). Es decir, unidad en la variedad; tener muy diversos intereses específicos y demostrar un gran interés común: la admiración por el mundo microbiano y el deseo de conocerlo mejor y darlo a conocer a los demás. El próximo año es el "año de los Grupos Especializados": Biodeterioro y biodegradación, Hongos filamentosos y levaduras (micología), Microbiología clínica, Microbiología industrial y biotecnología microbiana, Microbiología de los alimentos, Microbiología molecular, Microbiología del medio acuático, Microbiología de plantas, Protistología, Taxonomía, filogenia y biodiversidad. La mayor parte de estos grupos llevan muy avanzada la preparación de sus reuniones bienales, y las fechas, lugares y programas se van incorporando paulatinamente a la web de la SEM, donde las personas interesadas pueden recabar información, o a través de ella ponerse en contacto con los organizadores. Deseamos el mayor éxito a los organizadores de las reuniones y animamos a los socios a asistir y participar activamente en ellas.

No podemos acabar sin mencionar otra unidad en la diversidad, en este caso la geográfica. La SEM y la Sociedad Portuguesa de Microbiología se han incorporado a la Asociación Latinoamericana de Microbiología (ALAM, véase *International Microbiology* 11(3): 221-225, 2008, [www.im.microbios.org](http://www.im.microbios.org)), y van a participar en el próximo congreso latinoamericano de microbiología, que tendrá lugar en Montevideo (Uruguay), los días 27 a 30 de septiembre de 2010. Animamos desde aquí a nuestros socios a consultar la web informativa ([www.alam2010.org.uy](http://www.alam2010.org.uy)) y a participar en el congreso, codo con codo con los microbiólogos de diversos países con quienes tantos lazos de cultura, historia y —¿por qué no?— carácter, nos unen. Acudiendo, participando, visitando esos bellos países, volveremos a confirmar que somos *E pluribus unum*.

## Microbiología de los Alimentos

Presidente: **Francisco Javier Carballo**

### XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología

El Grupo de Microbiología de los Alimentos tuvo, como viene siendo habitual, una importante presencia en el XXII Congreso Nacional de Microbiología. Se presentaron, con esta temática, un total de 49 comunicaciones de las cuales 12 se expusieron oralmente y las 37 restantes en forma de póster. Fue destacable la elevada calidad científica de todas ellas y lo cuidado de sus presentaciones. La comunicación titulada “Generación de un fago portador del gen de la toxina Shiga (Stx) fusionado con la Green Fluorescence Protein para evaluar la expresión del gen de la Stx” de los autores L. Imamovic, J. Jofre y M. Muniesa (Facultad de Biología, Universidad de Barcelona) recibió el premio a la mejor comunicación en forma de póster. La titulada “Actividades antimicrobianas derivadas de fagos y su aplicación como bioconservantes alimentarios” de los autores L. Rodríguez, B. Martínez, A. Rodríguez y P. García (Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC) se hizo acreedora al segundo premio especial de la SEM.

El día 22 de Septiembre, el Grupo celebró su asamblea, donde se debatió fundamentalmente sobre la temática de las mesas redondas y las actividades a realizar en el próximo Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos que se celebrará, D.m., en Valladolid, entre los días 19 y 22 de septiembre de 2010, bajo la organización del Dr. Rodríguez Lázaro del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.

El Simposio titulado “Resistencias antimicrobianas emergentes en la cadena alimentaria”, celebrado el día 24 de septiembre y moderado por el Prof. Prieto Maradona de la Universidad de León, contó con una audiencia muy numerosa (más de un centenar de asistentes) y en él se expuso y debatió la problemática generada en la

actualidad por el uso de antimicrobianos en la cadena alimentaria y por la aparición en los microorganismos de resistencias a estos compuestos, así como sus implicaciones en la salud pública humana y veterinaria.

### XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

El XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos tendrá lugar, D.m., durante los días 19, 20, 21 y 22 de Septiembre de 2010 en el Palacio de Congresos Conde Ansuárez (c/ Real de Burgos, s/n) de Valladolid. Correrá la presidencia de la organización a cargo del Dr. David Rodríguez Lázaro, del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

Como viene siendo tradicional, el Congreso se articulará en torno a una conferencia inaugural, cuatro mesas redondas y una conferencia de clausura. Como novedad se incluirá un simposio titulado “**Ciencia y empresa**”, donde los empresarios del sector agroalimentario tendrán la oportunidad de conocer los pormenores de las líneas públicas de financiación existentes para sus trabajos de I+D+i realizados en solitario o en colaboración con Universidades y Organismos y Centros Públicos de Investigación.

### Informe de los Grupos de Biodeterioro y Biodegradación

Presidente: **Diego A. Moreno**

El Grupo de Biodeterioro y Biodegradación desea agradecer a Concepción Calvo la organización de la Mesa Redonda que sobre “Avances en Técnicas en Biorremediación” se celebró con notable éxito de participación durante el XXII Congreso de la SEM en Almería, el 22 de septiembre de 2009.

El Premio THOR Especialidades, S.A., que concede el Grupo de Biodeterioro y Biodegradación recayó en F. Jorundi y cols. por el trabajo “Consolidación de piedra ornamental mediante carbonatogénesis bacteriana: iden-

tificación de la microbiota cultivable activada durante el tratamiento”. Diego A. Moreno fue el encargado de entregar el Diploma acreditativo y los 300 euros del Premio durante la Conferencia de Clausura.

El Premio de la SEM, al mejor Póster en el área de Biodeterioro y Biodegradación de los 15 presentados, dotado con 300 Euros, fue para A. de los Ríos y cols. por el trabajo “Las canteiras de Redueña como laboratorio natural para testar la eficacia de tratamientos contra el biodeterioro”.

Próximamente se comunicará a los miembros del Grupo las elecciones para renovación de la Junta Directiva.

### Informe del grupo “Microbiología Molecular”

Presidenta: **María Molina Martín**

En el reciente Congreso de Almería hemos vuelto a comprobar la buena salud científica de la que goza nuestro grupo de Microbiología Molecular. El simposio oficial del grupo, acertadamente organizado y moderado por Jesús Blázquez con el título “Estrés y evolución en bacterias”, tuvo unos excelentes ponentes y una numerosa e interesada audiencia, lo que propició una animada discusión científica. La representación de los miembros del grupo en el resto de actividades del congreso fue importante, tanto en los simposios organizados por otros grupos como en las sesiones de pósteres, que contó con 64 comunicaciones, de las que 15 se seleccionaron para su presentación oral. M<sup>a</sup> José Ferrándiz mereció el Primer Premio SEM al mejor póster por su trabajo “Transcripción de las DNA topoisomerasas y estado del superenrollamiento del DNA en respuesta a relajación por novobiocina en *Streptococcus pneumoniae*” y el correspondiente premio del grupo se concedió a Antonio J. Martín Galiano por “Localización del interruptor de ensamblaje de la proteína de división bacteriana FtsZ”. El colofón del Congreso corrió a cargo de otro de los miembros de nuestro grupo, Alex Mira, galardonado en esta ocasión con el Premio Jaime Ferrán de nuestra Sociedad. Noti-

cias SEM incluye en su número de noviembre una información más amplia y detallada sobre las actividades del grupo en este Congreso recogida por uno de los vocales de nuestra Junta Directiva, Víctor J. Cid. Finalmente, en la reunión ordinaria del grupo se acordó que la próxima reunión científica del grupo especializado estará organizada por Antonio Juárez y se celebrará los días 10, 11 y 12 de noviembre de 2010 en Barcelona.

### Grupo de Microbiología del Medio Acuático

Presidente: **Albert Bosch**

Dentro de nuestro reciente XXII Congreso Nacional de Almería, se celebró con gran brillantez la Mesa Redonda del Grupo que llevó por título "Virus en el Medio Acuático", cuya organización fue a cargo del Dr. Jesús López Romalde. Esta Mesa Redonda contó con las siguientes ponencias: Adelaida Almeida, Univ. Aveiro (Portugal). "Patrones de variación de abundancia de virus en ambiente estuarino", Susana Guix, Univ. Barcelona. "Análisis de calicivirus humanos en aguas", Juan L. Barja, Univ. Santiago. "Infecciones víricas en moluscos y crustáceos: repercusiones socioeconómicas" y Dolores Castro, Univ. Málaga. "Infecciones por *Lymphocystivirus* en acuicultura marina: patogénesis y transmisión".

En el mismo Congreso Nacional se concedió el premio al mejor póster de nuestro Grupo al trabajo presentado por Alejandro Labella, becario predoctoral en el grupo dirigido por el Dr. Juan José Borrego, con el título "Determinación de la actividad biológica

*in vitro* e *in vivo* de los ECPs de cepas de la especie *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* aisladas de peces marinos cultivados".

Se han renovado los cargos de la presidencia, tesorería y dos vocalías de la Junta Directiva del Grupo de Microbiología del Medio Acuático que han recaído en el Dr. Juan José Borrego, Presidente, la Dra. María del Carmen Macián, Tesorera y las Dras. María José Figueras y María del Carmen Márquez, vocales. Es el momento de expresar públicamente mi reconocimiento a la labor realizada dentro del Grupo, y especialmente dentro de nuestra Junta Directiva por la Dra. María Jesús Pujalte en su condición de tesorera y los vocales salientes, el Dr. Ferran Ribas y el Dr. Antonio Ventosa.

Finalmente se dispone ya de fechas para la celebración de nuestra próxima VIII Reunión de nuestro Grupo que tendrá lugar en Vigo en los días 14-16 de septiembre de 2010, organizada por la Dra. María Teresa Pérez Nieto.

### Informe del grupo "Microbiología de Plantas"

Presidente: **Jesús Murillo**

El grupo especializado "Microbiología de Plantas" (MiP) celebró el simposio "Mecanismos de detección e incorporación de nutrientes y señales por bacterias asociadas con plantas" durante el XXII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología, en Almería. El simposio fue organizado y moderado por José Manuel Palacios, del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas de la Universidad Politécnica de Madrid, y estuvo dedicado a la memo-

ria de nuestro compañero Antonio Palomares. La primera charla de este simposio, "In memoriam Antonio Palomares", fue impartida por Miguel Ángel Caviedes. Además, el simposio contó con los siguientes ponentes y charlas: Manuel Espinosa Urgel, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, "Intercambio de señales en la interacción mutualista planta-*Pseudomonas*"; Pablo Rodríguez-Palenzuela, Universidad Politécnica de Madrid, "*Dickeya dadanti* y *P. syringae*: dos modelos distintos de patogenicidad en plantas"; Joaquina Nogales Díaz, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, "Posible implicación de los péptidos en la interacción *Rhizobium-leguminosa*", y José Manuel Palacios, Universidad Politécnica de Madrid, "Transporte y homeostasis de níquel en *Rhizobium leguminosarum*". Las charlas, de muy alta calidad científica, atrajeron a un buen número de congresistas y dieron lugar a interesantes debates sobre el tema. El MiP celebró asimismo su reunión ordinaria, en la que se discutieron varias propuestas para la organización de la siguiente reunión, acordándose que Antonio de Vicente exploraría la posibilidad de organizarla en 2011. La Junta Directiva nombró un comité, compuesto por Antonio de Vicente y Manuel Espinosa Urgel, para la concesión del premio MiP a la mejor comunicación, que recayó en la presentada por Isabel Matas, Pablo Rodríguez-Palenzuela y Cayo Ramos, y titulada "Estrategias genómicas aplicadas al estudio de la interacción *Pseudomonas savastanoi-olivo*". El premio consistió en un cheque de 300 € y un diploma conmemorativo.

## Socios colaboradores de los Grupos Especializados de la SEM:

- **AGBAR, S.A.**
- **BIOETANOL GALICIA**
- **EMASA**
- **EMASESA**
- **Gamaser, S.L.**

- **Iberdrola, S.A.**
- **Instituto Tecnológico Agroalimentario**
- **Iproma, S.L.**
- **Laboratorios Microkit S.L.**

- **Laboratorio Municipal de Vigo**
- **Millipore Ibérica, S.A.**
- **THOR Especialidades, S.A.**
- **VWR International Eurolab (grupo Merck)**

## Unidades de captura y dispersión génica en la evolución de las $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

Ángela Patricia da Silva Novais Amorim

Directores: M<sup>a</sup> Teresa Coque González y Fernando Baquero Mochales.

Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

La selección, expansión y persistencia de las poblaciones bacterianas resistentes a agentes antimicrobianos constituye un problema de gran impacto en salud pública, tanto en el ámbito hospitalario como comunitario. La evolución acelerada de la resistencia a antibióticos en los últimos años y el fallo de las medidas de control adoptadas ha motivado la necesidad de abordar este problema desde una perspectiva ecológica que considere la interacción entre distintas poblaciones. Los genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas implicadas en resistencia a cefalosporinas de tercera generación, constituyen un modelo idóneo para analizar la resistencia a antibióticos desde esta perspectiva debido a su reciente aparición, su rápida expansión global y su distribución en distintos nichos ecológicos y hospedadores. Este estudio evaluó la contribución de la transmisión vertical (estructura poblacional de los aislados) y horizontal (caracterización de plásmidos, transposones e integrones) en la diseminación de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en una colección de aislados clínicos obtenidos en un amplio marco temporal (aislados obtenidos desde la primera descripción de resistencia a estos antibióticos en 1988 hasta nuestros días) y espacial (aislados representativos de distintos continentes). Este estudio incluye además una predicción de la capacidad de diversificación de las enzimas CTX-M o cefotaximasas (la familia de BLEE con diversificación y diseminación más notable) en relación con su espectro de actividad.

Esta tesis demuestra que el rápido y espectacular aumento de enterobacterias productoras de BLEE que se ha producido a nivel local y global es debido a la selección y expansión recientes de distintos clones y elementos de transferencia horizontal. La distribución temporal de BLEE de clase A (TEM, SHV, CTX-M) refleja un cambio epidemiológico caracterizado por i) un aumento de aislados de origen extrahospitalario, ii) la asociación a infecciones urinarias y iii) la selección de distintas variantes de BLEE. La diseminación de algunos tipos de BLEE se asoció a la expansión de clones de distintas especies (principalmente *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. aerogenes*). Los genes *bla*<sub>BLEE</sub> se localizaron en plásmidos

conjugativos epidémicos específicos con alta afinidad para determinados ecotipos bacterianos, indicando un cierto grado de co-adaptación entre éstos vehículos y sus huéspedes. La caracterización del entorno genético de estos genes reveló su asociación a elementos específicos responsables de su expresión (secuencias de inserción) y dispersión (integrones, transposones mercuriales). La naturaleza modular de estas plataformas genéticas favorece los fenómenos de recombinación y transferencia horizontal, y en última instancia la persistencia y distribución equilibrada de los genes de resistencia. Además, la exposición continuada a antibióticos  $\beta$ -lactámicos parece haber contribuido a la diversificación de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, a través de la adquisición de mutaciones específicas responsables de aumentar el espectro hidrolítico de estas enzimas.

En resumen, el resultado de la actual diseminación y evolución de los genes *bla* parece ser debida a una combinación de la generación de variantes con mayor capacidad adaptativa, de la contribución de los elementos de transferencia horizontal en la dispersión de esos variantes y de la selección de clones con alta capacidad de transmisión o mantenimiento. Los estudios de genética multidimensional de poblaciones son esenciales para establecer estrategias eficaces de control de infecciones, identificar nuevas dianas terapéuticas y facilitar una visión integrada de los mecanismos evolutivos que permiten la biología adaptativa de los microorganismos.

## Caracterización de proteínas con actividad antifúngica producidas por *Penicillium chrysogenum*

Andrea Rodríguez Martín

Directores: Miguel Ángel Asensio Pérez, Félix Núñez Breña, Raquel Acosta Guerrero.

Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura.

Las condiciones ambientales en que se procesan diversos alimentos favorecen el desarrollo superficial de mohos. En productos cárnicos y quesos madurados es frecuente el desarrollo de una población fúngica que contribuye al desarrollo de las características sensoriales del producto. Pero otros mohos son alterantes o pueden producir micotoxinas. Existen métodos eficaces para controlar el desarrollo de mohos en alimentos. Sin embargo, estos tratamientos no son adecuados para productos madurados donde la presencia de mohos es beneficiosa. Una solución en estos alimentos sería el empleo de proteínas antifúngicas que evitaran el desarrollo de mohos indeseables y que permitieran el crecimiento de los beneficiosos.

En estudios previos las cepas no toxigénicas RP42C y AS51D de *P. chrysogenum*, procedentes

de jamón curado, mostraron su capacidad de inhibir mohos toxigénicos. Además, se purificaron dos proteínas con actividad antifúngica, PgAFP y PgChP a partir de RP42C y AS51D, respectivamente.

El objetivo del trabajo ha sido caracterizar PgAFP y PgChP, incluyendo la determinación de sus secuencias aminoacídicas, las secuencias de los genes que las codifican; la evaluación preliminar de su toxicidad; el estudio de la influencia de diversos tratamientos y de compuestos comúnmente encontrados en alimentos sobre la actividad antifúngica.

Ambas proteínas han resultado ser muy diferentes. PgAFP tiene un peso molecular de 6,5 kDa, un punto isoeléctrico de 9,2, y no posee glicosilaciones. PgChP mostró un punto isoeléctrico de 5, y seis isoformas glicosiladas con pesos moleculares entre 30 y 31 kDa, separados por 162 Da que podría corresponder a un residuo de manosa o galactosa. La secuencia deducida del gen mostró dos posibles sitios de glicosilación (Asn-Phe-Thr y Asn-Asp-Cys) y la presencia de cadenas glucídicas se demostró mediante deglicosilaciones enzimáticas.

Las secuencias obtenidas de los genes *pgAFP* y *pgChP* tuvieron un tamaño de 276 y 912 pb, que codifican 92 y 304 aminoácidos, respectivamente. Además presentaron intrones pequeños con marcadores típicos de intrones fúngicos.

La secuencia aminoacídica de PgAFP presentó un 79% de identidad con Anafp de *A. niger* y PgChP un 60% de identidad con la familia de hidrolasas GH-75 compuesta por quitosanasas fúngicas. PgAFP y PgChP presentan un péptido señal y además PgAFP, al igual que Anafp y otras proteínas similares, presenta una prosequencia, que parece mantener la proteína inactiva hasta que este fragmento es eliminado durante su secreción.

La actividad antifúngica de PgAFP y de PgChP se inhibe por altas concentraciones (100 mM) de cationes divalentes  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Al igual que las defensinas, el mecanismo de acción de PgChP y PgAFP podría deberse a receptores específicos en las membranas de los mohos sensibles. Los cationes podrían saturar estos receptores impidiendo que las proteínas ejercieran su acción antifúngica.

PgChP muestra actividad hidrolítica sobre quitosán, lo que puede hacer que su espectro de inhibición incluya a hongos con quitosán en su pared celular como los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, alterantes en alimentos madurados.

PgAFP y PgChP no mostraron toxicidad sobre larvas de *Artemia salina* ni glóbulos rojos a concentraciones superiores a las que poseen actividad antifúngica.

PgAFP y PgChP fueron estables a altas temperaturas, permaneciendo activas tras calentamiento a 100 °C 15 minutos y 80 °C 20 minutos, respectivamente. PgAFP además fue estable a valores de pH entre 1 y 12.

La actividad antifúngica de PgAFP y PgChP se mantuvo en presencia de altas concentraciones (100 mM) de Na y K, lo que puede ser de gran interés en alimentos madurados, donde abunda las sales de sodio y potasio. Los quelantes EDTA y EGTA no tuvieron un gran impacto en la actividad de PgChP y PgAFP, mientras que el fosfato sódico

a alta concentración (100 mM) sí pudo inhibir esta actividad. Los detergentes también inhibieron a PgChP, pero PgAFP se mantuvo activa a concentraciones de tween 20 o de tween 80 superiores a las empleadas en alimentos.

En definitiva, PgAFP y PgChP han mostrado alta estabilidad, inocuidad en los ensayos realizados y resisten componentes comúnmente encontrados en alimentos. Aunque es necesario profundizar en su estudio, estas proteínas y las cepas de *P. chrysogenum* productoras muestran características adecuadas para su utilización frente a mohos alterantes y toxigénicos en alimentos crudos madurados.

## Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A

**Amaia González Salgado**

Directoras: **Dra. María Teresa González Jaén, Dra. Belén Patiño Álvarez.**

Departamento de Microbiología III.  
Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad Complutense de Madrid.

La ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario con propiedades neurotóxicas, inmunotóxicas, genotóxicas y teratogénicas sobre animales, y además ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer como un posible cancerígeno en humanos (del grupo 2B). Las principales especies de *Aspergillus* productoras de OTA son *A. ochraceus* en la sección *Circumdati*, y *A. carbonarius* y los dos miembros del agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*), en la sección *Nigri*. Se ha observado presencia de OTA en numerosos alimentos y bebidas, especialmente en cereales, café, uvas y vino, y sus límites máximos en diversos productos alimentarios están regulados por la Unión Europea. Para minimizar la entrada de OTA y otras micotoxinas en la cadena alimentaria, es muy importante la obtención de herramientas de diagnóstico rápido, para poder monitorizar los puntos críticos de control de forma efectiva. Sin embargo, el reconocimiento de las numerosas especies del género *Aspergillus* es difícil y requiere expertos en taxonomía, ya que tradicionalmente se han empleado métodos basados en características morfológicas. En este trabajo se describen ensayos, basados en la técnica de PCR, para la detección de las especies *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. ochraceus* y *A. flavus*, y dos ensayos de PCR a tiempo real para la especie *A. carbonarius* usando SYBR Green I y sonda TaqMan. Todos los cebadores están diseñados mediante la comparación de secuencias de la región espaciadora intergénica multicopia del rDNA, ITS, en diversas cepas y especies de *Aspergillus*, y han sido ensayados en un gran número de aislamientos de diferentes orígenes y hospedadores. Los ensayos de PCR son rápidos, sensi-

bles y específicos, y representan una buena herramienta para la detección temprana de algunas de las principales especies de *Aspergillus* toxígenas, y para la prevención de la entrada de micotoxinas en la cadena alimentaria. Además, los protocolos descritos anteriormente fueron aplicados en la detección de especies de *Aspergillus* en dos importantes agro-productos, como son las uvas de vino y los cereales (trigo blando y cebada). Por otra parte, se ha llevado a cabo la identificación y caracterización de genes implicados en la ruta biosintética de OTA en las especies *A. ochraceus* y *A. carbonarius*, y se ha cuantificado la expresión de algunos de estos genes en relación con la producción de OTA mediante RT-PCR a tiempo real. Por último, se estudió el efecto de fungicidas comerciales en el crecimiento, producción de OTA y expresión de los genes anteriormente mencionados. La clonación de posibles genes implicados en la biosíntesis de OTA en *A. ochraceus* y *A. carbonarius* proporcionará información adicional para la elaboración de nuevas estrategias de control de OTA en alimentos, y el conocimiento de los factores bióticos y abióticos que afectan a su producción.

## Avances en el conocimiento del papel de la colina en *Streptococcus pneumoniae*

**Ana González Moreno**

Directores: **Pedro García González y José Luis García López.**

Departamento de Microbiología Molecular. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

*Streptococcus pneumoniae* es una bacteria Gram-positiva que se considera un patógeno casi exclusivamente humano. Una de las características de esta bacteria es su auxotrofia por el aminoalcohol colina, ya que es incapaz de sintetizarlo de manera endógena, y es imprescindible para la correcta multiplicación de la bacteria. La colina forma parte exclusivamente de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de las estructuras periféricas de la bacteria, teniendo importantes funciones en el ciclo vital de esta bacteria. Se pueden destacar tres funciones principales de la colina para neumococo: una función estructural, basada en el requerimiento por parte de la bacteria para su normal multiplicación, una función fisiológica derivada del papel como sitio de anclaje no covalente sobre la pared de las proteínas de unión a colina (CBPs), y por último una tercera funcionalidad de la colina en la interacción con el hospedador, mediada por distintas proteínas del sistema inmune del mismo, tales como la proteína C reactiva (CRP) o el receptor del factor de activación plaquetaria (PAF).

El trabajo de esta tesis, se ha centrado en la importancia de la colina para neumococo, desde el punto de vista estructural y fisiológico, así como la utilización de análogos de colina como posibles compuestos antineumocócicos. Se ha determinado que el requerimiento de la colina está condicionado por la presencia del transportador TacF,

responsable de la salida de los precursores de ácido teicoico para formar parte de la pared bacteriana. Para la correcta funcionalidad de este transportador en neumococo es requisito *sine qua non* que dichos precursores de ácido teicoico lleven anclada covalentemente al menos una molécula de colina. Se ha comprobado que diferentes mutaciones del gen *tacF*, que implican determinados cambios de aminoácidos, permiten la salida de precursores de ácidos teicoicos libres de colina para formar parte de la pared bacteriana, salvaguardando así la auxotrofia para colina. Se han determinado 3 regiones de este sensor/transportador implicadas en dicho proceso; asimismo, diferentes combinaciones en los cambios de aminoácidos de la proteína confieren distintas eficiencias en la capacidad, por parte del transportador, de translocar precursores de ácidos teicoicos que no llevan anclada colina. También se ha determinado que el transportador TacF de la especie *Streptococcus pseudopneumoniae* presenta los mismos requerimientos que el TacF de neumococo, siendo por tanto, al igual que neumococo, auxotrofa para colina. Por otra parte, se ha descrito una nueva subfamilia de CBPs que está presente en todas las cepas de neumococo y en *Streptococcus mitis*; estas proteínas contienen un dominio C-terminal de unión a colina consenso y un dominio N-terminal compuesto por la repetición de motivos de unión a colina no canónicos. Dentro de esta subfamilia de CBPs se ha estudiado en profundidad la proteína CbpF, demostrándose que inhibe, *in vitro* e *in vivo*, tanto a la lisozima bacteriana LytC como a las lisozimas fágicas. Esto sugiere que CbpF puede tener una funcionalidad como regulador de la lisis y/o la reorganización de la pared de neumococo. Por último, se ha estudiado el posible papel como fármacos contra neumococo de compuestos análogos a la colina, tales como el ipratropio, determinándose que este compuesto tiene capacidad de inhibir diferentes CBPs, actuando así como bacteriostático. Además, ensayos con cepas de neumococo capaces de multiplicarse de manera independiente del aminoalcohol, pusieron de manifiesto que los efectos sobre la bacteria pueden ser más amplios que la citada inhibición de las CBPs, lo que abriría una nueva estrategia en la lucha contra neumococo.

## Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes

**Begonya Marcos Muntal**

Directoras: **Margarita Garriga Turón y Teresa Aymerich Calvet.**

IRTA-Tecnología de los Alimentos.  
Finca Camps i Armet.

La creciente demanda de productos mínimamente procesados y listos para el consumo plantea un importante reto para la seguridad ali-

mentaria y ha conducido al desarrollo de tratamientos post-procesado suaves, que permitan inhibir el crecimiento microbiano manteniendo la calidad y frescor de los alimentos. En este contexto adquiere una especial importancia el uso combinado de barreras contra el crecimiento de microorganismos que aseguren la calidad higiénica y la seguridad de los alimentos, sin afectar las propiedades organolépticas. En los trabajos recogidos en la presente tesis se plantearon diversas estrategias consistentes en la combinación de barreras al crecimiento microbiano para mejorar la seguridad de productos cárnicos listos para el consumo.

Durante la maduración, los embutidos crudos-curados se convierten en alimentos más estables y seguros como consecuencia de la sucesión de barreras al crecimiento microbiano. Sin embargo, en los embutidos poco ácidos, caracterizados por presentar valores finales de  $\text{pH} \geq 5,3$ , se ha minimizado una de las barreras al crecimiento de microorganismos. Con el objetivo de mejorar la seguridad de estos productos se valoró la aplicación del tratamiento por alta presión hidrostática (APH) y la adición de cultivos iniciadores en embutidos poco ácidos. El tratamiento APH (300 MPa), previo a la maduración de los embutidos, constituyó una barrera adicional para controlar la población de *Salmonella*, pero resultó contraproducente en el desarrollo de la microbiota de interés tecnológico y en el control de *L. monocytogenes*. La presurización (400 MPa), aplicada después del proceso de maduración, permitió obtener ausencia de *Salmonella* en el producto acabado. La adición de cultivos iniciadores permitió mejorar la higiene (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, aminas biógenas) y la seguridad (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) de los embutidos. Ambas tecnologías, aplicadas de forma combinada, ejercieron un efecto complementario, sin alterar la calidad final de los embutidos.

Por otro lado, el jamón cocido, es un alimento con un bajo contenido de sal (~2%), valores de pH en torno a 6,0 y actividad de agua superior a 0,94, factores incapaces de inhibir por sí solos los microorganismos relacionados con la contaminación post-procesado. Con el objetivo de reducir el riesgo de *L. monocytogenes* en el jamón cocido loncheado, se evaluó el efecto de antimicrobianos naturales (lactato-diacetato y enterocinas) y el tratamiento por alta presión hidrostática. Al aplicar los antimicrobianos como aditivos de fabricación, se observaron resultados óptimos en la combinación triple de tratamiento APH (400 MPa), antimicrobianos naturales y refrigeración a 1°C. Este tratamiento resultó eficaz, a pesar de la rotura de la cadena de frío, para reducir la contaminación inicial y evitar la recuperación de *L. monocytogenes* a lo largo de la vida útil del jamón. Por otro lado, al incluir las enterocinas en láminas biodegradables, el tratamiento combinado por alta presión hidrostática y envasado antimicrobiano, derivó en bajos niveles del patógeno ( $\leq 100$  ufc/g) durante la vida útil del jamón conservado a 6°C. Finalmente, la combinación de APH envasado antimicrobiano y refrigeración a 1°C resultó efectiva, no sólo para controlar y reducir los recuentos de *L. monocytogenes*, sino para superar la rotura de la cadena de frío.

## Estudio epidemiológico del virus de la hepatitis E (VHE) en trabajadores de explotaciones porcinas y en donantes voluntarios de la Comunidad Valenciana

Carolina Galiana Roselló

Directores: **María Teresa Pérez Gracia** y **Angel García Muñoz**.

Area Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad CEU Cardenal Herrera. Valencia. España.

El virus de la Hepatitis E (VHE) es el principal agente causal de las hepatitis no A no B de transmisión fecal oral. Esta infección está asociada a países en los cuales las condiciones higiénico sanitarias son deficientes, siendo las principales zonas endémicas Asia, África, y México. En los últimos años, en numerosos países desarrollados se han descrito casos de hepatitis agudas, no solamente casos esporádicos de personas procedentes de regiones endémicas, sino en individuos sin historia de viaje a zonas endémicas. Los objetivos de la tesis fueron detectar la presencia del VHE mediante técnicas inmunoserológicas y moleculares en muestras de suero de personas expuestas al ganado porcino y en personas sin exposición (donantes voluntarios) de la Comunidad Valenciana; así como determinar y valorar los factores de riesgo asociados a la presencia de marcadores del VHE (exposición a ganado porcino, viaje a zonas endémicas, ingesta de verduras crudas y marisco crudo e ingesta de agua no tratada) y contribuir al conocimiento de la epidemiología del VHE, aportando datos que ayuden a esclarecer las posibles vías de transmisión. Para ello, se obtuvieron muestras de suero de un total de 212 personas que se clasificaron en dos grupos según la exposición al ganado porcino. El grupo de expuestos estaba compuesto por 115 (54,2%) personas, entre las cuales se incluyen veterinarios, controladores de granjas, profesores y estudiantes que han tenido contacto con cerdos. El grupo de no expuestos estaba formado por 97 (45,8%) personas voluntarias de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad CEU Cardenal Herrera. No se identificó el virus en ninguno de los 212 individuos de este estudio. En lo que hace referencia a la detección de anticuerpos frente al VHE en los 212 individuos analizados, 25 personas (11,8%) presentaron anti-VHE de tipo IgG, siendo 21 expuestos y 4 no expuestos. Los anticuerpos anti-VHE de tipo IgM solamente fueron detectados en 1 persona (0,4%) sin exposición. Los anticuerpos de clase IgA resultaron positivos en 3 personas, 2 de ellas con exposición y 1 sin exposición. El análisis estadístico de las variables estudiadas en esta investigación mostró que tanto la exposición a ganado porcino como el consumo de agua no tratada han representado un factor de riesgo para la adquisición de la infección por el VHE. El análisis de las otras variables como el consumo de marisco crudo, verduras crudas y viaje

al extranjero no han supuesto un factor de riesgo para contraer el VHE. Asimismo, la elevada tasa de seroprevalencia descrita en el grupo de individuos expuestos a ganado porcino (18,5%), junto a la ausencia de viremia, puede sugerir que el VHE sea el responsable de infecciones subclínicas.

Este es el primer estudio en Europa que determina el consumo de agua no tratada como factor de riesgo para contraer la infección por el VHE. Además, es el primer estudio realizado en España, que analiza la presencia del VHE en personas que trabajan en contacto con el ganado sugiriendo que la infección por este virus podría tratarse como una enfermedad ocupacional en trabajadores del sector porcino y que deberían tomarse las medidas higiénico sanitarias correspondientes en este grupo para disminuir la exposición al VHE.

## Caracterización molecular de la degradación anaeróbica de tolueno y *m*-xileno en *Azoarcus* sp. CIB

Blas Blázquez Castiñeira

Directores: **Eduardo Díaz Fernández** y **Manuel Carmona Pérez**.

Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC.

En esta Tesis, se ha identificado el cluster génico *bss/bbs* responsable de la degradación anaeróbica de tolueno en la bacteria desnitrificante *Azoarcus* sp. CIB. Se ha demostrado por primera vez que los genes *bbs* son imprescindibles para el catabolismo anaeróbico del *m*-xileno en esta bacteria.

El cluster de genes *bss/bbs*, se organiza en cuatro operones: un operón para los genes reguladores (*tdiS* y *tdiR*); dos operones catabólicos (*bss* y *bbs*) y un operón para el gen *tol*, el cual no es imprescindible para el crecimiento en tolueno/*m*-xileno. La expresión de los operones *bss* y *bbs* esta controlado por el sistema regulador de dos componentes *tdiS* (histidina-quinasa) que al recibir una señal se autofosforila y a través de una cascada de fosforilación transmite la señal y activa a la proteína reguladora *TdiR*. Esta proteína actúa como un activador transcripcional regulando positivamente la expresión de los promotores de los genes *bss* y *bbs*.

El gen *tol* codifica una proteína que presenta una arquitectura modular no descrita hasta la fecha, presentando un supradominio N-terminal con los dominios PAS, HK y REC, que estaría encargado de recibir una señal sensora; y un supradominio GGDEF y EAL, con actividad fosfodiesterasa que bajaría los niveles de di-GMPc en la célula. La bajada de di-GMPc en la célula interpondría en diversos factores como por ejemplo, la quimiotaxis, la formación de biofilms, etc.

En esta Tesis, también se ha caracterizado el primer gen *gcdH* bacteriano que codifica la actividad glutaril-CoA deshidrogenasa. Esta enzima cataliza un etapa clave en la ruta baja del benzoil-CoA con la conversión del glutaril-CoA en crotonil-CoA. En posición divergente al gen *gcdH* se

encuentra el gen *gcdR* que codifica un regulador transcripcional de la familia LysR y que controla la expresión del promotor del gen *gcdH* activando su expresión en presencia de los compuestos inductores glutarato y glutaconato.

## Estudios de mecanismos de resistencia a tetraciclina, eritromicina y otros antimicrobianos no-beta lactámicos en bacterias anaerobias estrictas aisladas de infecciones humanas y animales.

**María Lorenzo Sánchez**

Directores: **Segundo Píriz durán** y **Alberto Quesada Molina**.

Dpto. de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Cáceres. Universidad de Extremadura.

En la actualidad, resulta incuestionable destacar la patogenicidad de muchas especies de bacilos anaerobios gramnegativos tanto en clínica humana como en la veterinaria. El tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos requiere el uso de antimicrobianos, sin embargo, éste no siempre resulta efectivo, pues los microorganismos pueden volverse resistentes a determinados antimicrobianos. La presencia en el hombre y animales de bacterias anaerobias estrictas gramnegativas que presentan marcadores de resistencia a antimicrobianos beta y no beta lactámicos es objeto de numerosos trabajos científicos.

En este trabajo, tras llevar a cabo el estudio del perfil de sensibilidad frente a antimicrobianos beta y no beta lactámicos en las cepas analizadas de origen humano y animal, nos planteamos determinar la presencia de los marcadores de resistencia a tetraciclinas, eritromicina y metronidazol, *tetQ*, *ermF* y genes *nim*, en estas cepas. Igualmente se llevó a cabo el estudio de las posibles variantes polimórficas de estos genes así como el estudio del entorno genético en las regiones "corriente arriba" de dichos marcadores. Finalmente nos planteamos identificar la existencia de posibles correlaciones entre los polimorfismos genéticos y los fenotipos de resistencia frente a tetraciclina, eritromicina y metronidazol.

La resistencia de los microorganismos anaerobios estrictos gramnegativos que fueron analizados frente al conjunto de antimicrobianos testados fue variable, siendo generalmente superior en las cepas de origen humano y resultando el imipenem y el metronidazol los compuestos más activos para la inhibición de su crecimiento. El gen *tetQ* resultó ser el principal determinante de resistencia a la tetraciclina en las cepas analizadas, tanto en las de origen animal como humano. A pesar de detectarse algunos polimorfismos en las secuencias codificantes de los genes *tetQ*, estas diferencias no se expresaban a nivel fenotípico. La resistencia a la eritromicina en estas cepas se

debía frecuentemente a determinantes de resistencia diferentes a *ermF*. En este estudio, la resistencia frente al metronidazol encontrada en algunas de las cepas parecía deberse a algún mecanismo desconocido, diferente a los que involucraban la presencia de genes *nim* o la sobreexpresión de actividad LDH. Finalmente señalar que los genes *tetQ* y *ermF* fueron transferidos horizontalmente entre algunos de los microorganismos analizados en este trabajo. Esta movilización se detectó incluso entre bacterias pertenecientes a diferentes especies aisladas a partir de distintos hospedadores, animales y humanos.

Estos resultados contribuyen a consolidar la hipótesis de la importancia de la transferencia horizontal de determinantes de resistencia entre bacterias de distintos géneros y especies pertenecientes al mismo o diferente ambiente, que constituyen reservorios para este tipo de secuencias incluso en ausencia de selección, planteando por tanto una seria amenaza para la salud humana y animal.

## Evaluación del mecanismo de corte del RNA por la toxina bacteriana kid y de su actividad inhibidora de la traducción

**Elizabeth Diago Navarro**

Director: **Ramón Díaz Orejas**.

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Kid, la toxina del sistema Toxina-Antitoxina *parD* (*kis*, *kid*) del plásmido R1, es una endorribonucleasa que corta ARN con preferencia por la secuencia 5'-UA(A/C)-3' y también es un inhibidor de síntesis de proteínas. Se ha propuesto que la actividad ARNasa de Kid es similar a las ARNasas A y T1. El mecanismo propuesto se basa en el análisis de los productos de corte y en un modelado de un complejo de Kid con el sustrato 5'-AdUACA-3'. Se supone que la inhibición de la síntesis de proteínas por Kid se debe a la rotura del ARNm independientemente de ribosomas.

En esta tesis se ha realizado una evaluación del modelo de unión y corte del RNA por Kid y de la inhibición de traducción por esta toxina.

La evaluación del modelo de unión y corte del ARN por Kid se ha realizado analizado por espectrometría de masas el efecto en unión y rotura del RNA de mutaciones en residuos claves del modelo. Las mutaciones R73H, D75E, D75N y H17P que afectan a residuos del centro catalítico propuesto, inactivan la toxicidad de Kid. Ensayos de corte realizados con los sustratos 5'-AUACA-3' y 5'-UUACU-3', indican que las mutaciones anulan la actividad ARNasa de la toxina sin afectar su unión al sustrato 5'-AdUACA-3'. El análisis de variantes de Kid con mutaciones en residuos implicados en la unión al sustrato (A55G, T69G, T46G, R85W) indica que interaccionan con el sustrato 5'-AdUACA-3' con menor eficiencia que la proteína silvestre y que con la excepción de T46G, conservan una actividad de corte específica y medible sobre 5'-AUACA-3' y 5'-UUACU-3'. Los mutantes que retenían actividad ARNasa, mos-

traron inhibición de la síntesis de proteínas *in vitro* y de la toxicidad *in vivo*. Los resultados apoyan el modelo propuesto e indican que T46 es un residuo de unión a ARN que participa más directamente en la actividad ARNasa de la toxina.

El descubrimiento accidental de mutaciones en el gen *prfA* abrió la posibilidad de analizar las interacciones de Kid con componentes del ribosoma. *prfA* codifica el factor de terminación de la traducción RF1 de *E. coli*. Las tres mutaciones aisladas afectaban a residuos de este factor localizados cerca del sitio de reconocimiento de codones (G121S, G301S y R303H) y mostraban una reducción de ~10 veces de la eficiencia de terminación en codones UAG, sin afectar significativamente la estabilidad de RF1 *in vivo*. Los mutantes mostraban hipersensibilidad a antibióticos aminoglicósidos y sorprendente también a la toxina Kid cuya actividad ARNasa es, en principio, independiente del proceso de traducción. La hipersensibilidad a Kid, que es dependiente de su actividad ARNasa se suprimió al sobreproducir el RF1 silvestre o la antitoxina Kis. Estos datos aportan la primera evidencia de la participación del factor RF1 en la ruta de toxicidad de Kid, añadiendo complejidades adicionales a la actividad de Kid como inhibidor de la síntesis de proteínas.

## La familia de las metalotioneínas en *Tetrahymena* y su aplicación en el desarrollo de biosensores celulares para la detección de metales pesados

**Francisco Amaro Torres**

Director: **Juan Carlos Gutiérrez Fernández**.

Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

Las metalotioneínas (MTs) constituyen las herramientas moleculares proteicas más importantes en la defensa microbiana frente al estrés originado por metales pesados. Uno de los objetivos de esta tesis doctoral fue el incrementar nuestro conocimiento actual sobre MTs en el ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*. Nuestra contribución ha sido el aislamiento y caracterización de 2 nuevos genes codificantes de MTs (*MTT3* y *MTT5*), que se suman a los 3 (*MTT1*, *MTT2* y *MTT4*) que han surgido paralelamente al desarrollo de este trabajo. Otros dos nuevos genes (*TrosMTT1* y *TrosMTT2*) de la especie *T. rostrata* han sido, igualmente, aislados y caracterizados en esta tesis. Actualmente conocemos un total de 11 genes codificantes de MTs en diferentes especies de *Tetrahymena*. Tanto el estudio *in silico* de sus secuencias aminoácidas, como sus niveles de expresión relativa (RT-PCR cuantitativa, frente a diferentes metales y otros agentes ambientales estresantes), y el análisis filogenético, han corroborado la división de la familia de MTs de ciliados en dos subfamilias (CdMTs y CuMTs). Las CdMTs de *Tetrahymena*, presentan

unas características únicas respecto de la mayoría de las MTs conocidas (mayor tamaño, motivos CCC casi exclusivos y un drástico carácter modular). La localización de módulos y submódulos a lo largo de sus secuencias aminoacídicas, probablemente explicaría su mayor tamaño y ha contribuido en la elaboración de un modelo sobre su posible historia evolutiva, extensamente basado en duplicaciones génicas. Igualmente, un intenso análisis de las regiones 5' y 3' UTRs de las CdMTs de *T. thermophila*, ha revelado la presencia de un motivo altamente conservado (MTCM1) presente en las regiones promotoras de *MTT5* (13 copias), *MTT1* (6 copias) y *MTT3* (2 copias). Este motivo encierra la secuencia consenso de unión a factores de transcripción de la familia bZIP (como el AP1). En el genoma de *T. thermophila* existen, al menos, 4 genes del tipo bZIP. Tras su análisis *in silico* se eligieron 3 para un análisis de expresión bajo la presencia de Cd. Concluyéndose, que eran buenos candidatos para considerarlos como factores implicados en la regulación de la expresión de los genes MTs. Experimentos de EMSA y *southwestern blotting* han mostrado que al motivo MTCM1 se unen proteínas procedentes de extractos celulares de *T. thermophila*, y sus masas moleculares son similares a algunas de las inferidas de los genes bZIP. El análisis de la región 3' UTR junto con el de moléculas de ADNc del gen *MTT5* mostraron la existencia de un intrón, el cual es diferencialmente procesado.

Otras moléculas de naturaleza peptídica, que pueden estar involucradas en la inactivación de metales, son las fitoquelatinas (FQs), moléculas sintetizadas por la enzima fitoquelatín-sintasa (FQS). Tras buscar en el genoma de *T. thermophila* encontramos un homólogo de FQS, se aisló el gen y se analizó su expresión (RT-PCRq) bajo el estrés de metales pesados. El gen se expresa exclusivamente cuando se induce por Cd, al igual que otras FQs de otros organismos, pero tras utilizar diversos métodos (HPLC, inmuno-western blotting, electroforesis capilar o HPLC-espectrometría de masas) no se ha detectado la presencia de FQs. La metodología HPLC-SM mostró que en muestras tratadas con Cd aparecen moléculas derivadas de la degradación del glutatión. Esta peculiaridad, junto con algunas características estructurales de la FQS de *Tetrahymena* y la ausencia de FQs, nos hace pensar que la función real de esta enzima no es la biosíntesis de FQs, sino más bien la degradación del glutatión o conjugados de glutatión (como se ha propuesto para FQs de procariontes).

Aprovechando la gran capacidad de respuesta a metales de los promotores de los genes *MTT1* y *MTT5* de *T. thermophila*, se ha llevado a cabo construcciones con diferentes genes reporteros (Green Fluorescent Protein-GFP o Luciferasa-LucFF), por ejemplo;  $P_{MTT1}::GFP::MTT1$  y  $P_{MTT1}::GFP::MTT5$  o  $P_{MTT1}::LucFF$  y  $P_{MTT5}::LucFF$ , las cuales fueron introducidas en el ciliado por electroporación o transformación biolística, obteniéndose las cepas transformantes o recombinantes correspondientes. Estas cepas constituyen biosensores celulares que responden con una elevada sensibilidad a diversos metales pesados. Las cepas *MTT1Luc* y *MTT5Luc* representan los biosensores eucariotas capaces de detectar las menores concentraciones de metales pesados no esenciales (Cd, Pb, As, Hg), con una

sensibilidad de detección de 5-50 nM dependiendo del metal. La cepa *MTT5Luc* se encuentra entre los tres biosensores celulares, actualmente descritos, capaces de detectar las mínimas concentraciones de Cd (<10nM), detectando Cd (5 nM) a concentraciones 200 veces menores que *S. cerevisiae* y 20-5.000 veces menores que *C. elegans*. La validación de estos biosensores celulares (en bioensayos del tipo *turn-on*), usando tanto muestras artificialmente contaminadas como muestras naturales, ha mostrado su validez tanto en la detección de metales en muestras acuáticas como terrestres.

Díaz et al., 2007. *PLoS ONE* 2(3):e291. doi:10.1371/journal.pone.0000291.

Amaro et al., 2008. *Gene*.423: 85-91.

Amaro et al., 2009. *Com. Biochem. Physiol.*149: 598-604.

Gutiérrez et al., 2009. *BioEssays*. 31: 805-816.

## Fuentes de bacterias para la colonización del intestino del neonato. Aplicación para el tratamiento de las mastitis lactacionales

Esther A. Jiménez Quintana

Directores: Juan Miguel Rodríguez Gómez y Leonides Fernández Álvarez.

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Al iniciarse esta Tesis Doctoral se desconocía la influencia del modo de nacimiento, la alimentación y el ambiente en el desarrollo inicial de la microbiota intestinal, y se consideraba que el intestino del feto a término era estéril. Por ello, el primer objetivo fue la investigación de las posibles rutas de adquisición de microorganismos durante el periodo perinatal, sin descartar una posible colonización del intestino fetal. Para ello se recogieron muestras de sangre de cordón umbilical de 20 niños sanos nacidos por cesárea electiva y se pudieron aislar bacterias de distintas especies, como *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* o *Streptococcus sanguinis*. Paralelamente, se consiguieron muestras del primer meconio de 21 niños sanos nacidos a término y las especies que se detectaron en un mayor número de muestras fueron *E. faecalis* y *St. epidermidis*; no obstante, también se aislaron otras como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Leuconostoc mesenteroides* o *Rothia mucilaginoso*. Posteriormente, se seleccionó una cepa de *E. faecium*, aislada de leche materna, y se sometió a un marcaje genético para confirmar la transferencia de bacterias comensales a través de la barrera placentaria empleando un modelo animal. La cepa marcada, administrada oralmente a un grupo de ratonas gestantes, se pudo aislar en muestras de líquido amniótico y de meconio, demostrándose así la existencia de un mecanismo de transferencia a través de la placenta.

También se investigó el papel del calostro y de la leche como fuente de bacterias para el intestino infantil. Se tomaron muestras de calostro de 36 mujeres. *St. epidermidis* fue detectado en 30 muestras mientras que los enterococos constituyeron el segundo grupo bacteriano en orden de frecuencia. Se estudió la composición microbiológica de 17 muestras de leche materna de mujeres sanas y de las heces de sus respectivos hijos, comparando estas últimas con 7 muestras de heces de niños alimentados con fórmula. *St. epidermidis* fue la especie con mayor prevalencia, tanto en las muestras de leche como en las heces de los niños amamantados, mientras que *E. faecalis* lo fue entre los aislados de heces de niños alimentados con fórmula. Se analizaron los factores de virulencia y la sensibilidad a los antibióticos de los aislados de estas dos especies y los resultados mostraron que pueden considerarse como seguros. Otro de los objetivos fue el aislamiento e identificación de bifidobacterias a partir de 23 muestras de leche humana y 23 muestras de heces de los respectivos hijos mediante técnicas de cultivo y moleculares (qPCR-RT, PCR-DGGE). Se aislaron bifidobacterias de 12 muestras de leche y 20 de heces. La mayoría pertenecían a las especies *B. breve*, *B. bifidum* y *B. longum*. Se detectó DNA bifidobacteriano en 22 de las muestras en un rango de entre 40 y 10.000 copias/ml. En conclusión, la leche humana es una fuente de bifidobacterias para el intestino infantil.

El último objetivo fue la aplicación de *Lactobacillus gasseri* CECT5714 y *Lactobacillus salivarius* CECT5713, aislados de leche humana, para el tratamiento de las mastitis lactacionales, causadas principalmente por estafilococos y estreptococos suponiendo una de las principales causas de destete precoz e indeseado. La antibioterapia únicamente logra la curación del 10-30% de los casos. En el ensayo participaron 20 mujeres lactantes con mastitis estafilocócica. La mejoría de las mujeres del grupo probiótico fue progresiva y se reflejó en una disminución significativa del recuento de estafilococos, un aumento del de lactobacilos y la desaparición de la sintomatología. Las cepas administradas se detectaron en leche a partir de la segunda semana de tratamiento.

## Mecanismos moleculares de resistencia a arsénico en *Corynebacterium glutamicum*

Efrén Ordóñez del Amo

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

Área de Microbiología. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León.

El arsénico (As) ha estado íntimamente ligado a la actividad humana a lo largo de la Historia. En la actualidad el As es uno de los metales más ubicuos en el medio natural (cerca del 0,0005%), formando parte de la composición de muchos mine-

rales. Este hecho, unido a su elevada toxicidad lo convierte en un problema de salud de primer orden a nivel mundial, y en el desastre medioambiental de mayor calado en muchas regiones.

Como resultado de la interferencia humana, el ciclo biológico del As se ha ampliado, por lo que cantidades enormes de este metaloide acaban finalmente en el ambiente y en los organismos presentes. Aunque el binomio As y vida parecen en sí mismo un contrasentido, son varias las aplicaciones del As en fármacos usados como quimioterápicos o antiparasitarios.

El As es utilizado por algunos microorganismos en su metabolismo como agente oxidante (aceptor de electrones) o como fuente de energía (agente reductor), si bien lo más común son los microorganismos que simplemente desarrollan estrategias para evitar su toxicidad. Son taxonómicamente diversos y metabólicamente versátiles. Así, por ejemplo, el arsénico reducido [arsenito, As(III)] es oxidado a arseniato [As(V)] por las bacterias oxidantes del As(III). Estos organismos quimiolitioautótrofos utilizan oxígeno (respiración aerobia) y en algunos casos nitrato (respiración anaerobia) como aceptores terminal de electrones, a la vez que realizan la fijación de CO<sub>2</sub> atmosférico. Existen también microorganismos oxidadores de As(III) heterotróficos (mixótrofos), donde se utiliza el carbono orgánico como fuente de carbono.

La actinobacteria *Corynebacterium glutamicum* se caracteriza por presentar una elevada resistencia a arsénico. El arsenito [As(III)] entra en *C. glutamicum* por un sistema todavía desconocido, siendo expulsado a través de las permeasas de arsenito (CC<sub>2</sub>Acr3s), canales transmembrana que actúan como antiportadores de As(III). El arseniato [As(V)], al igual que ocurre en otros organismos, entra en las células a través de los sistemas de transporte específicos e inespecíficos de fosfato (tipo Pst y Pit respectivamente). En el citoplasma de *C. glutamicum*, el As(V) es reducido a As(III) mediante la catálisis realizada por enzimas arseniato reductasas (CC<sub>2</sub>ArsCs); estas enzimas presentan un mecanismo de acción basado en la presencia del pseudodisacárido micotiol (MSH) y la micorredoxina (Mrx1), enzima esta última descrita por primera vez en nuestro trabajo y que permite describir la presencia de una tercera subfamilia de arseniato reductasas celulares; el As generado en este proceso, As(III), es posteriormente eliminado por las permeasas de arsenito.

En *C. glutamicum* los procesos de resistencia a As están basados en la presencia de dos operones cromosómicos de resistencia, *ars1* y *ars2*, que contienen genes para tres productos proteicos: represor transcripcional (CC<sub>2</sub>ArsR), arsenito permeasas (CC<sub>2</sub>Acr3) y arseniato reductasas (CC<sub>2</sub>ArsC). La expresión de los operones *ars* es inducible por As(III), pero no por As(V). La presencia de As(III) en el interior de la célula permite su interacción con el sitio de unión a metales del represor-metaloregulador CC<sub>2</sub>ArsR, que está constituido por tres cisteínas. Esto provoca un cambio conformacional del represor, liberándose del operador y quedando ahora los promotores accesibles para que las RNA polimerasas expresen el resto de los genes de los dos operones *ars*. La reducción del As(V) citoplasmático depende

en *C. glutamicum* de las arseniato reductasas 1 y 2 (CC<sub>2</sub>ArsC1 y CC<sub>2</sub>ArsC2), cuyos genes están presentes en cada uno de los operones, y que a su vez utilizan el mecanismo de acción descrito anteriormente (MSH/Mrx1). Sin embargo una pequeña proporción de As(V) es reducido directamente mediante su interacción con micotiol (MSH), e independiente del mecanismo de las arseniato reductasas, lo cual justificaría que mínimas cantidades del As(III) generado pueda servir de sensor para inducir la expresión de los operones *ars* en *C. glutamicum*.

## Role of Cfh3p in the morphogenesis of *Schizosaccharomyces pombe*

Mirza Mohammad Reza Sharifmoghdam

Directora: M<sup>a</sup> Henar Valdivieso Montero.

Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Biología/Instituto de Microbiología Bioquímica (Centro Misto Universidad de Salamanca/CSIC).

En este trabajo se ha caracterizado la función de Cfh3p, una proteína de *Schizosaccharomyces pombe* que presenta similitud con Chs4p. Chs4p es una proteína de *Saccharomyces cerevisiae* que regula a la quitina sintasa Chs3p a varios niveles: es un activador bioquímico, ancla a Chs3p al anillo de septinas y regula la estabilidad de Chs3p en la membrana plasmática. El hecho de que en *Schizosaccharomyces pombe* no haya quitina nos llevó a investigar la función de Cfh3p. Los resultados han demostrado que Cfh3p es un regulador de Bgs1p, una enzima glucán sintasa que es necesaria para la síntesis del septo primario. La regulación de Bgs1p por Cfh3p se ejerce a nivel post-traduccional. En concreto, se ha demostrado en este trabajo que Cfh3p estabiliza a Bgs1p en la membrana plasmática.

Además en este trabajo se ha demostrado que la glucán sintasa Bgs1p es necesaria para la estabilidad de los anillos contráctiles, necesarios para la citocinesis, y que la regulación de Cfh3p juega un papel relevante en esta función.

Finalmente se ha visto que la regulación de Bgs1p por Cfh3p es más necesaria en condiciones de estrés, así se ha visto que en estas condiciones los anillos contráctiles son muy inestables tanto en una cepa mutante para *cfh3* como para una cepa mutante *cps1/bgs1*. Esto se ha observado en condiciones de estrés osmótico, nutricional y mecánico. Sin embargo, se ha visto que el daño producido en los anillos por el estrés se repara por las células y que este daño no es la causa de la sensibilidad de las células mutantes *cfh3*, *bgs1* y *cfh3 bgs1* al estrés. La razón para esta sensibilidad parece ser el hecho de que en estas condiciones la síntesis de la pared celular, y del b-glucano en particular, están reducidas significativamente.

## Caracterización de un nuevo poliéster presente en las cepas lisas de *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium obuense*, *Mycobacterium parafortuitum*, *Mycobacterium chubuense* y *Mycobacterium gilvum*. Implicación en la morfología colonial, motilidad y formación de biofilms

Gemma Agustí Adalid

Directoras: Marina Luquin Fernández y Esther Julián Gomez.

Grupo de Micobacterias, Dept. Genética y Microbiología, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona.

Las micobacterias son un grupo de microorganismos de gran importancia clínica, ya que existen múltiples especies que son agentes causales de varias enfermedades humanas con unas importantes morbilidades y mortalidades. Entre este grupo de micobacterias patógenas destacamos *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, agentes causales de la tuberculosis y la lepra, respectivamente.

Por otra parte, aparte de los microorganismos que constituyen los complejos *M. tuberculosis* y *M. leprae* encontramos un grupo numeroso de micobacterias, formado por micobacterias ambientales (MNT). Este grupo engloba más de 130 especies micobacterianas entre las cuales, aproximadamente un tercio podrían estar relacionadas con enfermedades en humanos y ser las responsables de las denominadas micobacteriosis, aunque a diferencia del complejo *M. tuberculosis* y *M. leprae*, las especies de MNT no son patógenos obligados.

Las MNT tienen una gran capacidad de prevalencia en aguas de distribución y esto es debido principalmente a su capacidad de crecer en un amplio rango de condiciones ambientales y, sobre todo, a su capacidad de colonizar superficies. La motilidad y la capacidad de adherirse a superficies son algunas de las respuestas funcionales que se manifiestan en el proceso de colonización de una superficie. Por lo tanto el estudio de la motilidad y la capacidad de adhesión a diferentes materiales nos puede ayudar a entender y determinar los mecanismos de colonización, persistencia y transmisión de las MNT en el medio ambiente.

En el género *Mycobacterium*, los efectos de la morfología colonial en las funciones biológicas son múltiples. Diferentes estudios, en *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium smegmatis*, muestran una relación directa entre la morfología colonial, la motilidad, la hidrofobicidad, la adhesión celular y la formación de biopelículas en la interfase líquido-aire, además de relacionar estas funciones biológicas con la presencia en la pared celular de estas micro-

bacterias de un tipo específico de glicolípidos denominados glicopeptidolípidos.

Esta tesis se ha centrado en estudiar y relacionar la morfología colonial con las funciones biológicas (motilidad, hidrofobicidad, adhesión celular y formación de biopelículas en superficie), descritas inicialmente en *M. avium*, *M. abscessus* y *M. smegmatis*, en otro grupo de micobacterias ambientales, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium chubuense*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium obuense*, *Mycobacterium parafortuitum* y *Mycobacterium vaccae*. Estas especies micobacterianas tienen en común que son de crecimiento rápido, presentan originariamente una morfología colonial lisa y, según los estudios comparativos del 16S ARN, son filogenéticamente próximas entre ellas, a la vez que filogenéticamente distantes de las especies micobacterianas ya estudiadas.

En este sentido, nos propusimos obtener de forma espontánea, a partir de las colonias lisas de *M. aurum*, *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* y *M. vaccae*, variantes rugosas estables las cuales fueron aisladas en cultivo puro. Posteriormente, nos centramos en analizar los lípidos y glicolípidos de la pared celular de estas micobacterias mediante cromatografía en capa fina para comprobar si se observaban diferencias en la composición lipídica y glicolípida entre las dos variantes morfológicas. Además, se llevó a cabo el estudio comparativo de la capacidad de motilidad, de las características hidrofóbicas, de la adhesión celular y de la formación de biopelículas en la interfase líquido-aire entre las dos morfologías coloniales en las diferentes especies estudiadas. Y por último, se realizaron estudios genéticos con el fin de determinar las bases moleculares relacionadas con los cambios de morfología colonial en *M. vaccae*.

## Bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos: análisis estructural de polisacáridos y detección molecular de estirpes que sintetizan $\beta$ -(1<sup>3</sup>)(1<sup>2</sup>)-D-glucanos

**Idoia Ibarburu López**

Directoras: **Ana Jesús Irastorza Iribas y María Teresa Dueñas Chasco.**  
Facultad de Ciencias Químicas de San Sebastián (UPV/EHU).

Entre los microorganismos presentes en la sidra natural producida en el País Vasco destacan algunas bacterias del ácido láctico (BAL) por su capacidad de producir exopolisacáridos (EPS). Los efectos deletéreos que causan los EPS en la sidra debido a un aumento de la viscosidad de la bebida, se traducen en pérdidas económicas para el sector sidrero. Sin embargo, la producción de EPS por estas cepas con status GRAS (*Generally recognized as safe*) despierta un interés biotecnológico en la industria alimentaria no sólo porque mejoran la textura de algunos productos fermentados, sino también porque algunos EPSs tienen efectos beneficiosos para la salud.

El primer objetivo de esta tesis ha sido el aislamiento y la identificación fenotípica y molecular de cepas productoras de EPSs a partir de sidra. De algunas cepas seleccionadas se realizó asimismo la caracterización estructural de sus exopolisacáridos. La mayor parte de las cepas resultaron ser productoras del mismo  $\beta$ -(1<sup>3</sup>)(1<sup>2</sup>)-D-glucano, mientras que algunas producían heteropolisacáridos. Además, se evaluó la influencia de la composición del medio de cultivo sobre la producción de EPS por la cepa *Oenococcus oeni* I4. Finalmente, se han puesto a punto métodos moleculares basados en la PCR para la detección de cepas productoras del  $\beta$ -(1<sup>3</sup>)(1<sup>2</sup>)-D-glucano. Estos métodos tienen como diana el gen *gtf*, que codifica para la única glicosiltransferasa necesaria para la síntesis del  $\beta$ -glucano.

## Genetic and physiological characterization of two ISL3-like insertion sequences of *Pseudomonas stutzeri* AN10

**Joseph A. Christie de Oleza**

Directores: **Rafael Bosch y Balbina Nogales.**  
Universitat de les Illes Balears.

Se han encontrado dos elementos de tipo ISL3 en *Pseudomonas stutzeri* AN10: ISPst9, una nueva secuencia de inserción descrita en este trabajo, y una isoforma de ISPpu12. Éstas se encuentran situadas próximas a los genes implicados en la degradación del salicilato en el cromosoma de esta cepa. Ambas son elementos móviles funcionales con genes que codifican para la transposasa y repeticiones invertidas similares, pero con genes acompañantes diferentes. Al igual que otras secuencias de inserción relacionadas de tipo ISL3, ISPst9 parece estar implicada en inactivación de genes catabólicos como se observó cuando este elemento móvil se insertó en el gen *nahH* de *P. stutzeri* AN142, un derivado de *P. stutzeri* AN10. Una actividad catabólica normal puede ser reestablecida cuando la secuencia de inserción es escindida de forma perfecta.

Se ha demostrado que la transposición de los elementos de tipo ISL3 presentes en *P. stutzeri* AN10 se activa fuertemente al sufrir la célula una interacción conjugativa. Dicho incremento de la transposición no se produce cuando es eliminado *tnpR*, gen que codifica para un regulador transcripcional de tipo MerR presente en ISPpu12. Ningún estímulo o regulación tan fuerte ha sido descrita para ninguna otra secuencia de inserción. De tal forma, se presume que la interacción conjugativa desencadena una cascada de señales dentro de la célula de *P. stutzeri* AN10 que activa *TnpR* de ISPpu12. La activación de *TnpR* daría lugar a un incremento de transcripción del gen que codifica para la transposasa incrementando así la transposición de la secuencia de inserción. La actividad de la transposasa de ISPpu12 puede actuar en *trans* sobre ISPst9 ya que presenta repeticiones invertidas similares a las de ISPpu12, pudiendo

ser ambas secuencias de inserción movilizadas tras el estímulo. Esta movilización no se observa en otras secuencias de inserción de tipo IS5 presentes en *P. stutzeri* AN10.

La transposición de ambas secuencias de inserción de tipo ISL3 se lleva a cabo mediante un mecanismo conservativo, formando intermediarios circulares. Estos círculos presentan las repeticiones invertidas de la secuencia de inserción confrontadas y separadas por una secuencia de 5 pb que proviene del DNA que flanquea el elemento móvil. La secuencia de inserción se escinde de su posición original de forma imperfecta, pese a que una escisión perfecta es posible. La actividad máxima de formación de intermediarios circulares se alcanza tras sólo 2,5 horas de iniciar el evento conjugativo.

## Caracterización molecular de la ruta de degradación de ácido gálico en *Pseudomonas putida*

**Juan Nogales Enrique**

Director: **Eduardo Díaz Fernández.**  
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

*Pseudomonas putida* es una bacteria conocida por su capacidad para degradar una gran cantidad de compuestos aromáticos, incluido el ácido 3,4,5-trihidroxibenzoato (ácido gálico, GA), un compuesto muy abundante en la naturaleza que procede de la degradación de polímeros vegetales, tales como la lignina o los taninos. Dado que se desconocían los determinantes genéticos responsables del catabolismo del GA, el objetivo de esta Tesis ha sido el estudio molecular de la degradación de este compuesto en la bacteria modelo *P. putida* KT2440.

Se ha identificado el primer *cluster* génico, (*galTAPgalRgalBCD*), involucrado en la degradación completa de GA que se describe en la literatura, y se ha diseñado una casete génica *gal* móvil y capaz de transferir la capacidad de crecer en GA a otras bacterias, e.g., *E. coli*.

El gen *galA* codifica la primera galato dioxigenasa que se describe en la literatura, la cual actúa sobre GA para producir la forma ceto del ácido 4-oxalmesaconato (OMAceto) y cuya novedosa arquitectura molecular la convierte en el prototipo de un nuevo subgrupo de extradiol-dioxigenasas. El gen *galD* codifica una ácido 4-oxalmesaconato ceto-enol isomerasa, segunda etapa en la degradación de GA, siendo la primera vez que se describe esta actividad enzimática en la literatura y constituyendo el prototipo de un nuevo grupo de isomerasas no caracterizadas hasta ahora. Igualmente, se ha demostrado que el gen *galB* codifica una hidratasa, la cual actúa sobre la forma enol del OMA originando ácido 4-oxalcitromálico (CHA). Estudios sobre las relaciones estructura-función de GalB han demostrado que se trata de una zinc-hidratasa perteneciente a la superfamilia de las zinc-hidrolasas, representando el prototipo de un nuevo grupo de hidratasas. Finalmente, se ha demos-

trado que el gen *galC* codifica una CHA aldolasa que produce la rotura del CHA produciendo piruvato y oxalacetato.

Por otro lado, el gen *galT* codifica un transportador de la familia MFS que utiliza la fuerza protón-motriz para energizar el transporte, siendo esencial tanto para el crecimiento en GA como para la quimiotaxis hacia este compuesto. Además, se ha demostrado que el gen *galP* codifica una porina de membrana externa de la familia OpdK que contribuye a un eficiente transporte de GA cuando éste se encuentra a bajas concentraciones.

El cluster *gal* se organiza en tres unidades transcripcionales, *galTAP*, *galR* y *galBCD* controladas por los promotores *Pt*, *Pr* y *Pb*, respectivamente, estando regulados por el producto del gen *galR* que codifica un regulador transcripcional de la familia LysR (LTTRs). GalR actúa activando los promotores catabólicos (*Pt* y *Pb*) y reprimiendo a *Pr*, siendo el OMA el metabolito inductor. Estudios de estructura-función del regulador GalR, así como estudios de unión DNA-proteína, sugieren que GalR es el prototipo de un nuevo subgrupo de LTTRs, que posee dos dominios hélice-giro-hélice (HTH) en su extremo N-terminal y un mecanismo de activación diferente al establecido para los reguladores clásicos LTTRs. El sistema regulador GalR/*Pb* se ha utilizado para el diseño del primer biosensor celular de GA. Finalmente, un modelo sobre la evolución del cluster *gal* en bacterias ha sido propuesto.

### Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida*: aplicaciones biotecnológicas

Laura Isabel de Eugenio Martínez

Directores: **Maria Auxiliadora Prieto Jimenez y Pedro Garcia Gonzalez.**  
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros de reserva que muchas bacterias sintetizan en condiciones de desequilibrio nutricional y exceso de fuente de carbono, muy interesantes desde el punto de vista industrial por sus propiedades similares a las de los plásticos de la industria petroquímica. Además, todos los monómeros de 3-hidroxiácidos incorporados en la molécula son enantioméricamente puros y de la forma *R*, por lo que se ha planteado el uso de los PHAs como fuente de estos valiosos sintones. Dependiendo del microorganismo productor y de la fuente de carbono suministrada los PHA pueden ser scl-PHA (PHA de cadena corta, a partir de monómeros de hasta 4 átomos de carbono) o mcl-PHA (PHA de cadena media, con monómeros de 5 o más átomos de carbono). Los genes

implicados en la síntesis y degradación de PHA en las bacterias del género *Pseudomonas* son *phaC1* y *phaC2*, codificantes de polimerasas; *phaZ*, codificante de una despolimerasa; *phaD*, que codifica una proteína reguladora de la familia TetR y *phal* y *phaF*, codificantes de las fasinas PhaF y Phal. En esta Tesis Doctoral se ha analizado en profundidad la expresión del gen *phaZ* de la cepa modelo en biotecnología ambiental *P. putida* KT2442 en relación al resto de los genes del cluster mediante RT-PCR en tiempo real. Así, se ha determinado que existen dos promotores principales que dirigen la transcripción de los genes *pha*,  $P_{C1}$  y  $P_I$ . De igual modo, se ha estudiado el efecto del medio de cultivo sobre la transcripción de *phaZ* y la localización de la proteína PhaZ en el interior celular. Dicha enzima ha sido purificada a homogeneidad electroforética y caracterizada bioquímicamente. De igual modo, se han analizado los productos de reacción, mediante LC-MS y ESI-MS. En una siguiente aproximación se ha realizado una comparación entre despolimerasas intra y extracelulares del género *Pseudomonas*. De este análisis se extrajo la información necesaria para realizar experimentos de mutagénesis al azar sobre PhaZ de KT2442, obteniendo versiones mutantes de la enzima con actividad esterasa y despolimerasa aumentada. Por último, se han diseñado aplicaciones biotecnológicas para la obtención de 3-hidroxiácidos y oligómeros enantiopuros utilizando cepas productoras de despolimerasas intra y extracelulares de *Pseudomonas*.

### Degradación de compuestos aromáticos en *Rhodococcus sp.* estirpe TFB

Laura Tomás Gallardo

Directores: **Eduardo Santero Santurino y Belén Floriano Pardo.**  
Universidad Pablo de Olavide.

En esta Tesis Doctoral se ha realizado la caracterización taxonómica y fisiológica de una nueva estirpe bacteriana, denominada TFB, aislada de los fangos del río Rhin (Alemania) que se ha adscrito al género *Rhodococcus*.

Una de las características más importantes de la estirpe TFB es su capacidad de metabolizar un amplio rango de compuestos aromáticos utilizándolos como fuente de carbono y energía. En este trabajo se han descrito las rutas de degradación de los tres compuestos aromáticos seleccionados: ftalato, tetralina y naftaleno. Para la caracterización de la degradación de estos compuestos se ha empleado una aproximación proteómica, poniéndose a punto la metodología 2D-DIGE para comparar el proteoma de la bacteria en diferentes condiciones de cultivo. La identificación de proteínas específicamente inducidas en cada condición ha permitido tanto el establecimiento de las rutas de degradación para cada compuesto como el conocimiento de la respuesta fisiológica de la bacteria a los mismos. Mediante genética reversa se han determinado los genes implicados en cada ruta pudiéndose completar

el trabajo con estudios de regulación de la expresión génica de rutas catabólica en *Rhodococcus sp.* estirpe TFB.

### Intervención de los probióticos en la modulación de funciones inmunes. Acción de *Lactobacillus plantarum* en la inducción de muerte celular

M<sup>a</sup> Elena Puertollano Vacas

Directores: **Manuel A. de Pablo Martínez, M<sup>a</sup> Ángeles Puertollano Vacas y Alfonso Ruiz-Bravo López.**  
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad de Jaén.

A lo largo de los últimos años el interés por el efecto que los probióticos tienen sobre la salud y en especial sobre el sistema inmune ha crecido considerablemente. El término probiótico deriva del griego “pro bios” para la vida y con él se ha designado a distintos microorganismos que ejercen un efecto beneficioso en humanos y animales. En el 2001 la FAO/WHO definió a los probióticos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso en la salud del hospedador”. *Lactobacillus plantarum* es la especie del género *Lactobacillus* más frecuentemente aislada en el tracto gastrointestinal de humanos. Además aglutina varios de los requisitos deseables en un probiótico tales como la resistencia a pH ácido y sales biliares, producción de sustancias antimicrobianas (plantaricina) y adhesión a las células del epitelio intestinal.

En este trabajo de investigación trabajamos con una cepa de *L. plantarum* aislada de kéfir. Una vez comprobada la resistencia a ácidos y sales biliares (así como otras características deseables en un probiótico) nos propusimos evaluar el efecto que la administración oral del lactobacilo, tenía sobre el sistema inmune de animales sometidos posteriormente a un estado de shock séptico por el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*. Tras evaluar distintos parámetros relacionados con la función inmune (tasa de supervivencia tras infección con el patógeno, recuperación de *L. monocytogenes* viables desde bazo e hígado, actividad bactericida de macrófagos peritoneales y determinación de citoquinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y moléculas de adhesión) comprobamos que el tratamiento con el probiótico provocaba una disminución en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6) y un incremento de citoquinas involucradas en la defensa del huésped frente a patógenos intracelulares (IL-12 e IFN- gamma). Esta reducción de la respuesta inflamatoria en ningún momento comprometía la supervivencia del huésped ni empeoraba la respuesta del mismo frente a la infección por lo que concluimos que la administración de *L. plantarum* podría suponer un beneficio en el manejo de desórdenes de tipo

inflamatorio ya que disminuye la respuesta inflamatoria del huésped sin que se incremente la susceptibilidad de este a la infección.

Por otro lado también evaluamos el efecto *in vitro* que el sobrenadante procedente del cultivo de esta cepa de *L. plantarum*, tenía sobre la línea de células tumorales HL-60 y sobre una cepa patógena de *Escherichia coli*. En el caso de HL-60 comprobamos que el sobrenadante provocaba muerte celular en el cultivo mediante necrosis, hecho que confirmamos mediante la realización de distintos ensayos encaminados a evaluar los mecanismos de muerte celular que desencadenaba el sobrenadante, como la medida de lactatodeshidrogenasa, marcaje con iodo de propidio, externalización de fosfatidil serina y otras. Por último comprobamos que el sobrenadante de *L. plantarum* era capaz de producir un efecto bacteriostático en el crecimiento de una cepa patógena de *E. coli* y que este efecto estaba mediado por un incremento en la permeabilidad de membrana de la bacteria, hecho que comprobamos mediante marcaje fluorimétrico con sitox green.

## Elementos genéticos móviles y resistencia a antimicrobianos en serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica*

Irene Rodríguez Fernández

Directoras: **M. Carmen Mendoza Fernández y M. Rosario Rodicio Rodicio.**

Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional; Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo.

La emergencia y diseminación de resistencias antimicrobianas supone un problema para la salud pública y la sanidad animal puesto que pone en serio peligro la eficacia del principal tratamiento contra las infecciones bacterianas. Por este motivo son especialmente interesantes los estudios centrados no sólo en la identificación de los determinantes de resistencia, sino también de los mecanismos que intervienen en su dispersión. En este contexto, la presente Tesis Doctoral profundiza en la incidencia y caracterización molecular de elementos genéticos implicados en la captura, diseminación y mantenimiento de genes de resistencia a antimicrobianos por cepas de serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica*, un patógeno bacteriano que, por su carácter zoonótico, podría estar ocupando un lugar relevante como donador y receptor de genes de resistencia. Los puntos desarrollados en este trabajo fueron fundamentalmente tres:

1.—Se demostró el importante papel que juegan los integrones de clases 1 y 2, constatando su presencia en un gran número de cepas multiresistentes (mayoritariamente clínicas), aisladas en el Principado de Asturias y el resto de España. Dos hechos destacables fueron: a) la nueva descripción

de los integrones de clase 1 con las regiones variables: 2300 pb/*estX-smr-aadA1* y 2100 pb/*dfrA1-597pb-aadA24*; y b) la primera identificación de integrones de clase 2 en los serotipos *S. Virchow*, *S. Grumpensis*, *S. Panama* y *S. Worthington*. Se confirmó la asociación de estas unidades genéticas con elementos transponibles, observando diferentes configuraciones integrón de clase 1-transposón tipo Tn21 o integrón de clase 2-transposón tipo Tn7. Además, en la mayoría de los casos estas estructuras se encontraban localizadas en plásmidos conjugativos de gran tamaño, a veces portadores de resistencias adicionales no asociadas a integrones.

2.—Dada la creciente emergencia de las resistencias a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, se rastrearon  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y enzimas plasmídicas tipo AmpC en cepas alemanas procedentes de alimentos y animales. Subraya que la familia de cefotaximasas CTX-M-1 era la más frecuente, y se encontraba asociada a secuencias de inserción tipo ISEcp1. Tanto los genes de BLEEs como de enzimas AmpC, se localizaban en plásmidos de tamaño variable, la mayoría conjugativos.

3.—Otro hecho alarmante, dentro del panorama de la multiresistencia, es la aparición de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia. En esta Tesis Doctoral se identificó y caracterizó parcialmente un plásmido, denominado pUO-SeVR1, que se encontró en un aislamiento de *S. Enteritidis*, el serotipo con mayor incidencia en infecciones humanas. Los resultados obtenidos sugieren que deriva de pSEV (el plásmido de virulencia específico de *S. Enteritidis*) por haber adquirido genes de resistencia asociados a un integrón y a diversos elementos transponibles. A la vez se desvelan algunos de los mecanismos que controlan la transmisión estable del plásmido dentro de la población bacteriana.

Esta Tesis Doctoral ilustra el concepto de “ingeniería evolutiva” que, aplicado en este contexto, refleja la importancia que las secuencias “acompañantes” de un gen y sus propiedades combinatorias tienen en la adaptabilidad bacteriana.

## Biology of *Ralstonia solanacearum* phylotype II in host and non-host environments

María Belén Álvarez Ortega

Directoras: **Dr. María Milagros López González y Dr. Elena González Biosca.**

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Universidad de Valencia.

The *Ralstonia solanacearum* species complex causes bacterial wilt, a plant disease affecting economically important crops and ornamentals worldwide. The phylotype (ph) II race 3 biovar (bv) 2 produces potato brown rot and bacterial wilt in solanaceous plants in temperate

climates and has recently been introduced to several areas of the European Union and the USA, where the pathogen has a quarantine status. Presence of *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 in these zones raised questions on biological and phytopathological aspects of this bacterium, some of them being addressed in this work. Thus behaviour, ability for survival and disease inducing capacity of European *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 have been assessed in a range of different plant species and diverse surface run-off water samples.

Behaviour of *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 *in planta* has led to a classification in susceptible or tolerant hosts and non-hosts, based on the pathogen histological localization and isolation. Susceptible and tolerant hosts were highly invaded in root xylem but, heavily or weakly colonized respectively in stem xylem. They are to be avoided as candidates for crop rotation. Non-hosts were not invaded in plant xylem but, occasional presence of the pathogen in root cortex or on surface might occur and so, some of them might act as reservoirs. They could be selected for crop rotation systems after being carefully tested in open field conditions.

Ability for survival of *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 in environmental water microcosms has been influenced by abiotic and biotic factors. When faced to oligotrophy as the only stressing factor the pathogen displayed a considerable endurance. It resorted to a number of survival strategies which enabled it to survive in environmental water microcosms over four years under starvation, retaining disease inducing capacity in the host even by watering. Adaptations to overcome nutrient limitation during the long period were starvation-survival responses, the entrance into a viable but non-culturable state, progressive transformation from the typical bacillar shape into coccoid forms reduced in size, filamentation and budding phenomena and aggregation.

Survival strategies were also successfully exhibited by the pathogen when exposed to environmental temperatures simultaneously to nutrient scarcity conditions. Thus, at 4°C a viable but non-culturable state dependent on water nutrient contents was cold-induced, whilst at 14°C and 24°C apparently similar starvation-survival responses revealed a distinct effect of temperature on coccoid formation.

On the other hand, indigenous freshwater protozoa, bacteria and/or phages with predatory, competitive or lytic activity reduced significantly pathogen persistence. Among them, lytic bacteriophages were the main responsible for the decrease in *R. solanacearum* populations, although protozoa and other bacteria also contributed. The effect was more appreciable at 24°C than at 14°C because of slower biotic interactions at the lower temperature. The pathogen was able to adapt itself, succeeding in surviving and keeping pathogenic in almost all conditions.

This work intends to contribute to the progress in the knowledge of the interactions between *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 and natural environments, which may allow to improve the strategies to prevent pathogen dissemination and bacterial wilt spread in natural settings.

## Expresión heteróloga de la proteína mayor de la cápsida (L1) del virus del papiloma humano tipo 18. Purificación y caracterización de las proteínas recombinantes y partículas similares al virus (VLPs).

**Mónica Martínez Martínez**

Directoras: **Laura Benítez Rico y Marta Ortiz Rivera.**

Departamento de Microbiología-III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid y Servicio de Diagnóstico y Referencia de Retrovirus y Papilomavirus, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

La infección con el virus del papiloma humano (VPH) es la ETS más común en mujeres. Un tercio de los VPH mucosotrópicos, denominados de alto riesgo, están relacionados con el cáncer de cérvix, siendo el tipo 18 el segundo más frecuente. El 60% de las mujeres infectadas sufrirán seroconversión con anticuerpos neutralizantes dirigidos a epítopos conformacionales de la proteína mayoritaria de la cápsida (L1). Si bien los títulos de anticuerpos tras la infección natural son bajos, los adquiridos tras la vacunación son 40 a 100 veces superiores.

La producción de antígenos de VPH es necesaria para estudiar la respuesta humoral frente a la infección natural así como en población vacunada, dado que se desconoce la duración de la protección conferida por la vacunación. El objetivo del trabajo fue la comparación de la producción la proteína L1 de VPH18 como proteína recombinante en tres sistemas heterólogos: bacterias (*Escherichia coli*), levaduras (un sistema basado en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*) y en células de insecto (empleando baculovirus recombinantes).

En *E. coli* la expresión se realizó como proteínas de fusión con GST observándose la formación de cuerpos de inclusión. El tratamiento con lisozima, agentes reductores y detergentes durante la lisis y/o solubilización de la fracción insoluble, incrementó su recuperación. La purificación cromatográfica combinada con elución en PBS/urea, permitió eliminar proteínas bacterianas coprecipitantes. La proteína GST-ΔN7118L1 fue reconocida en Westernblot y ELISA por sueros comerciales y humanos de infección natural.

En *P. pastoris* se detectó transcripción específica de las proteínas a niveles basales no inducibles por metanol, pero no traducción, planteándose que puedan existir secuencias en la región de VPH18 que se va a expresar relacionadas con la terminación prematura de la transcripción en levaduras, que requerirán un análisis más detallado para su identificación.

Finalmente se purificaron *Virus Like Particles* (VLPs) de VPH18 en células de insecto empleando baculovirus recombinantes. Para optimizar la pro-

ducción de VLPs, se realizó un estudio previo de la cinética de expresión de la proteína en este sistema, ya que a diferencia del prototipo VPH16, la producción en este tipo es más costosa y menos eficiente. Para ello se analizaron diferentes parámetros que afectan a la expresión como las líneas celulares utilizadas (Sf9 y Sf21), presencia/ausencia de suero fetal bovino en el medio, los índices de multiplicidad de la infección (MOIs) empleados y el tiempo de infección. Los estudios de cinética pusieron de manifiesto los parámetros óptimos para la producción y purificación de VLPs de VPH18 (línea Sf21, medio suplementado con SFB, MOI 10 y tiempo de infección de 48 horas). Dichas partículas fueron analizadas cualitativamente por microscopía electrónica y *Dynamic Light Scattering* (DLS), observándose discordancias entre los resultados obtenidos por ambas técnicas cuando las muestras se diluyen a concentraciones inferiores al límite necesario para el ensamblaje.

## Estudio de la interacción física y funcional de la proteína fosfatasa dual Msg5 con MAP quininas en *Saccharomyces cerevisiae*

**María Jose Marín Cuenda**

Directores: **María Molina Martín y Humberto Martín Brieva.**

Dpt. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Las fosfatasas de especificidad dual (DUSPs) desempeñan un papel clave en la modulación de la activación de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs. Dentro de este grupo se encuadra Msg5, una DUSP de *Saccharomyces cerevisiae* que se expresa en la célula como dos isoformas de distinto peso molecular debido a la presencia de comienzos de traducción alternativos. En concreto, esta fosfatasa regula negativamente la activación de las MAPKs de la ruta de integridad celular, Slt2, y de la ruta de apareamiento, Fus3, tanto en condiciones basales como de estimulación de ambas cascadas.

En este trabajo, se ha comprobado que en ausencia de Msg5 se induce la expresión de genes regulados por la ruta de apareamiento y de integridad celular, lo cual indica que la actividad de esta fosfatasa regula la respuesta a daño en la pared y a la presencia de feromona. Sin embargo, los mutantes *msg5Δ*, aunque muestran una elevada fosforilación de Slt2, no muestran un elevado nivel de expresión de los genes regulados por la ruta de integridad celular. Es decir, que la fosforilación de la MAPK Slt2 ocasionada por la falta de Msg5 no se traduce en un aumento de la fosforilación de los sustratos sobre los que actúa; entre ellos, no se detecta fosforilación de Mkk1 o Msg5 dependiente de Slt2, ni del factor de transcripción Rlm1 y como consecuencia no se logra una respuesta transcripcional dependiente de Rlm1 plena.

Los ensayos de copurificación demuestran que la isoforma larga de Msg5 presenta más afi-

nidad de unión a las MAPKs Fus3 y Kss1 que la isoforma corta, mientras que ambas isoformas interaccionan de manera similar con Slt2. Esta mayor afinidad de la isoforma larga se traduce en mayor actividad fosfatasa hacia la MAPK Fus3. A pesar de que Msg5 es capaz de interaccionar con Kss1 y de regular su fosforilación en condiciones de sobreexpresión, el análisis transcriptómico y los ensayos de fosforilación en mutantes *msg5Δ* demuestran que esta fosfatasa no regula la actividad de Kss1 ni en condiciones basales ni en las condiciones de activación de Kss1 ensayadas. Mediante el sistema de doble híbrido se ha comprobado que los 125 primeros aminoácidos de Msg5 son esenciales para la interacción con las MAPKs Slt2, Fus3 y Kss1, y que tan sólo los 45 primeros aminoácidos son necesarios para la unión a las dos últimas MAPKs. Se han identificado dos posibles dominios de interacción con MAPKs (dominios *docking*) en esta pequeña región de 125 aminoácidos del extremo N-terminal de Msg5, y se ha demostrado que MD2 no juega un papel relevante en la unión a ninguna de las 3 MAPKs ni en la regulación de su actividad. Sin embargo, el primer dominio MD1, situado dentro de los 45 primeros aminoácidos, media la unión a Fus3 y Kss1. La integridad del CD (*common docking*) en Fus3 y Kss1, es necesaria para la interacción con Msg5, a diferencia de lo que ocurre en Slt2 en la que no parece estar implicado este dominio para su unión a la fosfatasa. Estos hechos sugieren que la interacción de Slt2 con Msg5 no viene mediada por interacciones tipo *docking* convencionales como en el caso de Fus3 y Kss1 y que otras regiones de la zona amino-terminal de Msg5 deben estar implicadas en la interacción ente Msg5 y Slt2.

## Evaluación y optimización del carácter antimicrobiano de películas basadas en quitosano para su aplicación en envases activos y recubrimientos alimentarios

**Patricia Fernández Saiz**

Directores: **M<sup>a</sup> José Ocio Zapata y Jose María Lagarón Cabello.** Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA, CSIC). Universidad Politécnica de Valencia.

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido el estudio del quitosano como antimicrobiano para su empleo como material de envase alimentario con el fin de mantener la seguridad microbiológica del producto envasado. Para ello se analizaron numerosas variables esenciales relacionadas con el microorganismo, con las características del polímero y las condiciones de formación y almacenamiento de sus películas, todas ellas capaces de influir en las propiedades biocidas del compuesto. Además, se analizó su mecanismo de acción mediante espectroscopía de infrarrojo, a través de los cambios en la inten-

sidad de dos bandas principales correspondientes a los grupos activos antimicrobianos. Dado que la elevada sensibilidad al agua de las matrices de quitosano podría suponer una restricción fundamental para su aplicación en el envasado de alimentos, se desarrollaron películas compuestas resistentes al agua incorporando quitosano en otras matrices insolubles. Las mezclas resultantes mantuvieron un efecto antimicrobiano significativo además de presentar una excelente mejora en sus propiedades barrera al agua. Por último, se confirmó la eficacia de las películas obtenidas sobre un alimento real, obteniéndose resultados satisfactorios y alcanzándose, por tanto, el objetivo fundamental planteado inicialmente de mantener la seguridad microbiológica del producto envasado y alargar su vida útil.

## **Análisis genómico y funcional de la interacción planta-*Pseudomonas putida* KT2440 en la rizosfera: colonización y resistencia sistémica**

**Miguel Ángel Matilla Vázquez**

Directores: **Juan Luis Ramos Martín y María Isabel Ramos González.**  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada).

El entorno de la raíz y la región del suelo que la rodea constituyen la rizosfera, un hábitat de elevada actividad microbiológica. Al inicio de este trabajo sabíamos que la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 es una eficiente colonizadora de la rizosfera y la espermosfera de plantas con relevancia agronómica (ej. *Zea mays*). En esta Tesis Doctoral se presenta el primer análisis genómico con microarrays llevado a cabo con una bacteria en la rizosfera. Este estudio tiene la originalidad de considerar el estilo de vida sésil y ha desvelado que el microorganismo ajusta su expresión génica a este particular estilo de vida. Entre los 90 genes *rup* ("rhizosphere up-regulated") con inducción preferencial identificados, resultaron de especial interés *rup2560*, perteneciente al sistema de secreción de una hemoperoxidasa extracelular codificada por el locus PP2561, y *rup4959*, que codifica un regulador de respuesta con dominios GGDEF/EAL. Estos dominios enzimáticos están implicados en la síntesis y degradación, respectivamente, del segundo mensajero intracelular diguanilato cíclico (di-GMPc), del que es conocido su papel en la transición de sesilidad a motilidad. Evaluando la eficiencia competitiva de algunos mutantes en genes *rup* se han identificado nuevas funciones bacterianas relevantes en colonización tales como el metabolismo de compuestos aromáticos y la resistencia a estrés oxidativo.

Aunque se habían descrito ciertas propiedades de KT2440 en la promoción del crecimiento, no se había explorado su potencial en biocontrol. Un aspecto importante de este trabajo ha sido evidenciar la capacidad de KT2440 para proteger

a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* de la infección por el fitopatógeno *P. syringae* mediante resistencia sistémica inducida (ISR). Excepcionalmente, la manifestación de resistencia sistémica en presencia de KT2440 requiere las vías de señalización de salicílico y de jasmónico/etileno intactas. Además, la utilización de un mutante PP2561 nos ha permitido establecer una relación entre colonización, ISR y composición de los exudados radiculares.

Un aspecto clave en colonización es la motilidad bacteriana. Hemos explorado la importancia de la motilidad en superficie en este contexto. La motilidad tipo "swarming" tiene lugar a temperatura inferior a 30°C, es dependiente de pili de tipo IV, de lipopolisacáridos y de la disponibilidad intracelular de hierro a través del sideróforo pioverdina. La sobreexpresión del gen *rup4959* inhibe completamente el "swarming" y tiene un efecto negativo sobre la colonización del ápice radicular. La transcripción de este gen depende de  $\sigma^{38}$  y se activa en presencia de exudados radiculares y en microaerobiosis. Nuestras evidencias bioquímicas indican que *Rup4959* presenta actividad diguanilato ciclasa. En la rizosfera, esta proteína es responsable directa o indirectamente de cambios en la transcripción de varios genes. Además del efecto sobre la motilidad, la sobreexpresión de este gen provoca la aparición de un fenotipo pleiotrópico consistente en, (i) la sobreproducción de exopolisacáridos, (ii) la mayor formación de biopeículas, tanto en superficies abióticas como en la interfase aire-líquido, y (iii) la aparición de una morfología de colonia rugosa. En la formación de biofilm es esencial la adhesina LapA, aunque un mutante en esta proteína todavía manifestaba alteración en los otros dos caracteres fenotípicos. Sin embargo un exopolisacárido específico de KT2440, aún sin caracterizar, y los lipopolisacáridos fueron esenciales para la implantación del fenotipo pleiotrópico causado por un incremento en los niveles de di-GMPc.

## **Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino**

**Nerea García Benzaquén**

Directores: **José Francisco Fernández-Garayzábal Fernández, Joaquín Goyache Goñi y Ana Isabel Vela Alonso.**

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

*Pasteurella multocida* es una bacteria comensal del tracto respiratorio que puede dar lugar a diferentes patologías en distintas especies animales en todo el mundo. En el ganado porcino es el agente responsable de la rinitis atrófica progresiva (RAP) y de procesos neumónicos, formando parte del complejo respiratorio porcino, que es causa de importantes problemas sanitarios y económicos en las explotaciones de cría intensiva.

Además, en ocasiones, puede dar lugar a procesos septicémicos.

Se trata de una especie muy heterogénea en la que se distinguen tres subespecies (*multocida*, *gallicida* y *septica*), 14 biovars (1-14), 5 tipos capsulares (A, B, D, E y F) y 16 serotipos (1-16).

El principal objetivo de nuestro estudio fue el de caracterizar fenotípica y genéticamente aislados de *P. multocida* obtenidos a partir de diferentes muestras clínicas, principalmente neumónicas, de ganado porcino de diferentes regiones de España.

Se identificaron 205 aislados mediante el empleo de métodos bioquímicos (API 20E) y moleculares (PCR), confirmando que pertenecían a la especie *P. multocida*. Se determinó que existían diversos patrones bioquímicos, siendo algunos prevalentes, agrupando, de este modo, en 4 de ellos el 64% de los aislados.

Mediante diferentes pruebas bioquímicas se determinó que todos los aislados pertenecían a la subespecie *multocida*, siendo clasificados en un escaso número de biovars (1, 2 y 3). De ellos el biovar 3 fue el que se halló con una mayor prevalencia, resultado esperado, seguido del biovar 2 que, sin embargo, representaba una proporción considerablemente mayor (40%) a la hallada en estudios previos.

La determinación del tipo capsular mediante PCR permitió clasificar la mayoría de aislados en el tipo A (79%), siendo el resto de los tipos capsulares D (18,5%) y F (0,02%). Por otra parte, se detectó la presencia de la toxina dermonecrótica (PMT) únicamente en 16 aislados (7,8%). Estos resultados entran dentro de lo esperado, ya que la mayoría de las muestras procedían de procesos neumónicos en los que, generalmente, están implicadas cepas de tipo capsular A que carecen de la PMT. Además, la secuenciación del gen que codifica para la PMT de dos aislados de tipo capsular A, permitió comprobar que la secuencia era prácticamente idéntica a la del gen de cepas de tipo capsular D.

Respecto a la presencia de determinados genes asociados a la virulencia se demostró, utilizando para ello PCR simples y múltiples, que la mayoría de ellos estaban presentes en todos los aislados. Así, los genes *psi*, *omph*, *oma87*, *ptfA*, *nanB*, *nanH*, *tonB*, *hgbA*, *sodA* y *sodC* estuvieron presentes en el 100% de los aislados, mientras que el gen *tbpA* no se encontró en ninguno de ellos. Sin embargo, la prevalencia de los genes *pfhA* y *hgbB* fue variable (40% y 60%, respectivamente) y curiosamente estuvieron asociados al biovar. De este modo todos los aislados del biovar 2 poseían el gen *pfhA* y los de biovar 3 tenían el gen *hgbB*.

Por último, se utilizó la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE), calificada como el método "gold estándar" para la caracterización molecular de cepas de *P. multocida*. Mediante dicho procedimiento se pudieron clasificar los 205 aislados en 69 patrones diferentes, lo que suponía una diversidad genética moderada (0,31). A pesar de la variabilidad de perfiles de PFGE se pudo destacar la presencia de ciertos patrones prevalentes que se distribuían por las diferentes empresas productivas y regiones geográficas, permaneciendo a lo largo del tiempo. Además, se evidenciaron dos grupos genéticos

(con una similitud del 45%), diferenciándose claramente la población de cepas del biovar 2 de la población de cepas del biovar 3.

## **Detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en alimentos vegetales mediante PCR a tiempo real**

**Patricia Elizaquível Bárcenas**

Directora: **Rosa Aznar Novella.**

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.

La detección y cuantificación de microorganismos patógenos en alimentos es uno de los grandes retos a los que se enfrenta la industria alimentaria actualmente. Para minimizar riesgos y garantizar la calidad y seguridad de los productos, la aplicación de controles microbiológicos en la cadena de procesado es imprescindible. Los métodos tradicionales para la detección de patógenos en alimentos se basan en el aislamiento e identificación de colonias en medios selectivos tras varios pasos de enriquecimiento lo que alarga el proceso y, en ocasiones, el resultado no es concluyente. Como alternativa destacan los métodos inmunológicos y los de PCR. Entre los primeros, el VIDAS® es uno de los más utilizados por las empresas de alimentos por su facilidad de ensayo. Por otra parte, las técnicas de PCR constituyen una buena alternativa por su rapidez, sensibilidad y precisión. La PCR a tiempo real (RTi-PCR), además, ofrece la posibilidad de cuantificar los microorganismos presentes en la muestra automatizando el proceso, lo que permite procesar un número elevado de muestras.

En este trabajo se ha aplicado la RTi-PCR, para la detección de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *St. aureus*, evaluándose asimismo su utilidad como prueba diagnóstica en el control microbiológico de alimentos. La comparación de cuatro métodos comerciales de extracción de DNA, demostró que el método DNeasy Tissue Kit es el más eficiente para los cuatro patógenos, en las tres matrices vegetales ensayadas. La aplicación directa de la RTi-PCR en muestras de alimentos de contaminación natural permitió la cuantificación de los patógenos presentes en el 67% de las muestras que habían resultado positivas por PCR convencional tras el enriquecimiento correspondiente, revelando que *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 se encuentran generalmente en niveles de  $10^3$  ufc/g, *L. monocytogenes* de  $10^2$  ufc/g y *St. aureus* de 10 ufc/g. Las muestras restantes (33%) presentaron niveles inferiores a 10 ufc/g. La comparación de la RTi-PCR directa y el mini-VIDAS determinó que ambas técnicas presentan una

especificidad similar pero la RTi-PCR se comporta mejor en cuanto a “sensibilidad” y “seguridad”. En base a estos resultados, proponemos la utilización de la RTi-PCR para rastrear la presencia de patógenos en el análisis rutinario de alimentos ya que ha demostrado ser rápida y sensible. Sólo las muestras negativas se analizarían por PCR convencional, tras enriquecimiento, para asegurar la ausencia del patógeno.

Además, se diseñó un nuevo sistema de cebadores y sonda TaqMan para *Salmonella* spp. Combinando este sistema con los ensayos para *E. coli* O157:H7 y *St. aureus*, se ha puesto a punto una reacción de RTi-PCR múltiple para la detección simultánea y cuantitativa de los tres patógenos. La aplicación de la RTi-PCR múltiple, tras un paso enriquecimiento de tan sólo 6 horas permite la detección de hasta 1 célula de cada uno de los patógenos en 25 g. Por lo tanto, queda demostrada su validez como técnica analítica cuando la legislación exige “ausencia” del patógeno en 25 g, como es el caso de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 o de *St. aureus* en algunos alimentos.

## **Bacterias probióticas en leche fermentada. Viabilidad, capacidad competitiva y efecto en la evolución de patologías intestinales**

**Raquel Tabasco Rentero**

Directoras: **Teresa Requena Rolanía y Carmen Peláez Martínez.**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos, Instituto del Frío - CSIC.

La presente Tesis Doctoral describe los posibles mecanismos por los que bifidobacterias y lactobacilos influyen en el equilibrio de la microbiota intestinal y su posible repercusión en la evolución de la diarrea asociada al tratamiento antibiótico. Para llevar a cabo el estudio, se trabajó en la obtención de una leche fermentada que contenía dosis elevadas de bacterias probióticas viables. Los métodos de evaluación de viabilidad se realizaron con medios de cultivo libres de antibióticos que permitían diferenciar las cepas probióticas (*Bifidobacterium lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Lactobacillus casei* LC-01) de las bacterias del yogur *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). La determinación de viabilidad de las bacterias en estudio sin previo aislamiento en medios de cultivo y, por lo tanto, con una mayor rapidez de detección y cuantificación, se realizó mediante PCR a tiempo real asociada con monoazida de propidio.

Se determinó la capacidad de las cepas probióticas para colonizar el intestino, analizando la capacidad de exclusión competitiva de *L. acidophilus* LA-5 frente a cepas patógenas intestinales, como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enterica*. Además, se analizó el metabolismo fermentativo de las bacterias probióticas y se observó que tenían actividad  $\beta$ -fructofuranosidasa únicamente cuan-

do se habían crecido en presencia de oligofruktosa. El análisis de la producción de ácidos orgánicos por las cepas probióticas detectó la formación de los ácidos láctico, acético y fórmico. Por otra parte, se demostró que *L. acidophilus* LA-5 producía la bacteriocina lactacina B cuando crecía en co-cultivo con células viables de *S. thermophilus* o *L. bulgaricus*. La expresión de lactacina B en esta cepa está regulada por un mecanismo señal de auto-inducción a través de un péptido inductor secretado por la bacteria que activa un sistema regulador compuesto por una histidin kinasas y un regulador de respuesta.

La evaluación de la eficacia de las cepas probióticas suministradas en leche fermentada para reducir la diarrea asociada a tratamiento antibiótico se llevó a cabo mediante un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo (leche fermentada sin las cepas probióticas) que se realizó en colaboración con investigadores del Hospital Universitario Fundación de Alcorcón. Se realizó el análisis de microbiota intestinal cultivable y presencia de las cepas probióticas, así como se determinaron el contenido de ácidos orgánicos y las actividades enzimáticas del contenido fecal. En conclusión, el consumo diario de las cepas probióticas en leche fermentada no causó modificaciones significativas en la composición de la microbiota intestinal ni en el metabolismo fermentativo intestinal de los pacientes y, a su vez, tampoco se observaron diferencias significativas en la aparición de diarrea en los pacientes.

## **Determinantes moleculares que participan en la interacción *Fusarium oxysporum* – tomate**

**Yolanda Pareja Jaime**

Directores: **M. Isabel González Roncero y M. Carmen Ruiz Roldán.**  
Departamento de Genética, Universidad de Córdoba.

En este trabajo se han investigado las bases moleculares que determinan la patogenicidad del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre plantas de tomate.

*F. oxysporum* produce la enzima tomatinasa Tom1, que degrada el compuesto antifúngico a-tomatina hasta derivados menos tóxicos. Para estudiar el papel de *tom1* en la virulencia de *F. oxysporum*, se ha realizado la interrupción dirigida y la expresión constitutiva del gen. El proceso de infección de plantas inoculadas con transformantes de expresión constitutiva resulta en un incremento en el desarrollo de los síntomas de enfermedad, mientras que las plantas infectadas con mutantes nulos muestran un retraso en el proceso de infección, sugiriendo que Tom1, aunque no es esencial para la patogenicidad, es necesaria para la virulencia completa de *F. oxysporum*. La actividad tomatinasa total en las estirpes deficientes se ve reducida solo un 25%, y se observa  $\beta$ -tomatina como el mayor producto de hidrólisis de la saponina *in vitro*. El análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum* revela la existencia de cuatro

posibles genes responsables de otras tomatinas, cuyos productos podrían ser los responsables de la actividad tomatinasa reminiscente en los mutantes *Dtom1*.

En otro capítulo se ha estudiado si la causa de la avirulencia del mutante *DchsV* de *F. oxysporum*, deficiente en un gen sintasa de quitina de clase V y capaz de penetrar la planta y colonizar los tejidos internos de la raíz, se debe a una rápida elicitación de la respuesta de defensa de la planta, que conduce a una restricción del crecimiento fúngico. La co-inoculación de plantas con la estirpe silvestre y el mutante *DchsV* resulta en una reducción significativa del desarrollo de la enfermedad, lo que sugiere que este mutante ejerce un mecanismo protector. La colonización de la planta por la estirpe silvestre queda restringida durante la co-inoculación, como demuestran los ensayos de cuantificación de la biomasa fúngica. Además, se ha comprobado el incremento en la expresión de genes de defensa de la planta y en la actividad quitinasa en plantas inoculadas con el mutante *DchsV*.

En el tercer capítulo se ha analizado el papel de *Con7* en la patogénesis de *F. oxysporum*. Se han identificado tres genes *con7* en *F. oxysporum*, ortólogos al gen *con7* del patógeno de arroz *Magnaporthe grisea*, que determina un factor transcripcional esencial para la morfogénesis y la patogénesis fúngica. Los mutantes deficientes en el gen *con7-1* de *F. oxysporum* muestran alteraciones en el crecimiento polarizado y la formación de ramificaciones, y no producen síntomas de enfermedad en plantas, lo que indica que este gen es esencial para la correcta morfogénesis y patogénesis de *F. oxysporum*. Sin embargo, el factor *Con7-1* de *F. oxysporum* no regula la transcripción de algunos genes relacionados con la biosíntesis de pared y el establecimiento de la polaridad celular.

## Selección de microorganismos probióticos para su implantación en la elaboración de embutidos crudos curados de cerdo ibérico

Santiago Ruiz-Moyano Seco de Herrera

Directores: Alberto Martín González, María de Guía Córdoba Ramos y María José Benito Bernáldez.

Área de Nutrición y Bromatología, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura.

El objetivo de este estudio fue seleccionar bacterias ácido lácticas y bifidobacterias para su utilización como potenciales probióticos en la elaboración de embutidos crudos curados de cerdo ibérico. Un total de 1000 cepas se aislaron de embutidos crudos curados de cerdo ibérico (363),

heces humanas, (337) y heces de cerdo (300) en diferentes medios de cultivos. Aproximadamente un 30% de las cepas, principalmente aisladas de embutidos crudos curados en agar LAMVAB, se pre-seleccionaron para el estudio de sus propiedades probióticas, en base a su capacidad de crecimiento a las condiciones de pH y concentración de NaCl que se dan en este tipo de productos durante su procesado. En relación al estudio *in vitro* de la capacidad para tolerar las condiciones del tracto gastrointestinal, la exposición a valores de pH de 2,5 fue el criterio más selectivo. Sólo 51 de los 312 aislados preseleccionados toleraban adecuadamente este pH durante 1,5 h.

Todos los aislados ácido-tolerantes identificados como lactobacilos (18 cepas) fueron obtenidos de heces humanas (*L. casei* y *L. fermentum*) y heces de cerdo (*L. reuteri*, *L. animalis*, *L. murinus* y *L. vaginalis*). Las cepas identificadas como *P. acidilactici* (12 cepas) fueron aisladas de embutidos de cerdo ibérico principalmente y de heces de cerdo. Finalmente, trece de las quince cepas identificadas como enterococos fueron *E. faecium* y se aislaron de embutidos de cerdo ibérico, heces humanas y heces de cerdo. Estas cepas fueron evaluadas en lo referente a aspectos de seguridad y funcionales, como actividad hemolítica, susceptibilidad a antibióticos, presencia de genes de virulencia, producción de aminas biógenas y D-láctico, adhesión celular y actividad antimicrobiana frente a enteropatógenos y patógenos en alimentos.

Seis cepas mostraron las mejores propiedades probióticas: *P. acidilactici* S979, *P. acidilactici* S209, *E. faecium* S906, *L. reuteri* P519, *L. reuteri* P542, y *L. fermentum* H57. Las cepas *P. acidilactici* S979 y *P. acidilactici* S209 presentaron una capacidad de adhesión moderada a las células del epitelio intestinal, pero sólo la cepa *P. acidilactici* S979 fue capaz de inhibir competitivamente la adhesión de *S. choleraesuis*, y mostrar actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus in vitro*. *E. faecium* S906 fue capaz de adherirse moderadamente al epitelio intestinal y mostrar actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. Por último, *L. reuteri* P519, *L. reuteri* P542 y *L. fermentum* H57 mostraron una alta capacidad de adhesión a las células del epitelio intestinal, además de inhibir la adhesión de *E. coli* y *S. choleraesuis*. Estas cepas también mostraron actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. Las seis cepas se consideraron seguras para su utilización como potenciales probióticos en la elaboración de embutidos crudos curados de cerdo ibérico por su nula o baja capacidad de descarbonilación y producción de D-láctico, actividad hemolítica, resistencia a antibióticos y presencia de genes de virulencia en el caso de la cepa de enterococo.

Tres cepas, *P. acidilactici* S979, *L. fermentum* H57 y *L. reuteri* P519 se seleccionaron para la elaboración de embutidos crudos curados de cerdo ibérico en planta piloto. Los recuentos microbiológicos y propiedades sensoriales de los embutidos elaborados se compararon con un lote control. Las cepas inoculadas se identificaron a una concentración elevada, superior a  $10^7$  ufc/g en el producto final. Aunque no se detectaron diferencias significativas en la aceptación global de los lotes embutidos elaborados, algunos atributos

sensoriales, como color y textura, fueron mejor valorados en el caso del lote inoculado con la cepa *P. acidilactici* S979, siendo esta cepa seleccionada para su utilización como potencial probiótico en este tipo de productos.

## Prevalencia de virus entéricos en moluscos cultivados en Galicia. Estudio de la fiabilidad de microorganismos indicadores de contaminación viral

Maria Luz Vilariño Becerra

Director: Jesús López Romalde.

Dept. Microbiología y Parasitología.

CIBUS-Fac. Biología. Univ. Santiago de Compostela.

En el medio acuático, se puede encontrar una gran variedad de especies de virus infecciosos para el ser humano, denominados “virus entéricos” y que se transmiten vía fecal-oral. Por ello, los moluscos obtenidos de zonas polucionadas, pueden estar contaminados con virus entéricos, constituyendo un riesgo potencial para la salud del consumidor.

La detección de virus entéricos a partir de tejidos de moluscos implica la concentración viral y la amplificación del ácido nucleico mediante RT-PCR, siendo necesaria la elección de métodos que presenten alta especificidad y sensibilidad. Los resultados obtenidos con los kits de RT-PCR evaluados en este estudio mostraron diferencias en la amplificación del RNA de HAV. La mayor sensibilidad (0,2-1 ufp/ $\mu$ L) se obtuvo con el kit Superscript™ One-Step RT-PCR System. Con respecto a los kits comerciales de extracción de RNA, los resultados mostraron que el kit Total Quick RNA Cells & Tissues (Talent) presentó mejores eficacias que el protocolo habitual usado de rutina en el laboratorio, con un límite de detección de 0,1-1 ufp/mg de tejido digestivo de mejillón.

La adecuada selección de los cebadores es otro de los pasos más importantes para lograr una sensibilidad y la especificidad adecuadas. De las parejas de cebadores evaluadas para la detección de virus de hepatitis A (HAV), la pareja con mayor sensibilidad fue HAV240/HAV68 (0,02-0,1 ufp/g de hepatopáncreas). y en la detección de Astrovirus (AsV), la mejor sensibilidad se encontró con la pareja de cebadores A1/A2 (0,1-1 ufp/g de hepatopáncreas).

La Unión Europea, establece controles para los moluscos y sus áreas de producción basados en indicadores bacterianos de contaminación fecal, específicamente *E. coli*. Sin embargo, muchos estudios demuestran que muestras que cumplen los criterios establecidos pueden no estar libres de virus. Se realizó un estudio de la contaminación viral en diversas especies de moluscos bivalvos, tanto cultivados como silvestres durante un período de 3 años mediante técnicas convencionales de RT-PCR y RT-PCR a tiempo real (rRT-PCR). Con el fin de establecer la validez de los indicadores, se determinaron las cantidades

de *E. coli* y bacteriófagos RNA F+ presentes en las muestras.

Se observó una mayor contaminación en las muestras silvestres (57,6%) que en las cultivadas (54,4%), detectándose coexistencia de diferentes virus en una misma muestra. El virus que se detectó en un mayor número de estas muestras fue HAV, seguido por el genogrupo II de Norovirus (NoV), nterovirus, AsV, NoV GI y Rotavirus. No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los recuentos de indicadores con la presencia viral en las muestras.

Por otro lado, en estudios de distintos tipos de depuración comercial, se demostró la pobre eliminación viral, encontrándose los mismos porcentajes de detección de HAV y NoV antes y después de la depuración (7,6% y 1,5% respectivamente). Los resultados de los bacteriófagos RNA F+ mostraron, no sólo la pobre eliminación de este posible indicador viral durante el proceso depurativo, sino una ausencia de correlación con la presencia de virus entéricos.

Por último, se realizó un estudio de detección de virus entéricos en muestras de moluscos importados desde áreas geográficas en desarrollo, detectándose alguno de los virus analizados en un porcentaje elevado (51,6%) de las muestras. El virus con mayor prevalencia fue NoV GI (32,3%), seguido de AsV (22,6%), NoV GII (9,7%) y HAV (6,4%).

Los resultados de este estudio indican la necesidad de una metodología específica y estandarizada para la detección de virus, así como de estudios sistemáticos de moluscos y sus áreas de producción, con el fin de evaluar la magnitud real de la contaminación viral en el medio y su relación con la epidemiología de las enfermedades entéricas de origen viral.

## Estudios moleculares del sistema regulador de la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Gonzalo Durante Rodríguez

Directores: Eduardo Díaz Fernández y Manuel Carmona Pérez.

Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC.

Después de los carbohidratos, los compuestos orgánicos más extendidos en la naturaleza son los aromáticos. Los microorganismos juegan un papel crucial en la degradación de estos compuestos mediante dos estrategias principales dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno. Para incrementar conocimientos acerca del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, del cual se tienen menos datos que del aeróbico, se han estudiado los componentes responsables de la regulación del catabolismo anaeróbico del benzoato en la b-proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB. Este sistema consta del operón *bzdNOPQMS-TUVWXYZA* y del gen *bzdR* que codifican las enzimas implicadas en la degradación anaeróbica del

benzoato y el represor transcripcional BzdR, respectivamente, controlados a su vez por los promotores  $P_N$  y  $P_R$ , respectivamente.

Para ello, se analizó la regulación dependiente de oxígeno del cluster *bzd*, identificándose un nuevo regulador, denominado AcpR, en *Azoarcus* sp. CIB, que es miembro de la familia Fnr, cuyo papel es activar el promotor  $P_N$  en ausencia de oxígeno. Además, se caracterizó la expresión del promotor  $P_R$  que controla la expresión del gen *bzdR*, el cual controla su propia expresión mediante un sistema de *feedback* negativo.

Por otro lado, los estudios llevados a cabo con la proteína BzdR demostraron que posee una arquitectura modular constituida por dos dominios funcionales, el que se une al ADN en el extremo N-terminal y el que reconoce el inductor benzoil-CoA en el extremo C-terminal, conectados ambos por una región *linker*, los cuales demostraron ser capaces de mantener sus respectivas funciones tras ser purificados de forma independiente. También se determinó que el *linker* está implicado en la transmisión de información desde el dominio C-terminal, que sufre un cambio de conformación al unir el benzoil-CoA, al dominio N-terminal, que detecta dicho cambio conformacional y permite la expresión del promotor  $P_N$ .

De forma paralela, se exploró la posibilidad de construir quimeras artificiales con nuevas funciones reguladoras. El dominio N-terminal fue fusionado a la enzima siquimato quinasa I de *E. coli*, generando una proteína bifuncional con actividad enzimática y reguladora de la expresión del promotor  $P_N$ . El dominio C-terminal fue fusionado al dominio de unión a ADN del represor CI del fago I, obteniéndose un regulador capaz de controlar el ciclo lítico del fago dependiendo de la concentración de benzoil-CoA intracelular.

Los datos acerca de la caracterización bioquímica, así como la plasticidad de sus dominios funcionales han permitido la elaboración de un modelo sobre el origen evolutivo de la proteína BzdR.

Por último, se caracterizaron las tres regiones operadoras del promotor  $P_N$ , I, II y III, que reconoce la proteína BzdR, demostrándose que la unión del represor es cooperativa en forma de 4 dímeros, y que la región I es suficiente para que la regulación ejercida por BzdR tenga lugar.

## Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*

Miguel Balado Dacosta

Directores: Manuel L. Lemos Ramos y Carlos Rodríguez Osorio.

Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela.

En *Vibrio anguillarum*, el principal agente etiológico de la vibriosis en peces marinos, se han descrito dos sistemas de asimilación de hierro mediante sideróforos que desempeñan un papel importante en el proceso infeccioso. Uno de ellos,

presente en gran parte de las cepas del serotipo 01, está codificado por plásmidos del tipo pJM1, mientras que el otro está codificado por genes cromosómicos y se ha descrito de forma preliminar en cepas de los serotipos O1 y O2 carentes de plásmidos. En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de este nuevo sistema. Se describe una región cromosómica que contiene 13 genes (denominados genes *vab*) que codifica la síntesis de un nuevo sideróforo de tipo catecol, la vanrobactina. Mediante la construcción de mutantes por delección de cada uno de estos genes, y su correspondiente complementación con el alelo salvaje, hemos demostrado que esta región cromosómica codifica la síntesis, regulación, transporte y utilización de la vanrobactina en la cepa RV22 del serotipo O2. El gen *vabG* codifica una DHP sintetasa que proporciona el aumento de corimato necesario para que *vabABC* catalicen su conversión en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA), que es el grupo funcional de los sideróforos de tipo catecol. El gen *vabD* codifica la fosfopanteteinil transferasa que activa las péptido-sintetasas no ribosómicas codificadas por *vabE* y *vabF*. Éstas ensamblan finalmente la vanrobactina a partir de DHBA, arginina y serina. La naturaleza química del sideróforo ha sido confirmada mediante su aislamiento, purificación y análisis estructural, y se corresponde con la N-[N'-(2,3-dihidroxibenzoil)-D-arginil]-L-serina. El gen *vabS* codifica un posible exportador de membrana que participa en el proceso de secreción y *vabH* codifica una posible esterasa del ferri-sideróforo necesaria para la utilización del hierro captado con este sistema. El cluster *vab* codifica también dos receptores de membrana externa dependientes de TonB: FvtA, que interviene en el transporte del complejo hierro vanrobactina, y ORF13, que parece no expresarse. La expresión de los genes *vab*, que se organiza en 6 unidades transcripcionales, es dependiente de la concentración de hierro, siendo el represor global Fur el principal regulador. Sin embargo, la regulación es un proceso complejo en el que la proteína VabR es necesaria para que la expresión de *vabG* alcance niveles máximos, siendo éste el único gen del sistema fuertemente reprimido por hierro sin la intervención de Fur. Además, se ha detectado la existencia de un mecanismo, dependiente de ferri-vanrobactina, que activa la expresión del receptor FvtA. El análisis de la presencia de los genes de este sistema en una colección de cepas de *V. anguillarum* representativa de los diferentes serotipos, mostró que todas las cepas poseen los genes de síntesis y transporte de vanrobactina, lo que sugiere que éste es el sistema de sideróforos ancestral en *V. anguillarum* y que el sistema codificado en el plásmido pJM1 es evolutivamente más reciente. Por último hemos demostrado que *V. anguillarum* puede utilizar, por medio del receptor FvtA, análogos sintéticos de vanrobactina como fuentes de hierro. Este hecho, junto con la expresión demostrada de *fvtA* en una colección de cepas de los principales serotipos patógenos, abre la posibilidad de explotar este sistema de transporte de hierro para el diseño de nuevos agentes antimicrobianos contra la vibriosis, basados en sideróforos conjugados con antibacterianos, que puedan utilizar la misma vía de entrada en la célula que el sideróforo nativo.

# La taxonomía del siglo XXI

**Ramón Rosselló Móra**

Grup de Microbiologia Marina.  
 Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (CSIC-UIB).  
 C/Miquel Marqués, 21. 07190 Esporles. Illes Balears.  
[rossello-mora@uib.es](mailto:rossello-mora@uib.es)

**H**ace una década nos estábamos preguntando cuántos pelos debíamos tener en la cabeza. La cuestión, sin embargo, prevalece no sólo porque nadie los ha contado, sino también porque el paso del tiempo provoca una caída inevitable que desanima a cuantificarlos. Dicen por ahí que tenemos entre 100.000 y 150.000, pero, claro, todo depende de cómo lo definamos. Los números pueden variar si cabello, vello, cejas, pestañas, barba... los consideramos sinónimos o no. Y es que la sinonimia y la homonimia (misma palabra con distintos significados) son aspectos que dan muchos dolores de cabeza a los científicos, que creen hablar de lo mismo cuando no lo hacen.

Sin embargo, otra cuestión que nos planteamos hace una década sobre qué es una especie en procariontes y qué parámetros son los que permiten su circunscripción, al no afectarnos directamente los ánimos, sí que se presta a revisión. En una década han ocurrido numerosos cambios en el ámbito de la taxonomía de procariontes. Han aparecido nuevas metodologías de análisis, así como nos hemos visto inmersos en la vorágine de la secuenciación de genomas. Como os podéis imaginar, todo ello sirve para especular y para discutir. En el fondo se están haciendo avances importantes en el campo de la clasificación basados en las nuevas tecnologías. Sin embargo, también está ocurriendo una explosión de información que genera mucho ruido de fondo y que impide un avance ordenado. Intentaremos desglosar de dónde venimos y a dónde vamos.

## MONISMO, EL "ONE FOR ALL" DE LOS BIÓLOGOS Y UN POCO DE HISTORIA SOBRE TAXONOMÍA

**E**l origen de las especies no hay que buscarlo entre los papeles de Darwin escritos hace aproximadamente dos siglos, sino que hay que remontarse mucho más atrás. El tér-

mino de especie, y por tanto la idea de lo que debe ser (concepto) se remonta a más de 2.400 años cuando Aristóteles formula por primera vez la existencia de las dos primeras categorías que conformarían el esquema taxonómico de los seres vivos. Aristóteles explica que los organismos están organizados en dos categorías, Especie y Género, ambas observadas desde un punto de vista esencialista, o sea, creadas por un determinado Dios. El abandono de los dogmas esencialistas se observa ya en la primera taxonomía seria que construyó el sueco Lineo, aproximadamente hace tres siglos. Este botánico amplió el número de categorías a cinco agrupando Especies y Géneros en Órdenes, Clases y Reinos. Durante doscientos años, éstas fueron los cajones taxonómicos en donde se iban clasificando los nuevos organismos que se describían. La botánica y la entomología fueron ramas del conocimiento de especial actividad, y las descripciones de nuevos taxones crecieron de forma exponencial, especialmente debido a la actividad de biólogos altruistas decimonónicos. El problema que surge del incremento de descripciones de especies, y por lo tanto de categorías superiores, es que con más frecuencia las unidades que se observan no se acomodan a las categorías prefijadas. La diversidad biológica no se podía explicar mediante el uso de sólo cinco estamentos jerárquicos. Debido a ello, hace aproximadamente medio siglo, los zoólogos Mayr y Simpson amplían la jerarquía en catorce categorías más, por tanto el esquema taxonómico de los seres vivos se estructura en diecinueve categorías. En fin, que tan sólo desde el punto de vista de animales y plantas, organismos mal llamados superiores, la clasificación de la diversidad biológica parece no ser un problema trivial.

Mayr y Simpson, con su multiplicación de las categorías, aparentemente solventaron el primer problema generado por la masiva descripción de especies. Éstas se realizaban generalmente desde un punto de vista morfológico (morfoespecies o taxoespecies), atribuyendo poder de discrimi-

nación a las diferencias en características observables. Sin embargo, los científicos creen que la teoría de la existencia de las especies no puede basarse en aspectos puramente morfológicos, sino que debe estar basada en fundamentos más funcionales. Por ello se formula el concepto biológico de especie (BSC), que está basado en la capacidad de reproducción con descendencia fértil. Éste, que ha sido uno de los conceptos más defendidos entre los taxónomos de animales y plantas, resulta inviable debido al número de excepciones observadas y que incluso ocurren entre animales. El BSC ha sido reformulado varias veces con tal de poder disponer de un concepto operativo. Sin embargo, pocas son las taxonomías que se muestran satisfechas con esta formulación.

En realidad, existe un tremendo guirigay entre taxónomos y filósofos que discuten el cómo es la unidad que se puede tomar como básica en un esquema taxonómico global. Tal y como mencioné, entonces ya se contabilizaban con aproximadamente 22 conceptos distintos, y muy probablemente este número ha crecido. Sin embargo, no hay manera de llegar a un consenso sobre cuál aplicar, o qué es realmente una especie. Cada uno de los conceptos es legítimo, ya que distintas taxonomías observan su diversidad biológica mediante distintos métodos y sistemas. Los biólogos pretenden usar un único sistema taxonómico, basado en una sola jerarquía, para describir la diversidad de todos los seres vivos. Además, se requiere que la unidad básica, especie, sea comparable entre todas las taxonomías. Esta línea de pensamiento de una unidad y un sistema para todos es lo que se llama monismo. De forma contrapuesta, otra línea de pensamiento sería la pluralística, y básicamente formula que se permita el que existan tantas taxonomías como sean necesarias, una clasificación para cada tipo de organismos. Lógicamente los biólogos tienen sus reparos en desistir de ser monistas. Desde mi punto de vista, el monismo tiene dos inconvenientes a destacar si se quiere obtener un sistema de clasificación que refleje las relaciones de parentesco entre todos los seres vivos. El primero es puramente mecánico y deriva del cómo se analiza la diversidad biológica. Por ejemplo, mientras en artrópodos la clasificación es puramente morfológica, frecuentemente basada en especímenes muertos, en otro tipo de animales se recurre a los impedimentos morfológicos, fisiológicos (especiación simpátrida), o geográficos (especiación alopátrida) para efectuar la reproducción. Más dramático es todavía el caso de microorganismos, en especial procariotas, en los que ninguno de estos aspectos se puede usar como parámetro para discriminar patrones de recurrencia naturales. De hecho, el cómo los investigadores observan e identifican sus unidades ya difiere enormemente entre distintos tipos de organismos. El segundo inconveniente es más bien inherente a la naturaleza de los seres vivos. El desarrollo de la evolución, y por tanto, las modificaciones a nivel genotípico y fenotípico dependen de las costumbres de cada tipo biológico. Parámetros intrínsecos como el tiempo de generación, tipo de reproducción,

eficiencia en la gestación y procreación, sistemas de detoxificación, de reparación de DNA, etc..., o del entorno como tipo de hábitat, disponibilidad de recursos, amenazas a su supervivencia, etc..., deben ser determinantes en cómo evoluciona un determinado tipo biológico. En consecuencia, las limitaciones en la evolución van a ser diferentes para cada tipo de ser vivo. Entonces, o bien admitimos que las unidades universales son necesariamente artificiales, y por ello podemos usar una misma vara de medir, o bien se aplica una unidad acomodada a cada tipo biológico, y entonces la circunscripción es más natural. Ambos casos nos permiten comparaciones, sólo hay que admitir la inevitable artificialidad de la primera.

De hecho, y ligando estos aspectos filosóficos con la discusión en el primer párrafo de este manuscrito, el término de especie adolece de "homonimia". O sea, que el mismo término se usa para explicar unidades biológicas esencialmente distintas. Distintos científicos usan el término de especie para explicar las unidades que ellos consideran se merecen tal clasificación. En el fondo, es un pluralismo (en contraposición a monismo) encubierto y no aceptado, pero ampliamente ejercido.

## ESPECIES EN MICROBIOLOGÍA, CÓMO LAS CLASIFICAMOS

Tal y como ya mencioné, en el siglo pasado los microbiólogos tampoco estamos exentos de las discusiones sobre cómo se concibe la idea de especie. A pesar de querer ser monistas, y querer comparar nuestra unidad con la de las distintas taxonomías de eucariotas, la verdad es que las especies de procariotas pueden compararse poco, no en el concepto, sino en la manera de circunscribirlas. En microbiología se concibe especie como aquel grupo monofilético de organismos que muestran suficiente grado de coherencia genómica y fenotípica como para identificarse de forma aislada de sus semejantes. Nadie podrá decir que este concepto no sea universalmente aplicable. El problema, es cómo las definimos, o sea, como se enmarca una especie. Para empezar, necesitamos tener los organismos que se van a describir en cultivo puro, esta es la primera de las dificultades que encontramos para clasificar. Pero luego, se debe obtener la mayor cantidad de información tanto genética como fenotípica que nos muestre que éstos merecen ser clasificados independientemente.

La taxonomía, y en especial la de procariotas, demanda que el sistema que se genere sea operativo y predictivo. Eso significa que no se puede construir una clasificación que impida el avance de alguna de las disciplinas tan dispares como la medicina y la ecología. Sin embargo, ambas tienen unos requerimientos completamente distintos frente a la taxonomía. Por ello, se recurre al pragmatismo a la hora de clasificar microorganismos, para que el sistema sea operativo para todas las disciplinas que hagan uso de la clasificación. Además, el segundo requisito importante de un sistema

taxonómico es el que sea predictivo. O sea, que al identificar un aislado como miembro de un taxón existente, seamos capaces de predecir un buen número de aspectos tanto genéticos, fisiológicos o ecológicos de éste. Si el producto final no es útil, o genera una información que no es fiable, entonces no merece la pena.

El éxito de un buen sistema de clasificación de procariotas requiere de un exhaustivo estudio de los organismos que configurarían las distintas categorías. Es por ello que se demanda la obtención de la mayor cantidad de información posible sobre el taxón a clasificar. Hay tres aspectos básicos a tener en cuenta si se pretende dar nombre a una unidad:

i. **El número de aislados.** La clasificación de una nueva especie debería estar basada en un buen número de aislados. La descripción de la diversidad intraespecífica nos informa sobre qué aspectos pueden ser relevantes para el taxón, y cuáles son probablemente accesorios. Es muy importante disponer de la mayor cantidad de información que nos indique qué comparte un grupo de microorganismos que hace que los consideremos como una misma unidad. También lo es detectar aquellos caracteres accesorios que hacen que comprendamos la riqueza genética y fisiológica del grupo en estudio. Dependiendo del tipo de organismos (e.g. aerobios/anaerobios, copiotrofos/oligotrofos, versátiles/fastidiosos, de crecimiento lento/rápido), podemos encontrarnos con mayores o menores dificultades en la obtención de cultivos puros. Pero el esfuerzo de aislar varios organismos del mismo taxón confiere un enorme valor añadido al trabajo. Es difícil poder recomendar un número mínimo de organismos que deberían ser estudiados. Sin embargo, está claro que cuantos más estudiemos mejor va a ser la caracterización.

ii. **Los métodos utilizados.** Hay que estudiar el grupo de microorganismos aplicando el espectro más amplio posible de métodos. (a) El potencial genético del organismo así como la posibilidad de entender las relaciones genealógicas y evolutivas del grupo, debería ser estudiado de forma exhaustiva. Los parámetros clásicos como la secuencia del gen codificante para el RNAr 16S, el contenido GC y la hibridación DNA-DNA (DDH) son informaciones que deberían encontrarse en todo trabajo taxonómico. Hoy en día, es absolutamente necesario haber analizado la secuencia del gen que codifica para el RNAr 16S si se quiere publicar un nuevo taxón. Ésta nos informa no sólo de las relaciones genealógicas del nuevo grupo con sus semejantes, sino que permite la búsqueda de secuencias signatura que se usarían en la identificación de miembros de la especie mediante métodos moleculares. Si bien el contenido GC sólo se requiere para la descripción de nuevos géneros, es un parámetro que puede ser de mucha utilidad a la hora de confirmar la asignación de una especie a una jerarquía mayor. Finalmente el DDH no es un requerimiento si la secuencia del RNAr 16S difiere más de un 3% con los taxones más cercanos. Sin embargo, el uso de esta técnica es fundamental para enten-

**Ramón Rosselló-Móra** es Investigador Científico del CSIC y lidera el grupo de Microbiología Marina en el Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (CSIC-UIB). El grupo está especializado en el estudio de microorganismos tanto marinos como halófilos extremos que habitan en ambientes costeros. La actividad científica combina el cultivo de organismos, en especial anaerobios, con la aplicación de técnicas moleculares al estudio de los ecosistemas donde éstos habitan, así como estudios genómicos y metabolómicos de los aislados. Además, el grupo ha desarrollado una importante tarea en la construcción de bases teóricas en la clasificación de procariotas. RRM es editor ejecutivo de la revista *Systematic and Applied Microbiology*. Además, es miembro de la Judicial Commission of the International Committee for Systematics of Prokaryotes (JC-ICSP), así como del Ad Hoc Committee for the Evaluation of the Species Definition of Prokaryotes.



der que todos los aislados realmente pertenecen a un mismo taxón. Además de estas técnicas clásicas, se han desarrollado nuevos parámetros moleculares que permiten entender la coherencia filogenética y genotípica entre microorganismos. Métodos tales como el RAPD, AFLP, PFGE... nos pueden ayudar a entender si existen variantes clonales en el grupo de estudio. Además, se están desarrollando nuevas aproximaciones metodológicas que están llamadas a sustituir el DDH. Las más importantes son el cálculo del "Average Nucleotide Identity" entre genomas (ANI), o el uso de la metodología "Multilocus Sequence Analysis" (MLSA), pero ambas las explicaremos más exhaustivamente en el último apartado debido a la relevancia que están adquiriendo en Taxonomía.

(b) El fenotipo, que es la expresión del genotipo, debe ser también exhaustivamente estudiado. Sobretodo porque nos informa sobre aspectos funcionales de los organismos que pueden ser relevantes tanto en medicina, como en ecología u otras disciplinas microbiológicas. En general, se estudian aspectos metabólicos de los organismos mediante el uso de pruebas bioquímicas. Se está poniendo de moda el uso de sistemas miniaturizados comerciales (API, Biolog) para analizar el metabolismo de los nuevos organismos. Sin embargo, estos sistemas pueden no siempre funcionar adecuadamente ya que algunos requerimientos (e.g. salinidad, pH, vitaminas, elementos traza, presión parcial de oxígeno...) pueden no estar garantizados en el propio sistema. Ello conlleva a una observación errónea de la expresión del genotipo de los organismos en estudio. Es bueno usarlos, pero con conocimiento de causa. Sin embargo, existe una miríada de pruebas metabólicas que uno puede preparar en su propio

laboratorio (e.g. rangos de tolerancia a sal, temperatura, pH,..., o determinadas actividades enzimáticas,...). No exime de culpa el no hacerlo si es puramente un problema de desidia. Finalmente, se deben estudiar los aspectos quimiota-xonómicos de una manera también exhaustiva. Datos como perfiles de ácidos grasos, de poliaminas, de quinonas respi-ratorias, de lípidos polares, sideróforos, ... pueden dar infor-mación muy relevante y necesaria. Por ejemplo, el tipo de pared celular en grampositivos es un buen parámetro iden-tificativo de determinados grupos. En general, es muy útil recurrir a la quimiota-xonomía para poder encontrar aspectos fisiológicos que puedan ser útiles para identificar el taxón en estudio. Suelen no fallar.

iii. **Incluir cepas de referencia.** El tercer aspecto de gran importancia es que se deben estudiar los nuevos aislados juntamente con cepas de referencia. Es frecuente encontrar en la literatura nuevas clasificaciones que han establecido sus tablas de diagnóstico utilizando información publicada. Sin embargo, las pruebas bioquímicas pueden variar de labora-torio en laboratorio, y es absolutamente necesario que las cepas de referencia se estudien simultáneamente con las cepas problema. De hecho, hay que manejar *personalmente* las cepas tipo de cada especie que se quiera comparar. Éstas son las cepas de referencia con las cuales se describió origi-nalmente la especie. En las nuevas clasificaciones es impor-tante reportar las diferencias observadas con la literatura, y así enmendar la descripción original. En la propia descrip-ción se deberá denominar una cepa como la de referencia del grupo (cepa tipo de la nueva especie) que se depositará en dos colecciones de cultivo internacionales con tal de hacerla disponible a la comunidad científica.

## DESCRIPCIONES DE UNA SOLA CEPA (EL “TODO A CIEN” DE LA TAXONOMÍA)

¡A y, si Samuel T. Cowan levantara la cabeza! Este inves-tigador, probablemente uno de los más influyentes en el siglo pasado, no daría crédito al ver cómo la taxonomía se ha convertido en un ejercicio en obtener publicaciones de “low cost”. Y es que una de las prácticas más importantes que podemos observar en las últimas décadas es la clasifi-cación de nuevos taxones basados simplemente en una sola cepa. Por ejemplo, y sólo analizando lo ocurrido durante el año 2008, de las 482 clasificaciones nuevas aparecidas en el IJSEM, el 80% sólo cuenta con una cepa, la cepa tipo. La abundancia de estas descripciones está provocando opinio-nes contrapuestas. Por un lado, es necesario describir toda la diversidad microbiana que se encuentra en la biosfera. Toda novedad debe ser reportada, y si tenemos en cuenta que en estos momentos sólo se han descrito unas 8.000 especies de procariotas (frente a más de 1.000.000 de insectos), estamos muy lejos de poder tener una idea clara de la verdadera diversidad existente que se hipotetiza de órdenes de magnitud superiores. Sin embargo, la práctica actual es que si se obtiene en cultivo puro un organismo que puede

representar una nueva especie, éste se convierte en el único material con el que se basan las descripciones, y pocos son los esfuerzos en obtener nuevos aislados semejantes. En principio no debería tratarse de un problema si no fuera por que el esfuerzo en la clasificación es en general muy parco. Muy pocas son las descripciones que cuentan con un amplio abanico de características que explican cómo es el organis-mo. La mayoría de descripciones están basadas en la secuenciación del gen codificante para el RNAr 16S, algunos caracte-res fenotípicos diferenciadores (generalmente basados en sistemas comerciales), y en algunos casos perfiles de áci-dos grasos. En pocas ocasiones se observa el estudio por DDH y la descripción de otros caracteres quimiota-xonómicos importantes. Además, en la mayoría de los casos el trabajo de laboratorio está limitado al uso del nuevo aislado ya que las características de los taxones más cercanos están toma-das de la literatura. En general cabe pensar que la calidad de las descripciones es tan baja que no garantiza la identi-ficación de nuevos miembros de la misma especie. Con una sola cepa no se puede describir la diversidad del taxon, ni tampoco poder entender qué caracteres son realmente rele-vantes para su caracterización. En este aspecto, el “Internati-onal Committee for Systematics of Prokaryotes” ha expre-sado su preocupación, y por ejemplo no se van a validar nuevas especies si no se demuestra que la caracterización en el laboratorio se ha realizado en paralelo con las cepas de referencia. En los últimos años, la tolerancia en la clasifi-cación de nuevas especies ha llevado a que con un bajo coste y esfuerzo se puedan obtener publicaciones en revistas SCl. Si tenemos en cuenta que la mayoría de éstas se realizan en países con relativamente pocos recursos en investigación (casi el 70% de las descripciones se realizan en naciones del lejano oriente, especialmente China, India y Corea), parece ser que hubieran encontrado un filón para obtener publica-ciones de manera fácil. Sin embargo, pocos son los taxóno-mos occidentales que no cuentan con una publicación de este estilo. ¡El que esté libre de pecado, que tire la primera piedra!

Realmente estamos frente a un problema cuyas dimen-siones son difíciles de prever. Se están describiendo simple-mente aislados, sólo que se les da un nombre y un sitio en la clasificación. Parece más un catálogo de nuevos organis-mos que de nuevos taxones. Probablemente, una descrip-ción tan parca de un aislado, sin proponer una clasificación, difícilmente se aceptaría para su publicación a no ser que tuviera unas particularidades fisiológicas o genéticas tan extraordinarias que fuera de interés científico. Es de prever, sin embargo, que en un futuro esta actividad disminuya al imponer mayores trabas en la publicación, así como buenos taxónomos emprendan estudios serios sobre grupos de especies ya clasificadas y así comprender su verdadera estructura taxonómica. Las clasificaciones basadas en una sola cepa deben ser permitidas, claro está, pero sólo si se muestra que el trabajo de caracterización es exhaustivo y convincente.

## LA TAXONOMÍA DE LAS BASES DE DATOS O LA CLASIFICACIÓN DEL SIGLO VEINTIUNO

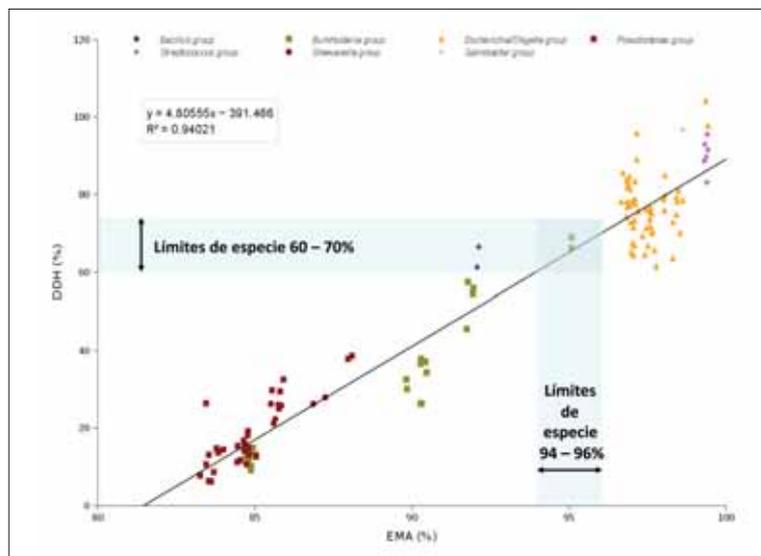
No todo es malo en la nueva era de la taxonomía. Si Samuel T. Cowan levantara la cabeza, también quedaría impresionado por las nuevas herramientas que se están desarrollando para poder catalogar la diversidad microbiana. En la última década han aparecido nuevos avances importantes en el estudio de los microorganismos. En general, los más exitosos están ligados al análisis del genoma o de determinantes genéticos. Estos esfuerzos llevan a que se generen bases de datos públicas que permiten estudios de forma independiente al cultivo en el laboratorio. Por lo que los estudios comparativos con nuevos aislados podrán hacerse sin tener que recurrir al material vivo.

Hay que aplaudir el que más del 90% de las especies descritas tengan su gen del rRNA 16S secuenciado. El actual esquema taxonómico está basado en los resultados de la reconstrucción de éste gen, así como las decisiones actuales sobre qué y cómo se conforman las categorías taxonómicas. Existen varias bases de datos donde poder encontrar las secuencias curadas de EMBL/GenBank como el “*Ribosomal Database Project*” (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu>); *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>); *SILVA* (<http://www.arb-silva.de>), etc... Sin embargo nosotros hemos generado una base de datos curada sólo con las cepas tipo de las especies existentes en lo que hemos llama-

mado el “*Living Tree Project*” (LTP, <http://www.arb-silva.de/projects/living-tree>). El LTP se actualiza de forma regular y ofrece las secuencias curadas y alineadas, una para cada cepa tipo de cada especie. Además, también presenta árboles en distintos formatos con la filogenia de las cepas tipo. Es una herramienta muy útil para identificar si uno está trabajando con una especie nueva o no.

Además, el desarrollo de la genómica está promoviendo que también se haga un esfuerzo importante en la obtención de la secuencia completa de los genomas de las cepas tipo. Si bien ahora sólo hay aproximadamente 150 cepas tipo secuenciadas, es de esperar que en un tiempo relativamente breve este número aumente al menos en un orden de magnitud. De hecho, la comunidad internacional está fomentando el que se de prioridad a la secuenciación completa de todas las cepas tipo. El disponer de secuencias permitirá dejar de lado métodos de análisis que se están quedando obsoletos. La determinación del contenido GC no va a ser analizado químicamente, sino sólo “in silico”. Además, la hibridación de ácidos nucleicos se podrá sustituir por métodos bioinformáticos de comparación de genomas. En este aspecto, han surgido varias propuestas como sustitutas de DDH. Vamos a destacar las dos más importantes.

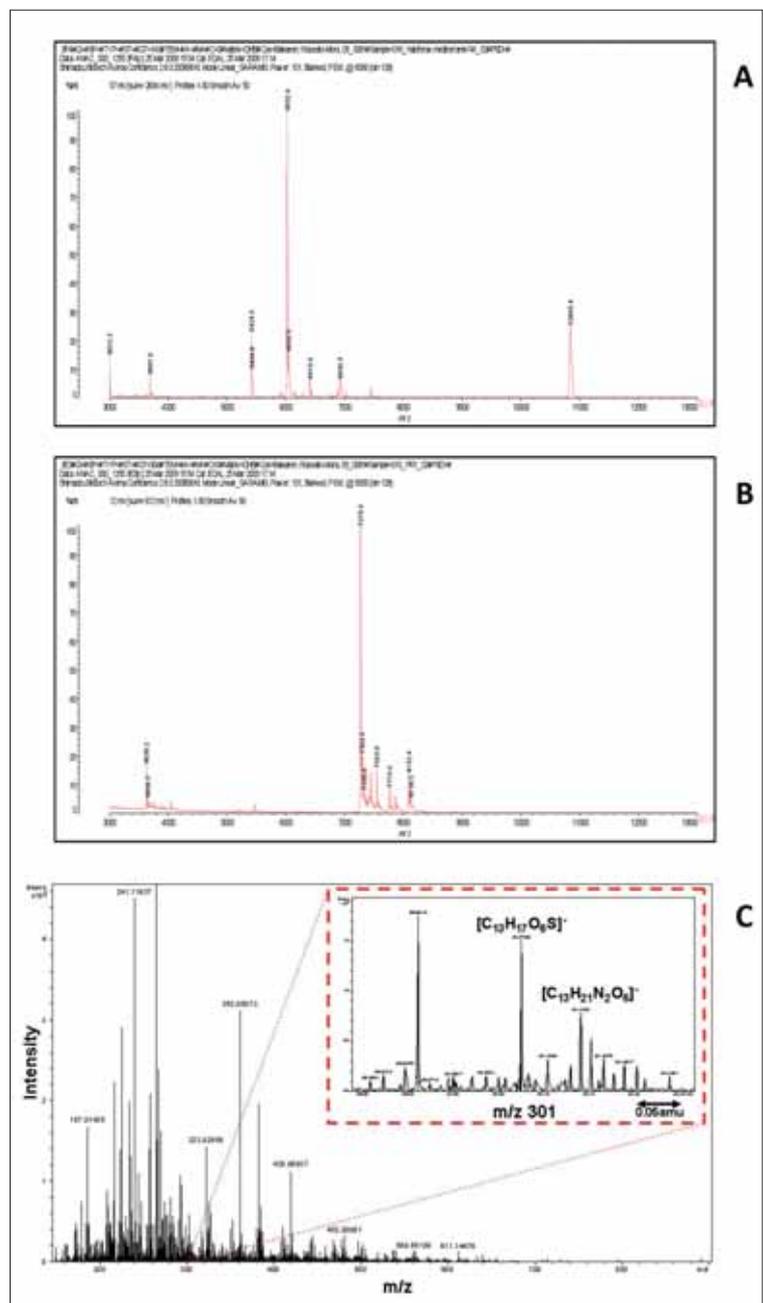
En primer lugar el “*Multilocus Sequence Analysis*” (MLSA), que consiste en secuenciar varios genes esenciales (de entre 5 y 10) en todos los organismos en estudio y mediante la concatenación de sus secuencias se puede resolver con mayor sensibilidad la estructura genealógica del taxón y sus semejantes, y decidir si estamos trabajando con una nueva especie o no. Entre los genes más usados contamos con *rpoB*, *rpoD*, *gyrB*, *dnaJ*, *atpA*, *pheS*,... pero existen hasta más de 30 genes de presencia casi universal. Esta metodología se ha puesto de moda en taxonomía, sin embargo, pocos son los investigadores que usan más de tres genes. Además, es fácil caer en sesgos. El mayor problema en efectuar MLSA es la selección de los genes. La decisión sobre qué genes se amplifican y secuencian está generalmente ligada a la facilidad en diseñar cebadores y a que la amplificación funcione y sea específica. En general nos vamos a encontrar con problemas tanto en el diseño de cebadores como en la amplificación de los genes, sobretodo si el genoma de algún representante cercano no está secuenciado. Sé de “bona fide” que, en muchas ocasiones, si los cebadores no amplifican o el amplicón no es específico, entonces se elimina el gen de la lista. Todo ello conlleva a que al final se cometa un sesgo hacia los genes seleccionados más conservados y por tanto pueden no reflejar la verdadera filogenia del organismo en cuestión. Parece, sin embargo, que en general las divergencias de más del 3% en identidad de nucleótidos (utilizando más de 5 genes) podría reflejar las especies microbianas tal y como las hemos definido genómicamente.



**Figura 1.** Correlación entre el porcentaje de similitud obtenido por hibridación (DDH) y el porcentaje medio de identidad de nucleótidos (ANI) entre genomas. El límite de especie generalmente se ha trazado entorno al 60-70% de similitud de DDH. Este rango de hibridación tiene su correspondencia en el entorno entre 94-96% de identidad ANI. En un futuro la secuenciación completa o parcial (al menos un 20% del genoma al azar) permitirá determinar el ANI y evitar el uso de la técnica DDH. Estos parámetros se pueden calcular con el programa JSpecies (<<http://www.imedeia.uib.es/jspecies>>)

Por otra parte, el análisis comparativo entre genomas no está sometido a sesgo en la selección ya que se analiza todo contra todo. La medida del “Average Nucleotide Identity” (ANI), que es la media en la identidad de nucleótidos entre genes ortólogos compartidos entre dos genomas (o bien entre fragmentos originados al azar), parece dar una muy buena resolución para circunscribir especies. De forma empírica parece que entre 95 - 96% de ANI podría reflejar el entorno de 60 - 70% de similitud por DDH (Figura 1). Este parámetro muy probablemente sustituya en un futuro próximo la circunscripción clásica basada en DDH. De forma análoga el “Average Amino acid Identity” (AAI), que es la media en la identidad de aminoácidos entre proteínas codificadas por genes ortólogos compartidos entre dos genomas, parece reflejar las relaciones filogenéticas entre categorías superiores a especie, y podría ser usado en un futuro para su circunscripción. Es de prever que los análisis genómicos se transformen en el sustrato para la configuración de un sistema taxonómico estable.

Finalmente, no se puede concebir una descripción de taxones solamente basándose en parámetros genéticos. Por ello la descripción del fenotipo es de suma importancia. Al igual que la genómica, es de prever que en un futuro se fomente la generación de información que permita estudios *in silico* independientes del cultivo y fundamentados en bases de datos. Aunque el campo está todavía por explorar de manera exhaustiva hay dos posibilidades que me gustaría mencionar. En primer lugar, los estudios de metabolómica basada en espectrometría de alta resolución (ICR-FT/MS) permiten observar la diversidad de metabolitos de bajo peso molecular (entre 50 – 1.000 D) correspondientes a un organismo (Figura 2). En general la presencia e intensidad de éstos puede estar ligada a las condiciones de cultivo, pero aún así se pueden identificar metabolitos que puedan ser característicos y discriminativos del taxón en cuestión, tal y como se observó con los sulfonolípidos en *Salinibacter ruber*. Por otra parte, la técnica espectrométrica de Maldi-ToF permite observar la diversidad de moléculas de alto peso molecular (2.000 – 20.000 D). Aparentemente, los perfiles que se observan son menos dependientes de las condiciones de cultivo, y en los extractos celulares crudos muchos de los picos observados se corresponden con proteínas ribosomales. En este aspecto se está experimentando en la identificación de aislados clínicos ya que se requiere muy poco material celular y poca experimentación. En ambos casos, se generan bases de datos fundamentadas en perfiles moleculares. Éstas permitirán la comparación entre múltiples organismos con independencia de tener en las manos el material vivo.



**Figura 2.** La espectrometría de masas permite estudios de la composición química de los organismos en estudio. Por ejemplo, los perfiles de extractos crudos de microorganismos por la técnica de Maldi-ToF (A, *Haloferax mediterranei*; B, *Salinibacter ruber*), nos muestran la presencia de moléculas de alto peso molecular de entre 2.000 y 20.000 D (en estos casos generalmente relacionadas con las proteínas ribosomales). Por otra parte, la técnica del ICR-FT/MS (C, perfil de *Salinibacter ruber*) permite determinar la presencia de masas moleculares pequeñas de entre 50 y 1.000 D, generalmente asociadas a metabolitos celulares directamente relacionados con el metabolismo celular. Ambos métodos generan perfiles que pueden ser usados en la identificación y comparación de aislados, y además, quedar recogidos en bancos de datos disponibles públicamente.

## EPÍLOGO

La taxonomía es útil, no sólo para los taxónomos sino para cualquier ámbito del conocimiento. Sin embargo, la utilidad depende de la operatividad y capacidad de predicción del sistema generado. En microbiología, y a pesar de críticas por parte de no taxónomos, hemos conseguido generar un sistema de clasificación basado en el estudio tanto del genotipo como del fenotipo, a diferencia de la mayor parte de taxonomías de eucariotas que todavía se basan en estudios morfológicos. Los parámetros necesarios están muy claros a pesar de que muchas descripciones sean demasiado parcas. Sin embargo, las nuevas metodologías que producen enormes bases de datos que pueden ser comparadas *in silico* construyen el futuro de la taxonomía. Es de prever que en un futuro próximo, con el abaratamiento de los métodos analíticos, la catalogación de taxones esté fundamentada en comparaciones por métodos bioinformáticos y que los tubos de ensayo de colores pasen al recuerdo romántico del trabajo en la poyata.

## BIBLIOGRAFÍA

- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL, Swings J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev. Microbiol.* **3**: 733-739.
- Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM. (2006). The bacterial species definition in the genomic era. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **361**: 1929-1940.
- Richter M, Rosselló-Móra R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **106**: 19126-16131.
- Rosselló-Móra R, Lucio M, Peña A, Brito-Echeverría J, López-López A, Valens-Vadell M, Frommberger M, Antón J, Schmitt-Kopplin P. (2008). Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinitabacter ruber*. *ISME J.* **2**:242-253.
- Rosselló-Móra R. (2005). Updating prokaryotic taxonomy. *J. Bacteriol.* **187**: 6255-6257.
- Rosselló-Móra R. (2006). DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In: Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes (Stackebrandt, ed). Springer Verlag, Heidelberg (Alemania). Pp 23 -50. ISBN: 3-540-23155-2.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rosselló-Móra R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward A, Whitman WB. (2002). Report of the Ad Hoc Committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1043-1047.
- Rosselló-Móra R & Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 39-67.

**Laboratorios MICROKIT**  
¡Pasión por la creatividad!

AENOR  
Ingeniero Registrado  
EK-46321999

CERTIFIED  
ISO 9001

COLICULT-MCC  
CRIOTECA®  
PLAQUIS®  
M-IDENT®

COSMETIKIT®  
CHROMOSALM  
KITPRO-5S  
SEILAGUA®

COMPACT-DRY-PLATES®  
DESINFECTEST®  
NUTRILINIA  
MUGPLUS CROMOKIT®

**Control de calidad microbiológico?  
Tras 20 años, la respuesta sigue siendo:  
MICROKIT®**

Somos pioneros en medios cromogénicos, medios de cultivo preparados y deshidratados, kits únicos, cepas cuantitativas y servicios intercomparativos, de asesoría y de protocolización, para control microbiológico industrial, ambiental (aguas, superficies y aire) y alimentario.

P.O. Box 44, 28210-Valdemorillo (Madrid, Spain) Tel.(34) 91 897 46 16 Fax.(34) 91 897 46 41  
E-mail: microkit@microkit.es www.microkit.es



## IX Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos

**Ramón Rosselló Móra**  
Grup de Microbiologia Marina.  
Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (CSIC-UIB).  
C/Miquel Marqués, 21. 07190 Esporles. Illes Balears.  
[rossello-mora@uib.es](mailto:rossello-mora@uib.es)

**D**urante los días 1 y 2 de octubre tuvo lugar la reunión anual de la Red Española de científicos que investigamos sobre la biología de organismos extremófilos. Ésta, que tuvo lugar en el Club Pollentia Resort del Puerto de Alcúdia en Mallorca, ha dado continuidad a las actividades que la Red lleva a cabo desde su constitución en 1995. El número de asistentes superó con creces los pronósticos iniciales en más de un 140%, y por ello nos congratulamos del importante éxito de convocatoria. Del total de 74 participantes, la mayoría (70%) fueron jóvenes investigadores, y a ellos los podemos considerar como los verdaderos protagonistas ya que se responsabilizaron de casi todas las ponencias presentadas. Además de las 31 comunicaciones realizadas por los miembros de la red, tuvimos la presencia de cuatro investigadores extranjeros que dieron las charlas plenarias. Contamos con Wolfgang Ludwig, de la Universidad Técnica de Munich; Mike Dyll-Smith, del instituto Max Planck de Bioquímica de Munich; Milton Da Costa, de la Universidad de Coimbra; y Gerard Muyzer, de la Universidad de Delft.

La investigación que se ha presentado durante la reunión se ha extendido entre la ecología y diversidad de microorganismos extremófilos, hasta su genética, biología molecular y aplicaciones biotecnológicas. Se han tratado temas fundamentales en la biología de microorganismos termófilos, acidófilos, halófilos y psicrófilos. Temas que han ido desde la clasificación taxonómica, la diversidad de hábitats que colonizan, hasta aspectos de genómica, metabolómica y aspectos funcionales de su genética y metabolismo. En general se fomentó que fue-

ran los estudiantes los que explicaran sus temas de investigación. Por ello se permitieron un total de 31 ponencias de aproximadamente 15 minutos. Un programa relativamente apretado, pero que permitió no sólo el que los estudiantes expresaran sus investigaciones, sino que también pudieran experimentar la realización de ponencias orales frente a un público especializado. Además de las charlas propias de los miembros de la red, los invitados internacionales pudieron explicar sus investigaciones en ponencias de 30 minutos. Éstas nos informaron sobre aspectos fundamentales de la reconstrucción genealógica molecular, como de aspectos genéticos y metabólicos de organismos termófilos y acidófilos. Además, se introdujeron nuevas informaciones sobre las poblaciones de virus (fagos) en ambientes halinos extremos.

En general hubo una muy buena acogida, y la sensación de que el nivel de la investigación en España es alto y pionero en el campo. Los dos días sirvieron para intercambiar conocimientos, así como para generar nuevos lazos de investigación compartida entre los miembros de la red. La reunión estuvo subvencionada con fondos de las acciones especiales BIO2008-04954-E del Ministerio de Educación y Ciencia, AAE006908-08 de la *Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació* del Govern de les Illes Balears, y MP-1776-EC del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Finalmente, cabe destacar las subvenciones de la red cubrieron todos los gastos de pernoctación y manutención de todos los participantes en la red.

## Darwin y la vida en condiciones extremas (lecciones de un naturalista)

Ricardo Amils

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC)  
y Centro de Astrobiología (INTA-CSIC)

A lo largo de los siglos XVIII y XIX se desarrollaron numerosas expediciones científicas, todas ellas con un notable interés por las ciencias naturales. Estas expediciones formaron a un notable número de naturalistas que hicieron grandes aportaciones a la ciencia de la época. En una de ellas, la del H.M.S. Beagle, participó muy activamente un joven recién graduado en teología llamado Charles Darwin.

A finales de 1831, Darwin a sus 22 años, embarcó en el Beagle gracias a las recomendaciones del profesor Henslow, con el fin de participar en una expedición científica alrededor del mundo. Darwin fue un notable observador y se sintió impresionado por la singularidad de los lugares explorados: la exuberancia de la selva, las huellas de la historia geológica, la inmensidad de la Patagonia, la monumentalidad de los Andes y la aridez del desierto peruano. Asimismo, realizó numerosas observaciones socio-culturales, todas ellas convenientemente descritas en sus notas de viaje y que tuvieron una gran influencia en su obra. La realidad social que había observado le permitió afirmar “... las variedades humanas parece que reaccionan sobre otras de la misma manera que las diferentes especies animales, destruyendo siempre el más fuerte al más débil...”, la esencia del mecanismo de selección natural que propuso posteriormente.

Una de las grandes pasiones de Darwin fue la geología. Fitz-Roy, el capitán del Beagle, le regaló al embarcar un ejemplar de los “Principios de Geología” de Charles Lyell, el cual fue su libro de cabecera durante el viaje. Su primera publicación científica se realizó después de observar los efectos causados por el terremoto que asoló el sur de Chile, que tuvo como consecuencia la elevación de la costa en unos cuantos metros. Este acontecimiento le permitió concluir que los fenómenos geológicos son hechos en constante desarrollo. Camino de los Andes pudo evidenciar que la geología del planeta era dinámica y que su evolución había sido lenta y gradual. Darwin demostró un talento inusual para extraer nociones generales a partir de la observación de hechos concretos, lo que le permitió relacionar la geología con la biología y comprender que la evolución era un proceso simple y observable.

Conocidas son las aportaciones de Darwin al estudio de la evolución biológica. Este año además de celebrar el bicentenario de su nacimiento, conmemoramos el 150 aniversario de la publicación de su obra más conocida “El origen de las especies”. Numerosas reuniones de especialistas han analizado en profundidad la influencia que las ideas de Darwin han tenido en distintos campos de la biología, en general, y de la biología evolutiva, en particular. Pero me ha parecido interesante ejemplarizar su capacidad sintetizadora y premonitora en un campo novedoso de la biología, la extremofilia, a partir de la exploración de los lagos salobres de Río Negro en Argentina.

Sus observaciones fueron convenientemente recogidas en su libro “The Voyage of the Beagle (1839)”, traducido al castellano con el curioso título de “Viaje de un naturalista alrededor del mundo”. En el capítulo IV, después de una descripción minuciosa de las características de la laguna salada en las distintas épocas del año, describe la recolección de la sal por los lugareños, el análisis de su composición y pureza por uno de los tripulantes del Beagle, y su extrañeza de que su calidad para la conservación de alimentos fuese menor que la de la sal obtenida por evaporación de agua de mar. Continúa describiendo las características de la laguna, de sus bordes fangosos malolientes, de los cristales de yeso y de sulfato de sodio que crecen en los mismos, y de las algas que forma parte de la espuma que el viento arrastra a la orilla. También aprecia el color rojizo de las aguas, el cual cree que se debe a la presencia de infusorios. Le sorprende la presencia de gusanos en los fangos, y se pregunta como podrán sobrevivir en la época en la que el agua se evapora y una gruesa capa de sal cubre la entera superficie de la laguna. Describe la presencia de flamencos en las salinas y subraya que los ha visto en todos los lagos salados visitados de la Patagonia, Chile y las Islas Galápagos, sugiriendo que los mismos se alimentan de los gusanos, que a su vez lo hacen de los infusorios o de las algas.

Todo ello le indica que efectivamente existe un mundo adaptado a las lagunas saladas de tierra adentro. La exis-

tencia de un crustáceo denominado *Cancer salinus* (hoy en día conocido con el nombre de *Artemia salina*) en lagunas salinas de lugares tan distantes como la Patagonia y Siberia le permite concluir: **“¡Puede afirmarse, sin lugar a dudas, que todas las partes del mundo son habitables! Ya sean lagos de agua salobre o lagos subterráneos escondidos debajo de montañas volcánicas, ya sean fuentes minerales de agua caliente, las vastas profundidades del océano, las regiones superiores de la atmósfera, o incluso la superficie de las nieves perpetuas: ¡Todas sustentan vida!”**

Partiendo de las observaciones realizadas en un ambiente extremo producto de la presión osmótica generada por la elevada concentración de sales (condiciones

tan inhóspitas para la vida que constituyen uno de los métodos más comunes de preservación de alimentos), Darwin intuyó que, dado suficiente tiempo, la vida era capaz de adaptarse a condiciones extremas muy distintas. De esta manera, se adelantaba a un área de conocimiento inexistente por inimaginable hasta hace poco más de treinta años. Es más, los estudios de algunos de estos ecosistemas se están iniciando en la actualidad, como la geomicrobiología del subsuelo o la microbiología atmosférica.

Los asistentes a la reunión anual de la red de Extremófilos (REDEX2009), que este año se ha celebrado en Alcadia, aceptaron la propuesta de considerar a Charles Darwin, por su capacidad premonitoria, pionero de la extremofilia.

## Nuevos socios de la SEM

Altas del 30/4/09 al 23/11/09

- Agulló Barceló, Míriam
- Alfaro Sánchez, Manuel
- Álvarez Muñoz, Laura
- Amjres, Hakima
- Arenas Carus, M<sup>a</sup> Rosa
- Bellido Díaz, Alberto
- Benítez Páez, Alfonso
- Benítez Rodas, Gilberto Antonio
- Böhme, Karola
- Botello Morte, Laura
- Boyero Corral, Laura
- Carrión Bravo, Víctor José
- Casanovas i Massana, Arnau
- Coll Fresno, Pedro Miguel
- Corral Villa, Paulina
- Díez Aldama, Lorena
- Durbán Vicente, Ana
- Esteban Torres, María del Mar
- Faulds, Craig Barry
- Fernández González, Ana Beatriz
- Fernández Moreira, Esteban
- Fernández No, Inmaculada C.
- Fernández Ortuño, Dolores
- Frigols Garrido, Belén
- Gago Prieto, Sara
- García Benzaquén, Nerea
- García Caballer, María
- García Martín, Ana Belén
- Giachetta, Rita Rossella
- Gómez López, Esther
- Gómez Vázquez, María
- Gondim Porto, Clarissa
- González Grau, Juan Miguel
- González Huerta, Patricia
- Gordillo Durán, Rubén
- Gosalbes Soler, María José
- Herrero de Dios, Carmen M<sup>a</sup>
- Iglesias Collar, Elsa
- Igual Wöllstein, Ana
- Imamovic, Lejla
- Jiménez Hernández, Nuria
- Jroundi, Fadwa
- Latorre Castillo, Amparo
- Liebana García, Raquel
- López Fernández, Margarita
- Martín Galiano, Antonio Javier
- Martínez i Rubio, Roser
- Martínez Quiles, Narcisa
- Matilla Vázquez, Miguel Angel
- Maya Zumeta, Naiara
- Medina Pérez, Noelia
- Meijer, Wilfried
- Meiler Rodríguez, M<sup>a</sup> Eugenia
- Méndez García, Celia
- Menéndez Gómez, M<sup>a</sup> del Carmen
- Mir Sanchos, Ignacio
- Murciano Camps, Celia
- Navais Barrando, Roberto
- Nieto Pelegrin, Elvira
- Oggerin de Orube, Monike
- Otero Álvarez, Verónica
- Pablos Lagartos, Jesús Luis
- Pérez Mendoza, Daniel
- Pérez Torrado, Roberto
- Pini Gutiérrez, Cecilia Vanesa
- Prieto Prieto, Antonio Daniel
- Purswani, Jessica
- Quiles Puchalt, Nuria
- Ribeiro Correia, Catarina Inés
- Rivas Fernández, Eva M<sup>a</sup>
- Rivas Marín, Elena
- Rodas García-Riaño, Elena
- Rodríguez Palenzuela, Pablo
- Rodríguez Rubio, Lorena
- Rubiano Saavedra, María Eugenia
- Ruiz de los Mozos Aliaga, Igor
- Ruvira Garrigues, M<sup>a</sup> Desamparados
- Sacristán Reviriego, Almudena
- Salvachúa Rodríguez, Davinia
- Sánchez del Rey, Verónica
- Sánchez Hernández, Fco. Javier
- Sánchez Moragas, Gloria
- Santamaría Hernando, Saray
- Sardiñas Díaz, Noelia
- Sotres Fernández, Ana
- Trias Mansilla, Rosalia
- Valencia Ruiz de Ojeda, Pablo
- Valverde Tercedor, Carmen
- Villanueva San Martín, Maite
- Wittich, Rolf-Michael Horst
- Yagüe Menéndez, Paula
- Zacchi, Lucia F.
- Zaragoza Hernández, Óscar
- Zorraquino Salvo, Violeta

La importancia de los centros de recursos microbianos y los retos a los que se enfrentan

## El caso de la CECT



**Esperanza Garay**  
Directora de la CECT.

Tras la primera reunión y las del TFBRC en París en 2000 y 2001, la OCDE publicó las principales conclusiones sobre la necesidad de crear los BRCs y las principales líneas de actuación (OECD, 2001: “*Biological Resource Centres: underpinning the future of Life Sciences and Biotechnology*”).

Los BRCs cumplen dos funciones esenciales en la bioeconomía basada en el conocimiento:

- Participan directamente en iniciativas científicas y, por tanto, generan nuevos conocimientos sobre la diversidad microbiana.
- Son mediadores científicos entre diferentes disciplinas y usuarios, poniendo a disposición de la sociedad los recursos microbianos que mantienen y la información sobre los mismos.

Las principales actividades que definen a un BRC según la OCDE, son las siguientes:

- Conservar la Biodiversidad.
- Realizar actividades de I+D sobre dichos recursos biológicos.
- Actuar como depositarios de recursos biológicos para la protección de la propiedad intelectual.
- Preservar y proveer recursos biológicos para actividades de I+D de carácter científico, industrial, agrícola, ambiental, médico, y sus aplicaciones.
- Contener la información y los recursos para hacerla llegar al público y para el desarrollo de líneas de actuación.
- Funcionar con criterios de calidad internacionales.

### LOS CENTROS DE RECURSOS BIOLÓGICOS (BIOLOGICAL RESOURCE CENTRES): INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La concepción tradicional de las colecciones de cultivos ha ido evolucionando a medida que se ha tomado conciencia del potencial que representan los diversos recursos biológicos (microorganismos vivos, células, genes y la información que contienen), que constituyen las materias primas para el avance de la investigación y el desarrollo en todo lo relacionado con las ciencias de la vida y sus múltiples aplicaciones (salud humana y animal, biotecnología, biorremediación, etc.). La revolución experimentada por las nuevas herramientas de la Biología Molecular en la segunda mitad del siglo pasado incrementó sustancialmente las posibilidades de caracterizar y utilizar dichos recursos para el beneficio de la humanidad.

En 1999 la OCDE reunió en Tokio a expertos de sus países miembros para estudiar y regular la recolección, el manejo/conservación, y la distribución de los recursos biológicos. Se reconoció la importancia de llevar a cabo un correcto manejo y control de dichos recursos en un momento de grandes avances biotecnológicos. En dicha reunión se definió a los BRCs como: “Una parte esencial de la infraestructura sobre la que descansan las Ciencias de la Vida y, muy particularmente, la Biotecnología”. Se definieron los diversos “dominios” dentro de los recursos biológicos, uno de los cuales comprende a los microorganismos. Se creó un grupo de trabajo, *Task Force on Biological Resource Centres* (TFBRC) cuya misión fue definir la naturaleza de la futura sostenibilidad de las colecciones de cultivos, así como los servicios a ellas asociados y sus obligaciones de proveer acceso a recursos biológicos de alta calidad.

### FINANCIACIÓN Y SOSTENIBILIDAD DE LOS BRCS

En el documento sobre BRCs de la OCDE (capítulo 3, página 23), ésta subraya la necesidad de contar con fuentes de financiación adecuadas y estables a largo plazo para asegurar la supervivencia, estabilidad y sostenibilidad de los BRCs, dado su papel crucial como conservadores y depositarios y suministradores de los recursos biológicos. Asimismo

estima el coste que supone para una colección la incorporación de un nuevo cultivo bacteriano, teniendo en cuenta todos los gastos derivados del control de calidad, validación, conservación a largo plazo y distribución.

Para poder hacer frente a tales gastos, **la OCDE menciona una serie de fuentes de financiación, que van desde la gubernamental (imprescindible)** a cualquier otra fuente, bien pública o bien privada, incluyendo entre los ingresos aquellos derivados de los propios servicios ofertados por la colección. Estos últimos jamás deberían ser la base principal de la financiación de un BRC porque lejos de darle más autonomía, lo hace más vulnerable. No hay que olvidar que una buena parte de los servicios de un BRC son gratuitos (p. ej. el depósito de cepas en régimen público) y que en los demás la tarifa aplicada no cubre habitualmente el gasto real del servicio, de hecho suele ser bastante inferior.

El problema de la financiación de los BRCs, de su importancia en el nuevo entorno socioeconómico y de los retos a los que se enfrentan ha sido puesto de manifiesto muy recientemente en el número de noviembre de la prestigiosa revista *Nature Reviews in Microbiology* (<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n11/pdf/nrmicro2246.pdf>).

En la actualidad hay 558 colecciones de cultivos microbianos registradas en el Directorio Mundial de Colecciones de Cultivos (WDCM), que reúnen un número aproximado de 1,5 millones de microorganismos. De ellas, 188 colecciones se encuentran en Europa y conservan entre todas más de 600.000 cepas. La inmensa mayoría están financiadas en su mayor parte por el gobierno o las universidades, y muy pocas por fondos privados o por la industria.

## SITUACIÓN DE LA CECT

**A** diferencia de la gran mayoría de colecciones públicas, **en el caso de España la CECT no recibe ninguna ayuda a nivel nacional**, a pesar de los repetidos intentos realizados por esta dirección y la anterior. La Universidad de Valencia contribuye en forma de espacios, servicios básicos y financia el sueldo de un técnico superior de plantilla (nuestra *curator* de hongos, Laura López). Ello representa un porcentaje que en los últimos seis años ha estado en torno al 12-20 % (promedio 15 %), aunque en 2007 concedió además una ayuda puntual importante para adquisición de infraestructura.

En la CECT, el mayor porcentaje de ingresos (alrededor del 55 %, promedio desde 2004) depende exclusivamente de los servicios que presta a la sociedad. Su situación es muy desfavorable en comparación con **otras colecciones europeas, que reciben del gobierno porcentajes siempre superiores al 50%** (DSMZ, CBS, etc.).

Finalmente, un 30 % lo suponen los ingresos obtenidos a través de proyectos y ayudas logrados en régimen de concurrencia competitiva y financiados por diferentes administraciones públicas (Unión Europea, Estado, Comunidad Autó-

noma y Universidad). Pese a tratarse de fondos públicos no se trata en ningún caso de subvenciones directas y por tanto no pueden considerarse una fuente estable de financiación. Más bien habría que considerarlos una parte más de los ingresos propios porque su obtención depende de un esfuerzo y un rendimiento del personal de la CECT tanto en investigación como en servicios.

Con el actual modelo de financiación de la CECT, en el que no hay aportación estatal y en el que la única aportación estable (la de la Universidad de Valencia) apenas ronda el 15 %, su situación es comprometida y podría perder no sólo las metas que tiene marcadas sino todos los logros y avances de los últimos diez años, incluyendo su mayor presencia internacional, el haber implantado un sistema de calidad, etc.

## ACUERDOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIALES (MTA) Y SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA CALIDAD (SGC) EN LOS BRCs

**T**radicionalmente, las colecciones de cultivos europeas han funcionado de forma bastante independiente en cuanto a las normas para el depósito y suministro de microorganismos. Sin embargo, el intercambio de cepas ha sido y es generalmente fluido y siempre ha habido buena comunicación entre ellas gracias a las reuniones anuales que organiza la Organización Europea de Colecciones de Cultivos (ECCO).

A lo largo del tiempo, los sistemas de funcionamiento de las colecciones han tenido que ir ajustándose a las diferentes normativas y acuerdos nacionales e internacionales que tienen influencia sobre los microorganismos, su uso y distribución (Tratado de Budapest para el depósito de cepas con fines de patentes, Convenio para la Diversidad Biológica, normativas sobre propiedad intelectual, etc.). Ello ha derivado en los denominados Acuerdos de Transferencia de Materiales (*Material Transfer Agreement*, MTA).

Respecto a los sistemas de gestión de la calidad, prácticamente todas las colecciones europeas han implantado las normas de calidad ISO 9001:2000 y 9001:2008 mediante los cuales definen los procedimientos que emplean y se comprometen a seguirlos. Algunas han implantando normas más específicas, como la ISO 17025, ISO Guide 34, etc. Sin embargo, dichas normas no aseguran que todas las colecciones funcionen de una forma homogénea o utilicen metodologías similares para la autenticación o la conservación de los microorganismos, y existen diferencias importantes al respecto.

En su decimoctava reunión en octubre de 2005, la TFBRC acordó llevar a cabo un estudio piloto sobre estándares de calidad para los BRCs, de tal forma que aquellas colecciones de cultivo que los cumplan puedan ser consideradas BRC e

integrarse en un *Global Biological Resource Centre Network* (GBRCN).

En abril de 2007, y tras varias reuniones en las que participaron representantes de las principales colecciones de cultivos, de las agencias de certificación/acreditación, y de la propia OCDE, ésta publicó las directrices para los BRCs que quieran acreditar “buenas prácticas”, como paso previo hasta que se desarrollen normas ISO 9001 específicas para BRCs (“*OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres*”) (<http://www.wfcc.info/Documents/OECD.pdf>). En dicho documento se dedica un capítulo específico a los microorganismos.

La CECT forma parte de la TFBC, ha participado en el estudio piloto sobre estándares de calidad para los BRCs y ha asistido regularmente a las reuniones celebradas desde 2005 hasta 2008 junto con representantes de colecciones de cultivos europeas, de países asiáticos (China, Japón) y de Brasil, representantes de la OCDE (secretariado), y agencias de certificación y/o acreditación.

La implementación de las normas de la OCDE por parte de las colecciones supone cambios más o menos importantes dependiendo de la situación de cada colección. En cualquier caso implica disponer de recursos adicionales, pero además requiere que las diferentes colecciones actúen de forma colaborativa unificando protocolos y procedimientos establecidos en dichas normas tanto en lo referente a los métodos de conservación, técnicas de autenticación, como a las normas de acceso y suministro de productos y servicios, etc. Con el fin de hacer frente a los retos que supone la implantación de dichas normas, las colecciones que habían participado en las diferentes reuniones de la TFBC iniciaron acciones destinadas a obtener financiación para poder abordar las transformaciones necesarias y poder cumplir con los requisitos establecidos por la OCDE para los BRCs con “buenas prácticas”.

## INICIATIVAS INTERNACIONALES PARA LA SOSTENIBILIDAD DE LOS CENTROS DE RECURSOS MICROBIANOS

En 2008, la OCDE auspició el desarrollo de un proyecto de demostración titulado: “*Demonstration Project for a GLOBAL BIOLOGICAL RESOURCE CENTRE NETWORK* (GBRCN)”. En él participan 17 colecciones/BRCs de Europa, Asia y Sudamérica, incluida la CECT, y tiene como principal objetivo coordinar los diferentes BRCs mediante un secretariado financiado por el BMBF (*Bundesministerium für Bildung und Forschung*, Alemania) para poner de relieve la importancia del establecimiento de redes que faciliten el intercambio de información sobre las diferentes actividades de los BRCs enfocadas a satisfacer las necesidades de los usuarios. El proyecto no implica financiación para los BRCs (<http://www.gbrcn.org/>).

La importancia que la UE concede a que los Centros de Recursos Microbianos estén dotados de infraestructuras adecuadas quedó patente en el Actual Programa Marco, ya que dentro de la convocatoria “FP7-Infrastructures” de 2008 incluyó como tema a los “*Biological Resource Centres (BRCs) for micro-organisms*”. Varias colecciones europeas solicitaron y lograron el proyecto titulado: “*European Consortium of Microbial Resource Centres-EMbaRC* (FP7-228310)” y que comenzó en febrero de 2009. En éste también participa la CECT junto a otras siete colecciones europeas (CIRM-INRA, Francia; CRBIP, Francia; BCCM, Bélgica; CBS, Holanda; CABI, Reino Unido; MUM, Portugal; DSMZ, Alemania). La financiación del proyecto incluye tres aspectos: coordinación, acceso transnacional e investigación que se integran entre sí para ofrecer un mejor servicio a los usuarios y la sociedad (<http://www.embarc.eu/>).

En la página web de la CECT ([www.cect.org](http://www.cect.org)) en la sección de Novedades aparece un aviso referente al acceso transnacional a las diferentes colecciones que participan en el proyecto EMbaRC, con un enlace a la información completa sobre las posibles estancias, así como las condiciones de acceso y selección de candidatos. El plazo ya está abierto.

## CONCLUSIÓN

**P**ara que la CECT pueda consolidarse como BRC con el nivel de excelencia exigido por la OCDE resulta imprescindible asegurar su continuidad a largo plazo, y ello implica necesariamente una financiación garantizada a nivel estatal. Si no se toman medidas urgentes, España puede quedar atrás en cuanto a la existencia de un Centro de Recursos Biológicos Microbianos acreditado a pesar de disponer de una estructura básica que en la actualidad está preparada para afrontar dicho reto a nivel internacional. Los gobiernos de países como Alemania, Bélgica, Francia, Japón, Corea, China o Brasil están siguiendo las directrices de la OCDE con resultados muy palpables en los últimos años, incluso en aquellos en que la posición de partida de sus colecciones era peor que la nuestra. Hay que tener en cuenta que, en el caso de los microorganismos, el número de especies descritas hasta la fecha es insignificante comparado con el estimado, y que en el caso de los procariotas, la media de descripción de nuevos géneros y especies excede los 700 al año (<http://www.bacterio.cict.fr/number.html#total>). Estos recursos están disponibles para cualquier usuario por tratarse necesariamente de depósitos públicos en colecciones/BRCs y representan un enorme potencial por explorar y explotar para el beneficio de la sociedad.

Es muy preocupante que en España, el MICINN u otros ministerios o instituciones relacionados con las actividades de la CECT (Oficina Española de Patentes y Marcas) hayan hecho oídos sordos hasta la fecha a las repetidas peticiones de ayuda que se les han hecho llegar. Y es aún más preocupante que el mismo Ministerio que declaró que apostaba



### Personal de la Colección Española de Cultivos Tipo.

El personal de la CECT está integrado por 3 profesores/as de universidad, personal técnico contratado y becarios/as. Solamente hay una persona de plantilla, el resto del personal contratado está financiado por la CECT, excepto dos técnicos superiores que disfrutan de una Ayuda del Ministerio para la contratación de Personal Técnico de Apoyo que finaliza en julio de 2009.

*De izquierda a derecha. Fila superior:* Teresa Lucena Reyes, becaria; M<sup>a</sup> Pilar Giner Jiménez, responsable de pedidos; José Miguel López Coronado, responsable de informática; Laura López Ocaña, 'curator' de hongos; Ana Igual Wöllstein, técnico de hongos; Esperanza Garay Aubán, Catedrática de Universidad y Directora; Nicolás Sola Serrano, administrador compartido con el SCSIE (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental); M<sup>a</sup> Carmen Macián Rovira, 'curator' de bacterias; Francisco Javier Pascual Martínez, becario; Beatriz Pinto Orgaz, técnico de bacterias. **Fila inferior:** Rosa M<sup>a</sup> Jiménez Cifuentes, técnico de bacterias; Amparo Ruvira Garrigues, becaria; Inmaculada Ferrer Romero, responsable de calidad; David Ruiz Arahal, Profesor Contratado Doctor, responsable de investigación; M<sup>a</sup> José Ros Fernández, técnico de laboratorio; M<sup>a</sup> Jesús Pujalte Domarco, Profesora Titular de Universidad, responsable de bacterias marinas.

por la economía basada en el conocimiento y que conoce (o debe conocer) perfectamente las iniciativas internacionales sobre la importancia de los Centros de Recursos Biológicos no haya mostrado hasta la fecha el más mínimo interés por el tema.

La CECT ha hecho todos los esfuerzos que estaban a su alcance para alcanzar los niveles de calidad e internacionalización que implica su transformación en un Centro de Recursos Microbianos Español al servicio de la Microbiología y de los microbiólogos. Estoy segura de que los socios de la SEM valoran el hecho de disponer de recursos microbianos autenticados y de calidad en las mejores condiciones tanto

para tareas de investigación como para sus numerosas aplicaciones. Pero la situación de la CECT es muy precaria y todo lo conseguido hasta ahora puede perderse si no hay un aporte económico sostenido por parte del gobierno. Por ello recorro a la SEM y a sus socios para que apoyen el proyecto ante los responsables políticos en la medida de sus posibilidades. Sería lamentable que España quedase una vez más atrás en una iniciativa que está siendo impulsada por todos los países desarrollados y que ya está dando sus frutos porque se trata de una apuesta segura.

Muchas gracias.

Comentarios sobre el XXII Congreso SEM:

## “De biopelícula en Almería”

Texto: **Humberto Martín**, secretario de la SEM.  
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Fotos: **María de los Ángeles Arcos Nievas**

Dpto. de Biología Aplicada. Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería.

Como no podía ser de otra manera, Almería nos recibió a finales de septiembre con un magnífico tiempo, preludio de lo que sería un espléndido congreso del que todos los que formamos la SEM nos tenemos que felicitar. A pesar de que las tareas docentes en la Universidad de Almería habían comenzado, pudimos disfrutar de varias salas en un área destinada para nuestro congreso; salas amplias, perfectamente dotadas y contiguas, que facilitaban los rápidos

“transbordos” entre simposios simultáneos. La cercanía del lugar dónde se ubicaron los posters, la puntualidad con la que se desarrolló el muy planificado calendario o incluso la tranquilidad del Campus, entre el sugerente mar y la cercana huerta, son sólo algunos factores que contribuyeron al éxito de este XXII Congreso de la SEM. Gracias, Joaquín.

Escuchando a Roberto Kolter glosar en su conferencia inaugural lo que él denominaba “la epifanía de la pecera”



### Inauguración del XXII Congreso de Microbiología de la SEM en Almería.

El día 21 de septiembre de 2009 se inauguró el XXII Congreso de Microbiología de la SEM en presencia de (de izquierda a derecha) D. Ricardo Guerrero, presidente de la SEM, Dña. Rafaela Abad, Concejala de Salud y Consumo del Ayuntamiento de Almería, D. Pedro Molina García, Rector de la Universidad de Almería, D. Ricardo Kolter, presidente de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) y D. Joaquín Moreno Casco, presidente organizador del XXII Congreso de Microbiología de la SEM.

me daba cuenta de que a partir de ese momento probablemente no sólo relacionaríamos a esta ciudad con el típico western de Sergio Leone, sino también con otro tipo de películas mucho más microbiológicas, los “biofilms”. Sí, es cierto que escuchando a Roberto estábamos igual que viendo una buena película, *embebidos* en el guión, cuando nos contaba que se dio cuenta en su pecera del laboratorio de que lo importante no ocurría en el agua de ésta, siempre clara, sino que sucedía en las superficies, donde los microorganismos se agregan e interaccionan, y coexisten distintos tipos de células con una función claramente cooperadora. A partir de ese momento emprende una nueva aventura, por la que nos guía a lo largo de su charla, dirigida a estudiar comunidades bacterianas, componentes funcionales de la mayoría de ambientes naturales. La transferencia de información entre individuos para coordinar comportamientos, que permite ejecutar a células individualizadas distintas tareas, se ejemplifica perfectamente en biofilms de *Bacillus subtilis*, que se diferencia a distintos tipos celulares en una misma “biopelícula”. Los experimentos de laboratorio que abordan estas cuestiones sirven perfectamente para profundizar en los mecanismos que regulan el desarrollo de comunidades de gran impacto en ámbitos tremendamente relevantes en ecología o salud, como son las desarrolladas en los pulmones de enfermos de fibrosis quística. Mediante el uso de “phylo-chips”, capaces de rastrear más de 10000 taxones, Roberto



**Ricardo Kolter impartió la conferencia inaugural del XXII Congreso Nacional de Microbiología SEM.**  
El presidente de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) impartiendo la conferencia inaugural del XXII Congreso de Microbiología de la SEM.



**Asamblea de la Sociedad Española de Microbiología.**

De izquierda a derecha, Dña. Irma Marín Palma, tesorera de la SEM, D. Ernesto García, vicepresidente de la SEM, D. Ricardo Guerrero, presidente de la SEM y D. Humberto Martín, secretario de la SEM.



### Entrega del Premio Jaime Ferrán de la Sociedad Española de Microbiología.

D. Álex Mira recogiendo el premio Jaime Ferrán de la SEM impartió la conferencia de clausura del XXII Congreso de Microbiología de la SEM.

estudia el impacto de la presencia de *Pseudomonas* o de distintos tratamientos antibióticos en la microbiota de dicho hábitat, compuesta por centenares de bacterias distintas. Teniendo en cuenta la relevancia de las infecciones, aún causantes de casi el 40% de las muertes por infecciones, las múl-

tiples caras de los antibióticos salpicarán numerosas charlas posteriores en distintos simposios. Así, aprendimos mucho más sobre su posible papel como moléculas “señalizadoras” en los ecosistemas naturales, el impacto que conlleva su uso en la cadena alimentaria, la importancia de las recombinaciones interespecíficas en regiones génicas implicadas en resistencia, o su capacidad para inducir procesos de mutación y recombinación, tanto inter como intracromosómica. Tal y como nos recordó Jesús Blázquez, este proceso, que lógicamente favorece la aparición de cepas resistentes, sería el perfecto paradigma de la proclamación de Friedrich Nietzsche: “lo que no me mata me hace más fuerte”. Fuerzas desde luego recuperamos en la soberbia copa de bienvenida, aunque el divertido aguacero que repentinamente se inició durante la misma nos hizo a todos correr en busca de cobijo. Seguro que a más de uno le hizo recordar a la “epifanía de la pecera”, del Dr. Kolter...

Muchos de los elementos que Roberto maneja en la charla inaugural anticipan aspectos que posteriormente se abordaron en profundidad en los simposios de “simbiosis y coevolución” como es la simbiogénesis, que hace referencia a los cambios evolutivos propiciados por procesos simbióticos, de “quórum sensing y quórum quenching”, o por supuesto en el simposio de “diversidad microbiana”. Alex Mira, flamante galardonado con el premio Jaime Ferrán, subraya durante la charla de clausura del congreso las ventajas de las aproximaciones genómicas basadas en la secuenciación de alto rendimiento a gran escala para llevar a cabo estudios de biodiversidad, ilustrados con trabajos sobre nichos ecológicos concretos, como es el de la placa dental humana, con más de 500 especies distintas. Introduce el concepto de pangenoma, desde el que estimula nuestra imaginación





### **El grupo organizador del XXII Congreso Nacional de Microbiología SEM – Almería 2009.**

De izquierda a derecha: Marisol Martínez, Gema Guisado, Macarena Jurado, Olga Cervera, Salvador Ruiz, Joaquín Moreno Casco, Juan Antonio López, Azahara Bernal, María de los Ángeles Arcos, Paqui Suárez, María José López y Carmen Vargas.

al recordar que tres cepas de *Escherichia coli* pueden compartir únicamente un 40% de los genes, detalle que ilustra el ingente reservorio génico del mundo bacteriano. La percepción de la enorme variación genotípica entre cepas de la misma especie va consolidándose según se incrementa el número de genomas secuenciados, algo que ocurre a un ritmo impresionante, fundamentalmente debido a la “democratización de la secuenciación”. La pirosecuenciación, otro de los protagonistas del congreso, es en parte responsable de ello. Su aplicación de forma masiva, ilustrada con diversos ejemplos, va pavimentando el camino de Alex en su charla según cruza los campos de la genómica funcional, la evolución microbiana o la metagenómica. Así, se utiliza en análisis globales de transcripción, tras la generación de los correspondientes cDNAs, permitiendo de una forma barata y rápida realizar estudios cuantitativos de expresión de genomas no secuenciados, o en el proyecto de secuenciación masiva de la biodiversidad microbiana marina promovido por Craig Venter. Todo ello no deja de ser un claro manifiesto de la cada vez más evidente convergencia de los avances genómicos y la Microbiología. Eso sí, el exotismo de hace años de disponer en el laboratorio de una persona especialista en bioinformática se ha vuelto ahora toda una necesidad...

Entre ambas charlas se fueron abordando los múltiples aspectos de la Microbiología actual, perfectamente representados en los distintos simposios y en los trescientos posters del congreso. Pudimos transitar desde diversos ámbitos de la fisiología fundamental procariótica a los aspectos ecológicos, económicos o, por supuesto, clínicos, de las infecciones víricas. Valga como ejemplo la magnífica charla de la doctora Nubia Muñoz, de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, en Lyon, haciendo un detalla-

do recorrido sobre lo que había sido la investigación del cáncer de cuello de útero y el virus del papiloma humano, que finalmente ha desembocado en la comercialización de vacunas eficaces. O viajar desde las facetas más prometedoras en el campo de la bioremediación de zonas contaminadas con hidrocarburos a los mecanismos de señalización que operan en bacterias asociadas con plantas. Pero también los fanáticos del mundo eucariota pudieron disfrutar tanto de charlas con las últimas novedades sobre la capacidad de los protistas para actuar como biofactorías o biosensores de elevada sensibilidad, por ejemplo frente a metales pesados, como de las levaduras utilizadas en el estudio de genes relacionados con cáncer o patogénesis bacteriana. La conservación y gestión de la impresionante biodiversidad microbiana, a través de los centros de recursos biológicos, no podían dejar de abordarse, especialmente cuando el próximo año celebraremos el cincuentenario de nuestra Colección Española de Cultivos Tipo.

El XXII Congreso de la SEM fue por tanto un perfecto escaparate del enorme elenco de aspectos microbiológicos que se están investigando actualmente en España a un altísimo nivel, casi tan variado y refinado como el de las tapas que disfrutaron aquellos que se fueron por el centro de Almería “de tapas con la SEM”. Un escaparate en el que también algunas compañías privadas y asociaciones, como la ASM, tuvieron la oportunidad de mostrar su oferta de servicios a la familia de la SEM. Por otra parte, este congreso fue también reflejo de la cada vez mayor interconexión y dependencia entre cada una de las áreas que conforman la Microbiología actual. En definitiva, más que una película, yo diría que en Almería se rodó un documental, un gran documental acerca de la magnífica salud de la Microbiología en España.

# ¡¡NUEVA SECCIÓN!!

## Profetas en su tierra

Estimados compañeros:

Pretendemos presentar hoy una sección que se incluiría en futuros número de *Actualidad SEM* que se llamará “*Profetas en su tierra*”. La idea surgió informalmente, porque con frecuencia estudiantes de nuestros laboratorios nos consultan acerca de dónde realizar una estancia tras la realización de su Tesis Doctoral. Hemos pensado que una aportación útil en este sentido sería contactar con miembros recientes de la comunidad de microbiólogos españoles que hayan estado en el extranjero. Y que nos lo digan.

Pretendemos que nos describan, brevemente, su experiencia personal en esa etapa. Desde el punto de vista científico, su línea de trabajo, el grupo de investigación, el centro de trabajo, el ambiente investigador y sus perspectivas actuales y futuras (dónde se han incorporado y en qué trabajan en la actualidad). Y tan importante (o más), pretendemos que nos cuenten detalles acerca de la vida en el lugar elegido, la facilidad de integración, las diversiones y oportunidades, puesto que este factor también condiciona con frecuencia la elección. No hay límite de espacio (aunque en principio una hoja A4 sería suficiente). Ni normas específicas: el contribuyente puede plantear el texto (siguiendo estas directrices generales que ahora indicamos) con absoluta libertad, resaltando tanto las cosas positivas como negativas con claridad de dicha experiencia.

Además de ayudar a investigadores jóvenes que se plantean iniciar el mismo proceso que ellos iniciaron hace años, pensamos que puede ayudar a conocer el trabajo y trayectoria de jóvenes microbiológicos de enorme calidad dentro de nuestro país.

En principio, Jesús Pla ([jesuspla@farm.ucm.es](mailto:jesuspla@farm.ucm.es)) se encargará de esta sección. Si deseáis participar os agradeceríamos que contactarais con él o con Federico Navarro ([fnavarro@farm.ucm.es](mailto:fnavarro@farm.ucm.es)) al objeto de establecer los plazos de vuestra contribución y planificarla.

Como muchas ideas, buenas en principio, necesita llevarse a cabo, y por ello os pedimos a todos sugerencias y os agradecemos, de antemano, vuestra colaboración.

# VIII Workshop sobre métodos rápidos y automatización en Microbiología Alimentaria

## Directores:

Marta Capellas Puig ([marta.capellas@uab.cat](mailto:marta.capellas@uab.cat)) y Josep Yuste Puigvert ([josep.yuste@uab.cat](mailto:josep.yuste@uab.cat)).

**Fecha:** 24 a 27 de noviembre de 2009.

**Lugar:** *Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona* (Bellaterra, Cerdanyola del Vallès).

## Ponentes y ponencias, y otras actividades:

- **PONENTE PRINCIPAL:** Profesor Dr. Daniel Y. C. Fung (*Kansas State University*, Manhattan, Kansas, EUA): Toma y preparación de muestras de alimentos sólidos y líquidos; superficies; y aire. Miniaturización. Galerías de identificación. Métodos para contar las células viables: membrana hidrofóbica, siembra en espiral, citometría de flujo, técnica de filtración por epifluorescencia directa (DEFT). Métodos para contar las células viables, basados en impedancia, conductancia y capacitancia eléctricas; bioluminiscencia (análisis de ATP); y colorimetría. Métodos inmunológicos para identificar microorganismos y sus toxinas: separación inmunomagnética; ELISA y ELFA; inmunodifusión lateral; inmunoprecipitación; aglutinación del látex. Métodos genéticos para identificar microorganismos: hibridación; reacción en cadena de la polimerasa (PCR); caracterización por ADN (*fingerprinting*, *riboprinting*); biosensores, biochips y microchips; proteómica.
- **PONENCIA INAUGURAL:** Dra. Cécile Lahellec (*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments –AFSSA–*, Alfort, Francia): “Cooperación internacional en microbiología alimentaria”.
- **DR. ARMAND SÁNCHEZ BONASTRE** (UAB, Bellaterra –Cerdanyola del Vallès–): “La *polymerase chain reaction* (PCR)”.
- Sr. Martín Iorlano (APSA LAB, SL, Reus): “Puesta a punto e implantación de la PCR para *Salmonella* spp. en piensos y materias primas”.
- **DRA. TERESA ESTEVE NUEZ** (*Centre de Recerca en Agrigenòmica –CRAG–*, consorcio CSIC-IRTA-UAB, Barcelona): “Organismos modificados genéticamente (OMGs): detección, legislación y evaluación de riesgos”.
- **SR. DAVID TOMÁS FORNÉS** (ainia.centro tecnológico, Paterna): “Control de calidad interno en laboratorios de microbiología”.
- **DR. FERRAN RIBAS SOLER** (Comisión de Normalización y Validación –CNV–, SEM, Madrid): “Estudios de equivalencia europeos entre métodos para enumerar *Escherichia coli* y enterococos en aguas de baño”.
- **MESA REDONDA** (con el Dr. Fung, otros ponentes, y profesionales de empresas y laboratorios de microbiología) sobre instrumentación en microbiología de los alimentos, tendencias del mercado mundial, y otros temas de actualidad del sector; moderada por el Dr. José Juan Rodríguez Jerez (UAB, Bellaterra –Cerdanyola del Vallès–).
- **SESIONES PRÁCTICAS EN EL LABORATORIO (25, 26 Y 27 DE NOVIEMBRE).** Impartidas por los Dres. M<sup>a</sup> Manuela Hernández Herrero y Artur Xavier Roig Sagués. Muestreadores ambientales: placas de contacto Mediasure, Sampl’air, MicroBio. Cepas microbianas liofilizadas de referencia. Criobolas. Homogeneizadores: Pulsifier, Smasher. Dilumat S y Dilubag. Dilucup/Dilushaker. Medios de cultivo cromogénicos: ASAP, SMS, ESIA, REBECCA, ALOA, BACARA, Baird-Parker RPF, COLI ID, chromID Salmonella, chromID O157:H7, chromID Ottaviani Agosti, Brilliance Salmonella (método Oxoid Salmonella PreciS), Brilliance Listeria (método Oxoid Listeria PreciS), medio E. sakazakii, RAPID’E.coli 2, RAPID’L.mono, test SESAME Salmonella, agar COMPASS Listeria, agar CONFIRM’ L.mono, BBL CHROMagar Salmonella, BBL CHROMagar O157, BBL CHROMagar Listeria, BBL CHROMagar Staph aureus, Compact Dry Plate ETB, Compact Dry Plate SL, Compact Dry Plate X-SA. Sembrador rotativo Twister. Sembrador en espiral WASP II. Contador de colonias EC2. Petrifilm (placas y lector). NEO-GRID. Easygel. SimPlate. TEMPO (NMP miniaturizado y automatizado). Galerías de identificación y lectores: API, BBL Enterotube II, BBL Crystal ID, RapID ONE, O-B-I-S-, Microbact, Microgen ID. Drink water kit P/A, KIT PRO, ListeriaKIT screening swabs. ATP.
- **BIOLUMINISCENCIA:** luminómetro Luminomat. Inmunología: ELISA/ELFA (VIDAS UP E. coli O157:H7: tecnología de la proteína recombinante de fago, Alert para histamina), aglutinación del látex (Microgen, Oxoid latex test), inmunodifusión lateral (RapidChek, BioKits RAPID 3D –alérgenos–, Reveal –patógenos, alérgenos–, VIP), inmunoprecipitación (1-2 Test para Salmonella).

**Empresas de microbiología:** exhibiciones. Con la colaboración de: 3M España SA, AES Chemunex España SA, Applied Biosystems SA, Becton Dickinson SA, bioMérieux España SA, Bio-Rad Laboratories SA, Bioser SA, Eppendorf, IUL SA, GeneSystems SA (parte de Pall Corporation), Laboratorios MICROKIT SL, MicroPlanet Laboratorios SL, Nirco SL, Olympus Optical España SA, Oxoid SA (parte de Thermo Fisher Scientific Inc), y Roche Diagnostics SL.

**Otras actividades:**

- \* Taller sobre Inmunosensores electroquímicos para detectar bacterias patógenas.
- \* Taller sobre Uso de los recursos para microbiología predictiva disponibles en internet.
- \* Visita a empresa de biología molecular, para Aplicaciones de la PCR en tiempo real.

**Precios:** Sesiones prácticas: 50 € (descuento para estudiantes UAB). Resto del workshop: 215 € (o 110 €/día); estudiantes UAB: 12 €; personal UAB: 40 €; estudiantes no UAB: 125 € (o 65 €/día); socios ACCA: 175 €; suscriptores revistas "Alimentaria", "Alimentación, Equipos y Tecnología" o "Técnicas de Laboratorio": 190 €.

**Más información** (horarios, perfiles de los ponentes, etc.): <http://quiro.uab.cat/workshopMRAMA>.

**Breve perfil del Dr. D. Y. C. Fung** (dfung@ksu.edu): Catedrático del *Department of Animal sciences and industry* de la *Kansas State University* (Manhattan, Kansas, EUA). 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. Tiene más de 800 publicaciones, entre artículos en revistas científicas, libros y comunicaciones en congresos. Director del *workshop* internacional anual sobre Métodos rápidos y automatización en microbiología, celebrado anualmente en Manhattan, KS y que ha cumplido su 29ª edición. Ganador del Premio Internacional del Institute of Food Technologists (IFT) en 1997, por la organización de esta serie única de *workshops* internacionales; el Premio Carl R. Fellers del IFT en 2006, por su excepcional trayectoria en Ciencia y tecnología de los alimentos; y el Premio Inaugural al Mejor Educador en Seguridad Alimentaria de la revista *Food Safety* y *ConAgra Foods Inc* en 2007, por su carrera docente. Editor asociado sénior de *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*.

### Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

*Actualidad SEM* publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas o dirigidas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM o al Director por correo electrónico, siguiendo el formato: *Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación* (si es distinto) y *Resumen* (máximo, unas 500 palabras). El resumen que se envía a la base de datos *Teseo* es apropiado también.

*Actualidad SEM* se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la microbiología.

## Socios que deben actualizar datos

- Abad Lozano, José Luis
- Bertolín Serra, Fco. Javier
- Bordes Benitez, Ana
- Fernández Orts, Eva María
- José Carmelo Jorge Blanco
- Lafarga Capuz, Bernardo
- López Ponce, Francisco José
- Medieros Almendros, Jesús
- Miranda Casas, Consuelo
- Rubio Vallejo, Manuel Fco
- Sagardia Redondo, M<sup>a</sup> 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.semicro.es](http://www.semicro.es)).

# Comienza su singladura el primer Grado de Microbiología de España

**Montserrat Llagostera**

Coordinadora de la Comisión del Plan de Estudios de Microbiología  
*Unitat de Microbiologia*  
Universidad Autónoma de Barcelona

**E**n el contexto de la historia de la humanidad, no han transcurrido muchos años desde los tiempos de los fundadores de la Microbiología hasta nuestros días. A pesar de ello, en este corto espacio de tiempo la Microbiología ha vivido ya dos edades de oro y actualmente la tercera edad de oro de esta ciencia se encuentra en todo su esplendor. Hoy en día, la Microbiología es una ciencia con entidad propia, con un ingente acervo de conocimiento y con aplicaciones en agricultura, sanidad, medio ambiente, biotecnología e ingeniería entre otros sectores científicos, tecnológicos e industriales de nuestra sociedad. Uno de los retos actuales de la Microbiología es el de proporcionar una formación adecuada para capacitar a las siguientes generaciones de microbiólogos y también el de educar a la población y a los gobernantes para comprender la importancia crucial de esta ciencia en la salud y en la economía (Maloy y Schaeter. 2006. *The era of Microbiology: a Golden Phoenix. International Microbiology* 9:1-7).

En los últimos tres años, en la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB) se conjuntaron una serie de “astros” que permitieron proponer un Grado de Microbiología, tomando como modelo lo que ya ocurre en distintos países de la Unión Europea y de otras regiones del mundo. Estos “astros” fueron: i) el espacio europeo de educación superior, ii) la supresión de un catálogo cerrado de títulos universitarios en España, iii) la creación de la *Facultat de Biociències* de la UAB, y iv) la decisión del equipo rectoral de estimular propuestas novedosas de títulos universitarios. Esta “conjunción astral” permitió que el profesorado de la *Unitat de Microbiologia* Campus de la UAB propusiera a la *Facultat de Biociències* la transformación de los estudios que conforman el itinerario de especialización en Microbiología de la licenciatura de Biología en una titulación de grado. La propuesta fue aprobada por la Junta de la *Facultat de Biociències* en marzo de 2007 y posteriormente por el Consejo de Gobierno de la UAB. A partir de esta fecha comenzó un proceso complejo y difícil de unos dos años

de duración en los que se elaboró el plan de estudios del primer Grado de Microbiología de nuestro país y culminó con la verificación positiva de dicha propuesta el 8 de abril de 2009 por parte de la ANECA. El plan de estudios propuesto consta de 240 ECTS, los cuales se distribuyen entre diferentes materias de formación básica en ciencias y en biología y en materias específicas de la Microbiología, como son: el mundo microbiano, genética y biología molecular de microorganismos, microbiología sanitaria y microbiología aplicada y ambiental, las cuales incluyen tanto asignaturas obligatorias como optativas. Forma parte también del núcleo del grado la materia de Técnicas experimentales, en la que se incluye todos los aspectos prácticos de laboratorio, el *practicum* y el trabajo final de grado, el cual es obligatorio según se indica en el Real Decreto 1393/2007.

La experiencia previa sobre el número de alumnos que cursan la especialidad de Microbiología de la Licenciatura de Biología de la UAB aconsejó que el número de plazas del Grado de Microbiología fuera de 60 y esta oferta se hizo pública por parte de la *Generalitat de Catalunya* a los estudiantes interesados en cursar estudios universitarios en el curso 2009-2010. La realidad superó las expectativas más optimistas, ya que 681 estudiantes solicitaron cursar el Grado de Microbiología con una nota de corte de 7,13, lo cual muestra que alumnos con una buena nota de acceso a la universidad tienen interés por el grado. El catorce de septiembre de 2009, sesenta y cuatro alumnos llenaron el aula del primer curso de Microbiología, con lo cual el primer Grado de Microbiología de nuestro país inició su singladura. Comienza así una nueva etapa que da respuesta a uno de los retos actuales de la Microbiología: formar buenos profesionales en este ámbito para contribuir al desarrollo de esta ciencia en nuestro país. El camino no será fácil y seguramente requerirá un esfuerzo continuo por parte de todo el profesorado implicado, pero estamos seguros que llegaremos a buen puerto.

## BAControl

### // MATERIAL DE REFERENCIA MICROBIOLÓGICO

Para facilitar el control de calidad en el laboratorio.

Fácil de usar, rápido, seguro, trazable y cuantitativo.  
En sólo **3 pasos y 10 minutos.**

## BAControl

MATERIAL DE REFERENCIA BACTERIOLÓGICO CUANTITATIVO DE USO DIARIO

Cada pastilla contiene un número determinado de células viables y cultivables. Es el material apropiado para la realización de controles de calidad rutinarios, como controles de proceso, creación de gráficos de control o controles de calidad de medios de cultivo.

#### CARACTERÍSTICAS

Homogéneo  
Estable a largo plazo  
Cuantitativo  
Fácil conservación  
Preparación sencilla

#### VENTAJAS

Fácil de usar  
Rápido  
Seguro  
Trazable  
Cómodo y práctico

Y SI LO QUE BUSCAS ES PRECISIÓN Y MEDIDA,

## BACuanti

el material de referencia bacteriológico cuantitativo y certificado (cultivo, PCR y DNA).