

**Bioseguridad,
biocontención y
bioprotección**

**El singular mundo de
las levaduras enológicas**

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

Asunción de los Ríos

Instituto de Recursos Naturales.
Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC.
Serrano 115 dpdo.
28006 Madrid.
arios@cma.csic.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

Ana Martín-González

Dpto. Microbiología-III, Facultad de Biología.
Universidad Complutense (UCM).
C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid (Spain).
anamarti@bio.ucm.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.

Webmaster de la SEM: **Jordi Urmeneta Masó**. E-mail: jurmeneta@ub.edu

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal, 645. E-08028 Barcelona.

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

SUMARIO



Visite la página web
de la SEM:

www.semico.es

Encontrará información
actualizada sobre
congresos, reuniones,
cursos y becas

Socios protectores de la SEM:

Francisco Soria Melguizo, S.A.



Fundación Medina



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: org46@orgc.csic.es o
secretaria.sem@semico.es

Actualidad SEM

Número 49

Junio 2010

Cursos y premios	2
Editorial: “La microbiología y la biodiversidad invisible”	3
<i>Ricardo Guerrero</i>	
Informes de los grupos	4
Nuevo grupo especializado de la SEM	6
Docencia y difusión de la Microbiología <i>Montserrat Llagostera</i>	
Tesis doctorales	9
Ana González Paredes, Anabel Alperi Vega, Anna Hervas Busquets, Agustín León Alonso-Cortés, Luis R. Collado González, Fernando Santos Beneit, Fernando Teijeira Romón, Lucía Blasco Escrivá, Gerard Álvarez Juste, Juan Antonio García López, María Jesús Andrade Gracia, Manuel Montalbán López, María Magdalena Mulet Pol, Margarita Martínez Medina, María Somolinos Lobera, Patricia Agudelo-Romero, Mónica Martínez Alonso, Patricia Ruiz Pérez, Verena Blume Serrano, Virginia Soledad Lioy, Rosario Mañes Lázaro, Virginia Rubio López, Ximena de Andrés Orbegozo, Cristina Bofill Bosch	
Socios que deberían actualizar datos	19
Bioseguridad y biocontención: reflexiones	20
<i>Xavier Abad</i>	
Nuevos socios de la SEM	26
Reseñas de Cursos	27
VIII WORKSHOP “Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria”	
Recursos microbianos	30
El depósito de cepas en las colecciones de cultivos microbianos <i>Esperanza Garay</i>	
Profetas en su tierra	32
Recuerdos de mi experiencia postdoctoral <i>Oscar Zaragoza Hernández</i>	
El singular mundo de las levaduras enológicas	35
<i>Jesús Manuel Cantoral Fernández y María Esther Rodríguez Jiménez</i>	
CECT, año 2009	41
<i>Esperanza Garay</i>	

Información general sobre los cursos SEM Formación on-line

1. OFERTA ACADÉMICA 2010-2011

La formación on-line de la SEM comienza con los siguientes tres cursos:

- Primer cuatrimestre (octubre-diciembre 2010)
 - **Biodeterioro y Biodegradación de Materiales (BBM)**
 - **Biotecnología y Seguridad Microbiológica de los Alimentos (BSMA)**
- Segundo cuatrimestre (marzo-mayo 2011)
 - **Microbiología y Conservación de Cosméticos (MCC)**

Las guías de estos tres cursos con toda la información relativa al temario, bibliografía, forma de evaluación, etc., están colgadas en la pestaña de Cursos de la página Web de la SEM (www.semimicro.es).

2. ¿QUIÉNES PUEDEN CURSAR LOS CURSOS SEM FORMACIÓN ON-LINE?

En principio, cualquier persona interesada en la Microbiología podrá realizar los Cursos SEM Formación on-line, aunque obviamente para el seguimiento de los mismos deberán tenerse ciertas nociones mínimas de Microbiología. Los cursos están planteados para Graduados, Licenciados o Ingenieros pero también son accesibles para alumnos pregraduados, FPI, personal técnico de empresas, o aquellos que utilicen las herramientas de la Microbiología en su actividad diaria y deseen aumentar su formación en esta área.

3. ¿CÓMO SE ESTUDIAN LOS CURSOS SEM FORMACIÓN ON-LINE?

Se realizan "A DISTANCIA" a través de Internet, lo que le permite al alumno utilizar el horario más adecuado y que sea compatible con su vida laboral y familiar. Para ello solo necesita un ordenador y una conexión a Internet para acceder a la documentación y demás información del curso. Los recursos didácticos están alojados en un servidor al que se accede por contraseña individualizada.

Cada curso tiene asignado uno o varios profesores tutores que son los encargados de elaborar la documentación de estudio, resolver las dudas, guiar el aprendizaje de los alumnos y hacer el seguimiento de las evaluaciones continuas.

El alumno dispone de toda la documentación al principio del curso, la cuál descarga desde el Campus Virtual por Internet. A lo largo del curso el alumno podrá contactar con su Profesor Tutor a través del Aula Virtual del curso, Vía Internet, con el fin de aclarar cuantas dudas se presenten o ampliar conceptos específicos.

La formación a distancia exige regularidad y disciplina desde la primera semana del curso. Como promedio se le deben dedicar unas 5 horas semanales a cada curso.

4. EVALUACIÓN Y CERTIFICADO DE APTITUD

4.1. Evaluación. La evaluación será continua mediante la realización on-line de los exámenes de tipo test de cada una de las unidades didácticas que componen el temario de cada curso.

4.2. Certificado de aptitud. Los alumnos que hayan seguido cualquiera de los cursos y demuestren su aptitud mediante la oportuna realización de los ejercicios y superen los exámenes on-line tienen derecho a un CERTIFICADO DE APTITUD en formato de DIPLOMA.

Todos los Cursos SEM Formación on-line han sido aprobados por la Junta Directiva de la Sociedad Española de Microbiología, por tal motivo el Diploma que se otorgue es un Diploma SEM.

5. CRÉDITOS ECTS

Todos los Cursos SEM Formación on-line equivalen a 4 créditos ECTS. Un crédito ECTS equivale a 26 horas de trabajo académico por alumno.

6. PRECIO Y BECAS

6.1. Precio. El precio por curso es de 250 €. Para los miembros de la Sociedad Española de Microbiología es de 150 €. El precio incluye el acceso a la documentación del curso vía on-line, la realización de los ejercicios y evaluaciones, el Diploma correspondiente y el poder acceder a las becas que se otorgan por rendimiento académico.

6.2. Becas. Por cada curso se otorgarán un 10% de becas, consistentes en la devolución íntegra de la matrícula a aquellos alumnos que mejores resultados hayan obtenido al finalizar el curso.

7. PREINSCRIPCIÓN, MATRÍCULA Y PAGO

7.1. Preinscripción. El interesado en realizar los cursos SEM Formación on-line deberá enviar sus datos a Ana M. García (ana.garcia.ruiz@upm.es).

La preinscripción está abierta todo el año y no hay fecha de cierre, pero se recomienda hacerlo lo antes posible dado que hay un límite en el número de alumnos admitidos por curso, y el orden de preferencia es el de preinscripción. Una vez confirmada la preinscripción al curso el alumno deberá formalizar la matrícula.

7.2. Matrícula y Pago. Una vez realizada la preinscripción y aceptada por la Secretaría de Cursos SEM Formación on-line se le indicarán al alumno por correo electrónico las instrucciones a seguir para formalizar su matrícula y realizar el pago. El pago debe ser satisfecho antes de la fecha de inicio del curso.

8. CONTACTO

Para más información de los Cursos SEM Formación on-line, preinscripción, etc. deben ponerse en contacto con Diego A. Moreno: (diego.moreno@upm.es).

La microbiología y la biodiversidad “invisible”

Ricardo Guerrero
Presidente de la SEM

La Asamblea General de las Naciones Unidas ha proclamado este año de 2010 el “Año Internacional de la Diversidad Biológica”, con el fin de atraer la atención internacional sobre el problema de la pérdida continua (¿e imparable?) de la biodiversidad. Los principales objetivos del Año Internacional son: a) la conservación de la biodiversidad y b) el uso sostenible de la biodiversidad. En consecuencia, gobiernos y centros de investigación y universitarios han propuesto diversas medidas y estudios para tratar de cumplir esos dos objetivos centrales. Pero hay un paso previo, imprescindible para poder actuar: conocer la biodiversidad actual. Y aquí surge el problema; todos los estudios de que disponemos hacen un censo de la diversidad de plantas, hongos y animales, pero olvidan el gran grupo donde se encuentra el 90 % de la biodiversidad del planeta: los microorganismos. Si sumamos las especies clasificadas de “macroorganismos”, no llegaremos a dos millones. Si les añadimos los protistas conocidos y las plantas, hongos y animales todavía no identificados, podríamos llegar apenas a tres millones. Y de éstos, la mayor parte son coleópteros; no en vano J. B. S. Haldane (1892-1964) dijo sarcásticamente que Dios tenía “*an inordinate fondness for beetles*” —una irrefrenable pasión por los escarabajos.

Aunque el número de “especies” registradas en el *Manual de Bergey* no pasa de seis mil, el número total de “especies” de bacterias y arqueas que existen realmente en la actualidad puede estar cerca de treinta millones. Y eso es en la Tierra actual; durante el 85 % de la historia de la vida sobre el planeta, sus únicos habitantes han sido los microorganismos. Sólo hace 542 millones de años (la Tierra es mucho más vieja, tiene 4550 millones de años), aparecieron los seres que han dado origen a las plantas, hongos y animales. Si se ha calculado que en la boca de una persona sana puede haber más de seiscientas “especies” de bacterias, todavía es pronto para cuantificar con cierta precisión la diversidad procariótica. Una de las razones es la dificultad de definir qué es una especie de bacterias o arqueas, y cómo identificarlas. Y precisamente ha sido esa gran diversidad la que ha permitido a los procariotas colonizar los hábitats más diversos de la Tierra, y los que consideramos ambientes “extremos” para nuestra especie donde sería imposible nuestra vida —pero no la de los microorganismos.

La diversidad microbiana suele pasar desapercibida, tanto para el público no especializado como para muchos científicos. Debido a su diminuto tamaño, la inmensa mayoría de los microbios son invisibles al ojo humano, y el ciudadano no es consciente de su existencia e importancia. Es una biodiversidad desconocida, de organismos que no suelen ocupar las portadas de revistas y magazines y a los que, por supuesto, tampoco se les dedica la más mínima atención en los noticieros televisivos, excepto si han causado una toxiinfección alimentaria, o cualquier otro tipo de problema en la salud humana. Tampoco, y esto puede resultar incluso más llamativo, en

los programas dedicados a la divulgación de la naturaleza y el medio ambiente, en los mejores museos de ciencias naturales del mundo. Los microorganismos no pertenecen a la “jet set” del mundo de la naturaleza, sino, más bien, a la clase trabajadora, a los “obreros” que desarrollan su existencia en el más absoluto anonimato, pero cuya función esencial mantiene activo todo el entramado de la biosfera. Son los microorganismos los que impulsan el necesario flujo de energía y el reciclado de la materia que permiten la existencia de la vida sobre la Tierra. En definitiva, los ignotos microorganismos son los responsables de que especies emblemáticas como la ballena azul, el águila imperial, el pato de los torrentes o el lince ibérico, mucho más conocidos y reconocidos, sigan compartiendo el planeta con nosotros.

Si miramos un “Árbol de la Vida” como el propuesto por Carl Woese, veremos que todas las ramas y ramitas corresponden a microorganismos, incluso dentro de los eucariotas. Solamente al final, en uno de los extremos, aparecen tres ramas que corresponden a “macroorganismos”: los animales, las plantas y los hongos (y de éstos, una parte muy importante, mohos y levaduras, también son microbios). Conviene recordar que la biodiversidad es consecuencia de un proceso evolutivo que ha durado muchos cientos de millones de años, usada y modificada por las distintas especies que surgieron y se adaptaron al medio, modelada por el intercambio genético y por un sinnúmero de transformaciones que han dado lugar a lo que hoy tenemos sobre la Tierra: una biosfera formada por el conjunto de genes, células, organismos, especies y ecosistemas que la pueblan. El reto es seguir investigando para ir descubriendo esa ingente cantidad de organismos aún desconocidos. Los microorganismos aportan a la biosfera más beneficios que inconvenientes. Recientemente, John L. Ingraham, profesor emérito de la Universidad de California en Davis, en su apasionante libro *March of the microbes* (Harvard University Press, 2010), ha escrito que el número de especies de microbios patógenos es muy inferior al porcentaje de asesinatos en la población humana (pág. 3).

La extrema diversidad biológica y bioquímica del mundo microbiano representa un recurso amplio e inexplorado de enorme valor para el futuro. Este Año Internacional, que también lo es de la *MicroBiodiversidad*, debería tener en cuenta lo que nos propone Roberto Kolter, presidente de la ASM, en el prólogo del mencionado libro: ‘*Cada rincón de la biosfera está repleto de microbios. Cuando miramos una playa idílica, sólo vemos grandes extensiones de blanca arena y agua azul. Pero cada grano de arena y cada gota de agua están henchidos de vida microbiana. Una vida tan rica y tan misteriosa que apenas comenzamos ahora a intuir la extensión de su diversidad. ¡Hay tanto que explorar en el mundo microbiano!*’

Nosotros, científicos dedicados a estudiar muy diversas facetas de esa vida microbiana, tenemos el derecho y el deber de llevarlo a la práctica.

Biodeterioro y biodegradación

Presidenta: **Asunción de los Ríos Murillo**

Renovación de la Junta Directiva

Se ha procedido a una renovación de los cargos de Presidente, Vicepresidente, Tesorero, Secretario y 3 vocales en la Junta del Grupo de Biodeterioro y Biodegradación de la SEM. El día 7 de abril, fue ratificada la candidatura de composición

Presidenta: Asunción de los Ríos.
Vicepresidenta: Ana M. García Ruiz.
Secretario y Tesorero: Constantino Ruibal Villaseñor.
Vocal: M. Carmen San José Serran.
Vocal: Concepción Abrusci Bernal.

La nueva Junta se pone a vuestra disposición para lo que necesitéis y agradece la dedicación y la excelente labor realizada por el presidente saliente, Diego A. Moreno, tanto durante su presidencia como desde la creación del grupo, del que es miembro fundador.

Microbiología Molecular

Presidenta: **María Molina Martín**

El grupo especializado de Microbiología Molecular celebrará su VIII Reunión en Barcelona del 10 al 12 de noviembre de 2010, organizada por Antonio Juárez. El Comité organizador ha elaborado un interesante programa en colaboración con el Comité científico, que incluye una conferencia inaugural a cargo de José Antonio Salas, y diferentes sesiones de comunicaciones y pósters. La sede de la Reunión será el auditorio del Parque Científico de Barcelona, situado en el campus de Pedralbes cercano a la Facultad de Biología. La información detallada se puede obtener en la página web de la Reunión a la que se puede acceder a través de la web del grupo especializado (<http://www.ucm.es/info/mmml/>). Esperamos vuestra asistencia y os animamos, en especial a los investigadores más jóvenes, a presentar vuestros trabajos de investigación.

Protistología

Presidenta: **Ana Martín-González**

Renovación de la Junta Directiva

El pasado 2 de Diciembre del 2009 se procedió al recuento de votos remitidos por los socios del Grupo de Protistología para la renovación de su Junta Directiva. Todos los votos emitidos votaron positivamente a la candidatura presentada y compuesta por los siguientes miembros:

Presidenta: Ana M^a Martín-González.
Vice Presidente: Francisco Gamarro.
Secretario-Tesorero: Eduardo Villalobo.
Vocales:
Aurelio Serrano,
Humbert Salvadó,
Lucía Arregui.

Compromisos de la nueva dirección

Como nueva directora del Grupo de Protistología, y con el apoyo del resto de los miembros de la junta directiva, me gustaría expresar aquí mi compromiso de: a) Incrementar el número actual de miembros del grupo, y b) Crear la página web del grupo, que como en otros grupos especializados, tendrá su ubicación en la web general de la SEM.

Agradezco el apoyo que los miembros del grupo me han dado, al nombrarme presidenta del mismo, y confío en la colaboración de todos los miembros del grupo en la organización de las futuras reuniones y cualquier otra actividad que llevemos a cabo. Gracias por vuestro apoyo.

Hongos Filamentosos y Levaduras

Presidenta: **Amparo Querol**

El grupo de Hongos Filamentosos y Levaduras de la SEM organiza este año junto a la Asociación Española de Micología, el X Congreso Nacional de Micología, que tendrá lugar en Sevilla del 22 al 24 de septiembre. La reunión se celebrará en el Hotel NH Cen-

tral Convenciones de dicha ciudad. Este año la organización recae sobre la Asociación Española de Micología siendo la presidenta del Comité Organizador la Dr. Estrella Martín Mazuelos (Hospital de Valme de Sevilla).

Las mesas redondas organizadas por el grupo de Hongos Filamentosos y Levaduras de la SEM son:

MESA REDONDA I. "Morfogénesis de Hongos"

Moderador: Dr. L. Corrochano

1. Regulación de la esporulación *Aspergillus nidulans*. Dr. U. Ugalde
2. Genética de la conidiación en *Aspergillus*. Dr. D. Cánovas
3. Morfogénesis de la pared celular de *Candida*. Dr. J. Ruíz-Herrera
4. El fototropismo en *Phycomyces*: de los estudios fisiológicos iniciales a las bases moleculares de la fotorrecepción. Dr. A. Pérez Eslava.

MESA REDONDA II. "Metabolismo y fisiología de hongos"

Moderador: Dr. J. Ávalos

1. Bioquímica del sexo en *Phycomyces*. Dr. E. Cerdá-Olmedo.
2. Regulación de xilanasas y otras hidrolasas fúngicas. Dra. M. Orejas.
3. Producción de biodiesel a partir de micelio del hongo *Mucor circinelloides*. Dr. V Garre.
4. Regulación de metabolitos secundarios fúngicos. Dr. J.F. Martín.

MESA REDONDA III. "Interacciones con el ambiente"

Moderador: Dr. V. Garre

1. Interacción *Botrytis*-hospedador. Dr. J. Cantoral.
2. Regulación del metabolismo secundario en *Fusarium*. Dr. J. Ávalos.
3. Peroxidasas ligninolíticas en basidiomicetos: Importancia medioambiental y potencial biotecnológico. Dr. A.T. Martínez y F.J. Ruíz-Dueñas.
4. La regulación génica de la patogénesis en *Fusarium*. Dra. R. G. Roncero.

Desde hace unos años el grupo convoca periódicamente el Premio "Fleming", dirigido a jóvenes investi-

gadores que destacan en el campo de la Micología, cuyo trabajo esté realizado preferentemente en España y por personas vinculadas a este grupo especializado de la SEM. En este momento se están evaluando los artículos enviados este año por una Comisión de expertos del grupo y el ganador será invitado a presentar el trabajo en el X Congreso Nacional de Micología.

Microbiología de los Alimentos

Presidente: **Francisco Javier Carballo**

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 Ansúrez (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 en ediciones anteriores, el Congreso se articulará en torno a una conferencia inaugural, cuatro mesas redondas y una conferencia de clausura. A continuación se adelantan los títulos y ponentes:

CONFERENCIA INAUGURAL: **“The role of Food Microbiology in Food Safety and Quality”**. Prof. Peter Rasp, *University of Ljubljana*

MESA REDONDA I. “ESTRATEGIAS EMERGENTES DE CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS”

Moderador: Prof. Miguel Prieto Maradona, *Universidad de León*

1. “Multiple Antimicrobial Hurdle Issues”. Prof. John N. Sofos, *Colorado State University, USA*.
2. “Modern preservation: a macroscopic and microscopic approach”.

Prof. Frank Devlieghere, *Ghent University, Bélgica*.

3. “Aplicación de la Biología de Sistemas Microbiológicos para garantizar la inocuidad alimentaria con tecnologías no térmicas”. Prof. Pablo Fernández Escámez, *Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia*.

MESA REDONDA II. “AVANCES EN TÉCNICAS MOLECULARES EN MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS”

Moderador: Prof. Elías Rodríguez Ferri, *Universidad de León*

1. “Estrategias de detección y cuantificación de microorganismos patógenos de origen alimentario por PCR”. Prof. Rosa Aznar, *Universidad de Valencia*.
2. “Taxonomía procariota: una disciplina necesaria y pragmática”. Dra. María del Carmen Macián, *CECT, Valencia*.
3. “Nuevas perspectivas en ecología microbiana usando técnicas moleculares”. Prof. Jesús García-Gil, *Universidad de Gerona*.
4. “Molecular detection and typing facilitating the elucidation of a recent Austrian episode of Listeriosis”. Prof. Martin Wagner, *University of Veterinary Medicine, Viena, Austria*.

MESA REDONDA III. “LA MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS MÁS ALLÁ DE LOS PATÓGENOS ALIMENTARIOS”

Moderador: Prof. Juan Ignacio Reguera, *Universidad de Burgos*

1. “El tracto gastrointestinal como fuente de microorganismos funcionales”. Dr. Baltasar Mayo, *IPLA-CSIC, Asturias*.
2. “Proteínas antifúngicas de ascómetos para controlar el desarrollo de mohos toxigénicos en alimentos”. Prof. Miguel Ángel Asensio, *Universidad de Extremadura, Cáceres*.

3. “Microbiota de quesos artesanales andaluces”. Prof. Manuel Martínez-Bueno, *Universidad de Granada*.

4. “La metagenómica aplicada al estudio de una alteración del queso: la hinchazón tardía”. Dra. Marta Hernández Pérez, *ITACyL, Valladolid*.

MESA REDONDA IV. “TEMAS EMERGENTES EN SEGURIDAD ALIMENTARIA”

Moderador: Prof. Albert Bosch Navarro, *Universidad de Barcelona*

1. “Nuevos enfoques para la gestión de la Seguridad Alimentaria”. Prof. Gonzalo Zurera, *Universidad de Córdoba*.
2. “Ecología de la resistencia a antimicrobianos: del medio ambiente al hospital”. Prof. Bruno González Zorn, *Universidad Complutense de Madrid*.
3. “Nuevas técnicas de eliminación de virus en alimentos”. Dra. Nerea Bequiristain, *Universidad de Barcelona*.
4. “Modelización de la inactivación de *Listeria monocytogenes* por altas presiones hidrostáticas en jamón curado”. Dra. Sara Bover-Cid, *IRTA, Monells, Gerona*.

CONFERENCIA DE CLAUSURA: A impartir por el Premio CASCAJARES 2010, con temática por determinar

Constituye una novedad de este Congreso la celebración de un **SYMPOSIUM CIENCIA-EMPRESA**. En él, D. Carlos Ignacio Franco Alonso, del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), pronunciará la conferencia “Financiación pública nacional a la I+D+i en agroalimentación a través de Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial”, y debatirá con los empresarios y demás asistentes sobre los pormenores de las líneas públicas de financiación existentes para los trabajos de I+D+i de las empresas, realizados en solitario o en colaboración con Universidades y Organismos y Centros Públicos de Investigación.

Para más información sobre el Congreso puede consultarse la página web del mismo en la dirección <http://www.microalimentos-valladolid2010.com>.

Docencia y difusión de la Microbiología



Montserrat Llagostera
Presidenta de la Comisión Gestora
Grupo de Docencia y Difusión de la Microbiología

En la reunión del 29 de Enero de 2010, la Junta Directiva de nuestra sociedad aprobó la creación de un nuevo grupo especializado, denominado **Grupo de Docencia y Difusión de la Microbiología (D+D SEM)**. Con este acuerdo se hacía realidad lo que en diversas ocasiones ya habían planteado diferentes miembros de la SEM: “La necesidad de dirigir la atención de nuestra sociedad a la problemática de la docencia y también a la de la difusión de la Microbiología”.

Todos somos conscientes de que estamos viviendo tiempos de profundos cambios en nuestras universidades y de que la Microbiología está cada vez más presente en nuestra sociedad. Por ello, diversos miembros de la SEM creímos que había llegado el momento de unir nuestras fuerzas para responder a los retos que actualmente tenemos planteados en docencia y difusión de la Microbiología. El grupo **D+D SEM** pretende ser un marco de referencia que nos ayude a superar con éxito estos retos, a través del intercambio y discusión de experiencias y materiales docentes a la vez que trabajáramos para promocionar la difusión de la Microbiología en nuestra sociedad. La propuesta fue presentada por nuestro presidente en la Asamblea General de la SEM, celebrada en Almería en Octubre de 2009, y tras ser avalada por más de cien firmas fue aprobada en la reunión antes mencionada de nuestra Junta Directiva. En dicha reunión se me encargó la tarea de comenzar a formar este grupo y, cumpliendo con nuestros estatutos, me he dedicado durante dos meses a formar la **Comisión Gestora del Grupo**.

Este nuevo grupo especializado nace con una clara vocación transversal e integradora. Por ello, he intentado que en la Comisión estuvieran representados todos nuestros grupos especializados y también que la representa-

ción territorial fuera lo más amplia posible. Así, la Comisión Gestora está integrada por los siguientes miembros. Mercedes Berlanga (*Universitat de Barcelona*), Ana M. García Ruiz (Universidad Politécnica de Madrid), Tomás González Villa (Universidad de Santiago), Juan Carlos Gutiérrez (Universidad Complutense de Madrid), Maite Iriarte (Universidad de Navarra), Víctor Jiménez Cid (Universidad Complutense de Madrid), Montserrat Llagostera (*Universitat Autònoma de Barcelona*), Balbina Nogales (*Universitat de les Illes Balears*), Emilia Quesada (Universidad de Granada), Rafael Rotger (Universidad Complutense de Madrid), Juan Ignacio Reguera (Universidad de Burgos), Teresa Soto (Universidad de Murcia), Juan Evaristo Suárez (Universidad de Oviedo), Antonio Ventosa (Universidad de Sevilla) y Antonio de Vicente (Universidad de Málaga). Espero que en un plazo breve de tiempo se incorpore alguien del País Vasco y también de Levante así como algún miembro del grupo de Hongos Filamentosos y Levaduras. Las gestiones están ya hechas para que ello sea posible.

Desde estas líneas he de agradecer la buena disposición de todos los miembros de la SEM con los que he contactado para poder formar esta Comisión, así como el apoyo de muchas personas que, por múltiples razones, no han podido formar parte de dicha comisión pero que me han ofrecido su opinión, orientación y apoyo.

Me es grato informaros que el grupo ya ha comenzado a funcionar. La **Comisión Gestora** se constituyó en la reunión que tuvo lugar recientemente en Sevilla el pasado 8 de Abril. En dicha reunión se discutió sobre los principios en los que debe fundamentarse el grupo, sobre sus objetivos y ya se crearon grupos de trabajo para comenzar a abordar algunos de los objetivos propuestos.

Nuestros **objetivos concretos** son los siguientes:



Comisión gestora. *Fila superior:* Víctor J. Cid, Juan Ignacio Reguera Useros, Emilia Quesada, Juan Carlos Gutiérrez. *Fila media:* Rafael Rotger, Mercedes Berlanga y Jordi Urmeneta. *Fila inferior:* Ana M. García, Montserrat Llagostera, Antonio de Vicente, Balbina Nogales y Antonio Ventosa.

GENERALES

- Promover la elaboración e intercambio de recursos y materiales de docencia y difusión de la Microbiología de forma abierta.
- Organizar reuniones periódicas bienales del grupo y en el marco de los congresos de la SEM.

DOCENTES

- Elaborar el mapa de la oferta docente en Microbiología de las universidades españolas.
- Definir un conjunto de contenidos y competencias básicas de Microbiología a nivel de estudios de grado.
- Promover un foro de discusión sobre cuestiones docentes abierto a los miembros de la SEM.
- Colaborar en la organización de los Cursos de Iniciación a la Microbiología.

DE DIFUSIÓN

- Analizar la difusión de temas relacionados con la Microbiología en los medios de comunicación e incidir en la rigurosidad de dicha información.

- Organizar y participar en actividades de difusión de la Microbiología.
- Crear un “Rincón lúdico de la Microbiología”.

Abordar todos estos objetivos es hoy por hoy una tarea casi imposible, por ello, la Comisión Gestora decidió crear en un inicio siete grupos de trabajo que se centraran en algunos de dichos objetivos. Seguidamente os indico los grupos de trabajo, así como la persona responsable de cada uno de ellos:

- El mapa docente de la Microbiología española. Responsable: Mercedes Llagostera (montserrat.llagostera@uab.cat).
- Coordinación de recursos docentes. Responsable: Víctor Jiménez Cid (vicjid@farm.ucm.es).
- Archivo gráfico. Responsable: Rafael Rotger (rrotger@farm.ucm.es).
- Radio SEM: El mundo de los microbios. Responsable: Emilia Quesada (equesada@ugr.es).
- Microbiología en los medios. Responsable: Juan Carlos Gutiérrez (juancar@bio.ucm.es).
- El foro microbiano. Responsable: Pendiente de designar.
- La web del grupo. Responsable: Jordi Urmeneta (webmaster@semicro.es).



Jornadas. Un aspecto de la reunión de la Comisión Gestora del Grupo en Sevilla.

Como muestra de lo que podemos hacer, aprovechando que la mayoría de los miembros de la Comisión Gestora estaban en Sevilla, Antonio Ventosa tuvo la iniciativa de organizar las I Jornadas de Innovación Docente en Microbiología, conjuntamente con la Comisión Gestora y el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla. Dichas Jornadas, realizadas el 9 de Abril, contaron con las sesiones “Experiencias en la enseñanza de la Microbiología” y “Nuevos retos de la docencia de la Microbiología” en las que participaron diferentes ponentes tanto del grupo D+D SEM como del Departamento. El intercambio de experiencias fue ciertamente enriquecedor, señalándonos claramente un camino a seguir. En vista del éxito de esta iniciativa es probable que durante este año se organicen nuevas jornadas de innovación docente en Granada, Madrid y Barcelona. Animamos a los microbiólogos del grupo D+D SEM a que trabajen para celebrar Jornadas de Innovación Docente en Microbiología por sectores, las cuales pueden servir de “proteína de nucleación” de los microbiólogos interesados en estos temas, además de promover el intercambio de experiencias entre los microbiólo-

gos comprometidos con la docencia y geográficamente próximos. Espero recibir vuestras propuestas al respecto para que desde el grupo D+D SEM os demos todo nuestro apoyo.

Ahora que ya sabéis cuáles son nuestros objetivos y nuestras metas más inmediatas, os animo a que os inscribáis a nuestro grupo. Para ello, debéis enviar un correo electrónico a la secretaría de la SEM (secretaria.sem@semicro.es), solicitando vuestra adscripción e indicando vuestro compromiso de abonar la cuota de 3 € anuales a partir del próximo año.

No sólo os invitamos a inscribiros, necesitamos contar con vuestra participación en los grupos de trabajo, que nos deis a conocer vuestras actividades en el ámbito de la docencia y la difusión de la Microbiología y que nos propongáis iniciativas al respecto. Por ello, os pido contactéis con los responsables de los grupos de trabajo y que me comunicéis todas vuestras iniciativas y sugerencias relacionadas con la docencia y la difusión de la Microbiología. Estamos convencidos de que el éxito de este grupo depende de la participación de cada uno de los miembros de la SEM en la medida de sus posibilidades.

Lípidos polares de arqueas halófilas: elaboración y estudio de arqueosomas como sistema de vehiculización de antioxidantes naturales obtenidos de alpeorujó

Ana González Paredes

Directores: Mercedes Monteoliva Sánchez, Alberto Ramos Cormenzana y Adolfinia Ruiz Martínez.

Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

Para la realización de esta tesis doctoral se han utilizado lípidos polares de la arquea halófila *Halobacterium salinarum* CECT 396 con el fin de elaborar liposomas (arqueosomas) para la encapsulación de un extracto fenólico con probada actividad antioxidante, el cual se obtuvo de alpeorujó, residuo resultante de la elaboración del aceite de oliva.

Uno de los rasgos bioquímicos más característico de las arqueas es la estructura de sus lípidos de membrana, estructura química que confiere a estos lípidos una mayor resistencia frente a la oxidación, hidrólisis química y ataque de esterases en comparación con los lípidos presentes en las membranas de los organismos que no pertenecen a este Dominio, lo que hace de los primeros una excelente materia prima para su utilización en la elaboración de unos particulares liposomas denominados arqueosomas. Los liposomas, como sistema para la vectorización o vehiculización de sustancias activas, son ampliamente utilizados en la actualidad para la aplicación tópica tanto de fármacos como de activos cosméticos.

Así, en esta tesis doctoral se ha estudiado el contenido fenólico y la actividad antioxidante de extractos preparados a partir de muestras de alpeorujó procedentes de tres variedades de aceituna (picudo, picual y hojiblanca), siendo la muestra procedente de la variedad picual la que presentó mayor contenido fenólico, así como mayor actividad antioxidante, por lo que se seleccionó éste como sustrato para la obtención de los compuestos fenólicos a encapsular.

Se elaboraron diferentes formulaciones de arqueosomas en función de la concentración de lípido y proporción molar de colesterol utilizada y, con fines comparativos, se elaboraron formulaciones de liposomas convencionales de fosfatidilcolina análogas a las primeras. La caracterización de las vesículas se realizó determinando el diámetro medio de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta, eficiencia de encapsulación y actividad antioxidante. La estabilidad de las formulaciones fue evaluada durante tres meses mediante la determinación de estos parámetros.

Las formulaciones con proporción molar lípido/colesterol 1:0,5 mostraron el menor diámetro medio de partícula y, en general, los arqueosomas presentaron diámetros e índices de polidispersión ligeramente superiores a los de liposomas convencionales. Además estos parámetros

se mantuvieron constantes, prácticamente en todas las formulaciones, durante el tiempo que duró el estudio de estabilidad.

El potencial zeta fue negativo en todas las formulaciones, siendo significativamente mayor en los arqueosomas.

La eficiencia de encapsulación de los arqueosomas fue mayor que la de los liposomas convencionales, y las formulaciones que fueron más estables en el tiempo con respecto a este parámetro fueron las que contenían una proporción molar lípido/colesterol 1:1. La actividad antioxidante de todas las formulaciones fue muy elevada, manteniéndose constante hasta la finalización del estudio de estabilidad.

Tras el estudio de caracterización y estabilidad de las formulaciones se llevaron a cabo estudios de toxicidad *in vitro*, tanto del extracto fenólico como de algunas de las formulaciones liposomiales elaboradas. El extracto fenólico mostró actividad antiproliferativa en la línea celular ensayada, actividad que se potenciaba enormemente al incorporar el extracto fenólico dentro de las vesículas, tanto en arqueosomas como en liposomas convencionales. Utilizando vesículas vacías se observó que la toxicidad de los arqueosomas era significativamente inferior a la de los liposomas convencionales.

Por último se evaluaron diferentes excipientes (carbopol 940, pluronic 720 y excipiente cetílico) para proporcionar a las vesículas elaboradas una forma farmacéutica para la aplicación tópica, y se investigó la liberación *in vitro* de la sustancia activa desde dichas formas farmacéuticas. Los arqueosomas, tanto en gel de carbopol como de pluronic, cedieron la sustancia activa de forma gradual durante 8 h. En el caso de los liposomas convencionales sólo el gel de carbopol fue efectivo para la incorporación de los mismos.

Por todas estas características los arqueosomas se presentan como un ventajoso sistema para la vehiculización de fármacos y sustancias activas.

Taxonomía y epidemiología del género *Aeromonas*

Anabel Alperi Vega

Directores: M^a José Figueras Salvat y Antonio Martínez-Murcia.

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat Rovira i Virgili.

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral se ha establecido la presencia de variabilidad interoperónica en el gen ARNr 16S de *Aeromonas* y observado que, aunque menos del 1% de las posiciones (1503 pb secuenciados) eran polifórmicas, esta variabilidad afectaba a la taxonomía del género, limitando la identificación de *A. caviae*, *A. media* y *A. veronii*. La secuenciación del gen *rpoD* permitió identificar las cepas con variabilidad interoperónica a nivel de especie y además reconocer 5 nuevas especies dentro del género: *A. fluvialis*, *A. taiwanensis*, *A. sanarelii*, *A. piscicola* y *A. rivuli*. Estas 5 especies se caracterizaron mediante un estudio polifásico que com-

prendía un amplio análisis fenotípico, un análisis filogenético del gen ARNr 16S y de 5 genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* y *gyrA*) y el grado de similitud, con las especies más cercanas, mediante hibridación ADN-ADN. La puesta a punto de esta última técnica, sólo disponible en muy pocos laboratorios, constituyó unos de los objetivos de la presente tesis doctoral. Asimismo, se han descrito los primeros aislados de *A. aquariorum* de origen extraintestinal en colaboración con el Hospital Nacional Cheng Kung (Taiwán) y Hospital Comarcal Vega Baja (Orihuela). También se ha descrito, en colaboración con el Hospital Royo Vilanova de Zaragoza, el segundo caso en adultos de síndrome urémico hemolítico (SUH) asociado a *Aeromonas*. Se ha podido demostrar la presencia en este género del gen *stx2* que codifica para la toxina Shiga tipo 2 asociada al SUH, se han obtenido por primera vez secuencias parciales de los genes *stx1* y *stx2* de *Aeromonas* y demostrado una alta similitud entre dichas secuencias parciales de los genes *stx2* y *stx1* de *Aeromonas* con las variantes más patogénicas para humanos de *E. coli* productoras de toxinas Shiga. Se han revisado las características clínicas y microbiológicas de las infecciones de herida quirúrgica en las que ha estado implicada *Aeromonas*, en colaboración con el Hospital General de Guadalajara y el Hospital Royo Vilanova de Zaragoza. Finalmente, se ha descrito el primer caso de inducción *in vivo* de resistencia al imipenem en una cepa de *A. veronii* bv sobria en colaboración con el Hospital Clínic de Barcelona y el Hospital Royo Vilanova de Zaragoza. Finalmente, los resultados de esta tesis han dado lugar o contribuido a la publicación de 13 artículos científicos en revistas internacionales.

Bacterial dispersal on airborne Saharan dust particles. Survival and colonization of alpine lakes in the Limnological Observatory of the Pyrenees

Anna Hervas Busquets

Director: Emilio Ortega Casamayor. Centro de Estudios Avanzados de Blanes-CSIC, Centro presentación: Universitat Autònoma de Barcelona.

La formación de plumas de polvo atmosférico de origen desértico y su deposición en zonas remotas es un hecho conocido en los últimos años acrecentado por fenómenos ligados al cambio global. Estas plumas atmosféricas transportan nutrientes, tóxicos y microorganismos a miles de kilómetros de distancia. Sus efectos globales se han empezado a explorar en los últimos años. Los nutrientes aerotransportados tienen efectos fertilizantes remotos sobre comunidades de plantas y microorganismos acuáticos como han constatado estudios recientes. La comunidad de bacterias aerotransportadas, en cambio, resulta más desconocida y aunque ha sido explorada median-

te técnicas tradicionales de cultivo y de análisis genético, todavía se sabe muy poco acerca de su composición y de su viabilidad y capacidad de colonización. En esta tesis doctoral hemos abordado aspectos relacionados con la viabilidad y capacidad colonizadora de las bacterias aerotransportadas, utilizando como sistemas modelo lagos de alta montaña situados en el Observatorio Limnológico de los Pirineos. Este tipo de lagos son excelentes sensores de cambios ambientales por su condición de oligotrofia extrema y su localización aislada. Además, se encuentran presentes en todas las latitudes del planeta permitiendo la extrapolación de estos estudios locales a una escala global. Hemos explorado la interfase aire-agua de estos sistemas confirmando que el neuston (comunidad biológica encontrada en la interfase) actúa como un buen sensor de las entradas de bacterias alóctonas presentes en aerosoles de origen sahariano. Mediante experimentos de enriquecimiento en microcosmos utilizando polvo de diferentes fuentes (de arenas en Mauritania y aerosoles recogidos en colectores atmosféricos situados en Pirineos), hemos identificado cinco tipos diferentes de bacterias según su biogeografía, desde bacterias cosmopolitas aerotransportadas capaces de colonizar ambientes acuáticos remotos (*Airborne-betaproteobacteria*), hasta *clusters* no aerotransportados endémicos de agua dulce dentro de los phyla *Betaproteobacteria* y *Bacteroidetes*. Además, se han detectado filotipos del género *Acinetobacter* de amplia distribución que de manera recurrente colonizan estos ambientes remotos pero sin llegar a establecerse como miembros dominantes de la comunidad. Hemos comprobado que las entradas de polvo sahariano afectan directamente a la dinámica temporal de las poblaciones lacustres de *Gamma*-y *Betaproteobacteria* pero no a la de *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. Finalmente, en un estudio cubriendo parte de la variabilidad altitudinal dentro del Observatorio, hemos constatado la capacidad colonizadora de ciertas bacterias aerotransportadas de origen africano en lagos de Pirineos.

Corrección del modelo de Bigelow. Aplicación en el cálculo de los efectos de cocción y de esterilización sobre *Bacillus coagulans* en una conserva de judías verdes (*Phaseolus vulgaris* var. *Helda*)

Agustín León Alonso-Cortés

Director: Juan Ignacio Reguera

Usuarios.

Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (Palencia).

En este trabajo se calcularon los efectos de cocción y de esterilización sobre *Bacillus coagulans* en una conserva de judías verdes extrafinas de la variedad *Helda*, sobre la que se aplicaron una serie de tratamientos térmicos a las temperaturas de

105, 107, 110 y 115 °C, durante tiempos comprendidos entre 3 y 35 min. De éstos se seleccionaron los que consiguieron con mayor exactitud los efectos ideales previamente establecidos de $n = 1,09$ para el efecto de cocción y $n = 5$ para el efecto de esterilización sobre *Bacillus coagulans*.

Los tratamientos seleccionados fueron los aplicados a la temperatura de 115 °C a los tiempos de 10 y 20 min. El primero consiguió un efecto de cocción de $n = 1,11$ y un efecto estimado de esterilización sobre *B. coagulans* comprendido entre 2,23 y 4,65; y el segundo un efecto estimado de esterilización sobre *B. coagulans* más ajustado ($2,66 < n < 5,13$) y un efecto de cocción aceptable ($n = 1,15$)

Para evaluar los efectos de los tratamientos, primero se calcularon y analizaron la validez de las cinéticas térmicas necesarias y luego se cuantificaron por medio de un novedoso método estadístico basado en la corrección del modelo tradicional logarítmico de Bigelow.

Los valores de los parámetros termocinéticos y del test de exactitud de las cinéticas resultaron ser $D_{100} = 7,52$ min, $Z = 16$ °C y $A_f = 1,13$ para la cinética de cocción y $D_{121} = 0,0264$ min, $Z = 10,64$ °C y $A_f = 1,04$ para la cinética de termodestrucción de *B. coagulans*.

Con el método propuesto se consiguió disminuir el error de cuantificación del efecto de cocción desde el 1.200 % (obtenido con el modelo de Bigelow) al 3,11 % en el tratamiento de 115 °C durante 10 min y desde el 2.260 % al 9,46 % en el tratamiento de 115 °C - 20 min, resultando ser mayor el error cuanto mas alta fue la temperatura del tratamiento.

También se calcularon los efectos de los tratamientos sobre otros dos indicadores de calidad de las conservas de judías verdes: la inactivación térmica de la enzima peroxidasa y la cocción botulínica. No obstante, debido a que los test de exactitud de sus cinéticas resultaron ser superiores a 1,15 y por tanto, poco satisfactorios, el cálculo de los efectos estimados de los tratamientos sobre ambos indicadores se consideró de apoyo.

Teniendo en cuenta los efectos de los tratamientos sobre los mencionados indicadores de apoyo y el efecto estimado de esterilización sobre *B. coagulans*, el error cometido al cuantificar los tratamientos con el modelo de Bigelow resultó ser mayor cuanto menor fue el valor del tiempo de reducción decimal (D).

Taxonomía y epidemiología del género *Arcobacter*

Luis R. Collado González

Directora: María José Figueras.

Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat Rovira i Virgili.

Algunas de las especies del género *Arcobacter*, creado en el año 1991, han sido relacionadas con patología gastrointestinal en humanos y aborto, diarrea y mastitis en animales, sin embar-

go podríamos decir que su papel en patología humana y veterinaria es poco conocido. Uno de los problemas más importantes para la investigación de *Arcobacter* es la dificultad que entraña la identificación de las cepas a nivel de especie. Las técnicas de identificación molecular y la taxonomía de *Arcobacter* han sido desarrolladas en base al análisis de los genes ribosomales, siendo escasos los estudios que investigan la utilidad de los genes que codifican funciones esenciales o "housekeeping". Por otra parte, las rutas de transmisión de *Arcobacter* aun no están muy claras. A pesar de que se ha sugerido que las aguas contaminadas pueden ser una de estas rutas de transmisión, aun no ha sido investigado si este microorganismo es autóctono del agua o si es un contaminante. Además, no ha sido investigado si el tratamiento para la producción de agua potable es efectivo para la eliminación de *Arcobacter*. Los alimentos cárnicos y derivados, son otras de las vías de transmisión sugeridas para *Arcobacter*. Sin embargo, hasta la fecha los estudios se han concentrados en determinar la prevalencia de esta bacteria en carnes de aves de corral, de cerdo y de vacuno, existiendo pocos estudios en otros tipos de carne, como también en mariscos. El objetivo general de esta tesis ha sido determinar la prevalencia de las especies de *Arcobacter* en muestras de aguas de distintos orígenes y en alimentos para ello hemos desarrollado una técnica de identificación basada en los patrones de restricción obtenidos tras la digestión del gen ribosomal (16S rDNA-RFLP). Esta técnica además de ser rápida y barata, es el único método que permite la caracterización de todas las especies descritas hasta el año 2008. Esta técnica la hemos utilizado para identificar 600 aislamientos de *Arcobacter*, algunos de los cuales han mostrado nuevos patrones de restricción, lo que nos ha permitido reconocer una nueva especie (*A. mytili*) y otras cuatro especies nuevas, las cuales están en proceso de ser descritas formalmente.

El uso del 16S rDNA-RFLP en paralelo con una PCR múltiple o m-PCR (la cual ha sido desde el año 2000 y hasta el momento, la técnica más utilizada para la identificación de *Arcobacter*), ha revelado que esta m-PCR puede producir identificaciones erróneas. Por lo cual hemos propuesto utilizar ambos métodos en paralelo para conseguir una correcta identificación. Los resultados incongruentes entre estos dos métodos nos ha llevado a identificar los primeros aislamientos desde su descripción en el 2009 de *Arcobacter theireus*, y nos permitieron reconocer otra nueva especie, *A. valdiviensis*, aislado de un hisopado cloacal de gallina en la ciudad de Valdivia, Chile.

Por otra parte, hemos demostrado que la presencia de *Arcobacter* en aguas costeras, lagos, ríos y residuales se correlaciona significativamente con la presencia altos niveles de contaminación fecal, y que estos microorganismos entran en el mar a través de los aportes de aguas dulces contaminadas fecalmente con heces de origen animal y/o humano, a pesar de especies como *A. halophilus* y *A. marinus*, no aisladas hasta la fecha en otros habitats, puedan tener un origen acuático. También hemos realizado el primer estudio para investigar la diversidad genética en aislamientos de *Arcobacter* obtenidos de muestras de agua, investigando su prevalencia en el río Llo-

bregat (una de las principales fuentes de producción de agua potable del área metropolitana de Barcelona), demostrando que las especies *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* presentan una alta prevalencia y diversidad genética. Sin embargo, estos microorganismos nunca fueron detectadas en el agua del río potabilizada, lo que indica que el tratamiento al que se somete el agua es efectivo para su eliminación.

También se ha demostrado que *Arcobacter* presenta una elevada prevalencia en diferentes tipos de carnes (pollo, vacuno, cerdo, conejo, pavo y pato), además de mariscos (mejillones y almejas). Considerando que los mariscos puedan ser considerados como otra potencial ruta de transmisión.

Finalmente hemos empleado por primera vez para el género *Arcobacter*, los genes *rpoB* y *gyrB* para establecer las relaciones filogenéticas de las nuevas especies con las actualmente aceptadas y hemos comprobado que estos genes son de gran utilidad.

Mecanismo molecular del control por fosfato de la cascada de expresión de los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces coelicolor*

Fernando Santos Beneit

Directores: **Juan Francisco Martín Martín y Antonio Rodríguez García.**
Instituto de Biotecnología de León,
Universidad de León.

Indudablemente, el descubrimiento de los antibióticos representa uno de los hechos más importantes para la salud humana del siglo XX. Más de la mitad de los antibióticos conocidos hoy en día son producidos por bacterias pertenecientes al género *Streptomyces*. El auge de los antibióticos se ha correspondido con un claro incremento de la esperanza de vida y con un control casi total de las enfermedades bacteriológicas. Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos moleculares que regulan la producción de estos antibióticos.

En esta tesis se ha utilizado *Streptomyces coelicolor* como organismo modelo del género *Streptomyces*. Las bacterias pertenecientes a este género producen también otros compuestos de gran interés como antifúngicos, antivirales, antiparásitos, herbicidas, antitumorales, inmunosupresores, inmunoestimuladores, anti-colesterolémicos, factores de crecimiento para plantas, inductores de la diferenciación celular en eucariotas, pigmentos, aromas, inhibidores enzimáticos, etc.

Generalmente la producción de estos metabolitos se regula por las condiciones nutricionales del medio en el que crecen estos microorganismos. Uno de los nutrientes más importantes en la regulación de estos procesos es el fosfato. Así, la mayoría de los antibióticos son reprimidos por concentraciones altas de dicho nutriente. No obs-

tante, la transducción de señales que va desde la detección de la concentración de fosfato en el medio hasta la regulación de la producción de antibióticos en cuestión es un proceso totalmente desconocido.

Para estudiar la regulación por fosfato en *Streptomyces* el trabajo de la tesis se ha centrado en la caracterización de los mecanismos reguladores ejercidos por el único sistema regulador descrito para tal fin, el regulón *pho*. Este sistema fue caracterizado por primera vez en la bacteria *Escherichia coli* y más tarde en *Streptomyces lividans*. Los resultados de la tesis aportan distintos mecanismos de regulación ejercidos por dicho sistema tanto en genes del metabolismo primario (relacionados principalmente con el metabolismo del fosfato), como en genes relacionados con otros procesos metabólicos como el del nitrógeno o el carbono. El punto más importante de la tesis ha sido la demostración de la involucración directa del sistema *phoRP* en la regulación del metabolismo secundario, concretamente en la regulación de un gen que controla la producción de antibióticos en *Streptomyces*, el gen *afsS*.

En resumen, el trabajo de la tesis describe por primera vez la conexión en la señalización de la escasez de un nutriente con la producción de antibióticos, y dilucida las bases del control por fosfato en bacterias de gran interés para la industria farmacéutica.

Compartimentalización de la biosíntesis de beta-lactamas y regulación de su secreción en *Acremonium chrysogenum*

Fernando Teijeira Romón

Directores: **Dr. D. Juan Francisco Martín Martín y Dr. D. Ricardo Vicente Ullán.**

Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) y Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León.

Acremonium chrysogenum es un hongo filamentoso imperfecto que ha sido utilizado a nivel industrial para la producción de cefalosporina C, a partir de la cuál se obtienen derivados semisintéticos con mayor bioactividad. La ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum* ha sido ampliamente estudiada, habiéndose clonado los genes y purificado las enzimas que participan. Sin embargo, se sabe poco acerca de la secreción de los diferentes intermediarios (uno de los cuales penicilina N es secretado en gran cantidad) y del producto final cefalosporina C. Aunque se pensaba que la ruta de biosíntesis de cefalosporina C transcurría en el citoplasma celular, evidencias recientes sugieren que, al menos, la etapa de epimerización de isopenicilina N en penicilina N se realiza en el interior de microcuerpos. Por este motivo, se buscan genes implicados en la secreción y en la regu-

lación de dicha secreción en el cluster temprano de biosíntesis de cefalosporina C. De esta forma, en este trabajo se han caracterizado los genes *cefM* y *cefR*. El gen *cefM* es esencial en la producción de cefalosporina C, puesto que su interrupción bloquea dicha producción. Los estudios tanto de inactivación dirigida como de localización *in vivo* mediante microscopía confocal de fluorescencia demostraron que la proteína CefM es una proteína de la membrana de microcuerpos que participa en la secreción de penicilina N desde el interior de microcuerpos hacia el citoplasma. Por otro lado, la sobreexpresión del gen *cefM* no constituye un paso limitante en la ruta biosintética de cefalosporina C.

En el cluster temprano de biosíntesis de cefalosporinas se encontró el gen *cefR*. Los estudios de inactivación dirigida del gen *cefR* junto con la sobreexpresión y el análisis de la expresión de los mutantes obtenidos demostraron que el gen *cefR* actúa como un represor de los genes de secreción *cefT* y *cefM*, ejerciendo efectos indirectos sobre los genes de biosíntesis *pcbC* y *cefEF* y sobre el gen de secreción *cefT3*. Además para complementar la mutación en el mutante interrumpido en el gen *cefR* son necesarios los genes *cefR* y *cefT3*, efecto que puede ser debido a la topología de esta región del genoma. El hecho de que tanto la inactivación dirigida del gen *cefM* como del gen *cefR* provoquen efectos fenotípicos en los mutantes relaciona a ambos genes con el metabolismo primario. Basándonos en estos resultados, se ha propuesto un modelo teórico de compartimentalización de la ruta de biosíntesis de cefalosporina C entre el citoplasma y el interior de microcuerpos (peroxisomas). En este sistema de secreción la proteína CefT3 está implicada en la entrada de la isopenicilina N al interior del microcuerpo, mientras que CefM participa en la secreción de penicilina N desde el interior de microcuerpos hacia el citoplasma. Por otro lado, la proteína CefT actúa como un exportador de diferentes intermediarios de la ruta (isopenicilina N, penicilina N y desacetilcefalosporina C) hacia el exterior celular y la proteína CefR se encuentra en el núcleo celular reprimiendo la expresión de los genes de secreción *cefM* y *cefT*.

Aplicación de las técnicas FISH, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación

Lucia Blasco Escrivá

Directores: **Isabel Pardo Cubillos y Sergi Ferrer Soler.**

Facultat de Ciències Biològiques,
Universitat de València.

El vino es el producto de la fermentación del mosto de uva y en esta transformación intervienen gran cantidad de microorganismos. Estos microorganismos pueden ser beneficiosos, como

S. cerevisiae y *O. oeni*, o perjudiciales como la gran mayoría de las bacterias lácticas (BL) y todas las bacterias acéticas (BA). La adopción de medidas de control tempranas que eviten las alteraciones microbianas durante el proceso de vinificación o crianza es necesaria para obtener un vino de calidad. Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo de una metodología rápida que permita detectar, identificar y cuantificar las BL y acéticas en el vino. Para ello se desarrollaron de sondas fluorescentes que fueron útiles para la detección, identificación y cuantificación de especie de BL y BA del vino mediante microscopía de fluorescencia. Además se desarrollaron cebadores específicos para detección mediante PCR específica de BA. Estas técnicas se compararon con otras descritas previamente como el 16S-ARDRA y tras evaluar estas técnicas moleculares en muestras de mosto y vino se procedió a aplicación de dichas técnicas en vinificaciones a nivel de laboratorio, planta piloto y nivel industrial llegando a la conclusión de la importancia de su utilidad para poder prevenir los posibles deterioros causados por el crecimiento de microorganismos como las BL o BA.

Impacto de los sistemas de reparación de lesiones producidas por agentes alquilantes en la virulencia de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

Gerard Àlvarez Juste

Directores: **Jordi Barbé García** y **Susana Campoy Sánchez**.

Departamento de Genética y de Microbiología, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona.

Salmonella enterica ser. *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) is an enteropathogen able to infect several mammalian species, generally causing mild diseases, such as gastroenteritis, although it can also become a systemic infection, producing septicaemia and even the death of the infected host.

Like other enterobacteria, the genome of *S. Typhimurium* codes for alkylation damage repair proteins. This kind of damage appears when alkylating agents, which are present in the environment or are produced endogenously as byproducts of normal metabolism, introduce alkyl groups in the DNA bases. Some of the most important genes coding for these proteins are *ada*, *alkA*, *alkB* and *aidB*, which generate the adaptive response to alkylation damage (known as the Ada response); and *ogt* and *tag*, which are not included in this response but possess similar functions. Other repair systems with a wider range of activities can also repair alkylation damage, being especially important the genes belonging to the *global genome repair* (GGR, which is carried

out by the UvrABC enzymatic complex) and the *transcription-coupled DNA repair* (TCR, focused on the transcriptionally active genes and directed by the Mfd protein, which recruits the UvrABC or the MutSL complexes) pathways of the nucleotide excision repair system (NER). Altogether compound a large variety of repair activities which allow the recognition of a broad diversity of targets generated by alkylating agents.

In order to establish the role of each of these genes and the consequences of their lack during the infection process, strains defective in one or several of them were constructed. Afterwards, each strain was treated with alkylating agents to analyze its survival. Although *S. Typhimurium* possesses so many alkylation damage repair proteins, in most strains the survival decreased due to the absence of just one or some of those proteins. Moreover, competitive assays using BALB/c mice were performed to determine the fitness of each strain. The results show that, even in those strains defective in several genes, the *in vivo* fitness of *S. Typhimurium* is not affected by the lack of most of the alkylation damage repair proteins studied, since only the strain UA1869 defective in the *ada*, *ogt*, *tag*, *uvrA*, and *mfd* genes presented a reduction of its virulence when it was orally inoculated. Therefore, the amount of alkylating agents generated in the organism might be lower than that used in the *in vitro* assays. Thus, the evolutionary conservation of the alkylation damage repair genes in *S. Typhimurium* may be due to survival outside the host.

The fact that the fitness decreased in the UA1869 strain and not in other mutants, some of them defective in a larger number of genes, suggests the existence of certain overlap between different repair systems. Thus, the absence of some repair proteins might be compensated by other belonging to other systems apparently different.

Genomic patterns and phenotypic plasticity in prokaryotes analyzed within an ecological framework

Juan Antonio García López

Director: **Emilio Ortega Casamayor**.
Centro de Estudios Avanzados de Blanes-CSIC, Universitat Autònoma de Barcelona.

La diversidad genómica de los microorganismos es resultado de la combinación de procesos evolutivos y de acontecimientos ecológicos. Así, la estructura específica de los genomas de bacterias es una consecuencia de la presión selectiva debida a interacciones entre microorganismos y ambiente a lo largo de la evolución. Estas evidencias hacen intuir que el DNA contiene más información estructural de lo que se esperaría mirando sólo la composición de las bases nucleotídicas. El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido desarrollar un marco teó-

rico basado en la geometría, la estadística y el modelado matemático para estudiar la relación entre estructura del genoma, estilo de vida y metabolismo de microorganismos procariontes. Para desvelar la relación entre la estructura del genoma y el estilo de vida, se han analizado cerca de 500 genomas mediante un método de física estadística que consigue reducir la complejidad genómica procarionte a un solo parámetro –la correlación intrínseca de largo alcance, que está relacionada directamente con la estructura fractal de la secuencia de DNA– que, además, puede ser utilizado en genómica comparativa y en estudios ecológicos. Los métodos escogidos para el estudio de las correlaciones de largo alcance en genomas han sido el *DNA walk* y el *Detrended Fluctuation Analysis* (DFA). El “paseo” de DNA es un método de geometría basado en una función derivada de la posición secuencial de cada nucleótido a lo largo de una secuencia de DNA. El “paseo” resultante es representativo del “paisaje” del DNA y permite la comparación simultánea entre diferentes genomas. El DFA proporciona un sencillo parámetro cuantitativo –el exponente de escala *alpha*– que representa las propiedades de correlación de una secuencia. La relación entre el estilo de vida y el metabolismo se ha examinado mediante un estudio de genómica comparativa de dos bacterias marinas que utilizan exclusivamente hidrocarburos como fuentes de carbono y energía en hábitats diferentes, *Alcanivorax borkumensis* y *Oleispira antártica*. Se han estudiado las bases genómicas de sus inusuales rasgos eco-fisiológicos para mejorar la comprensión de la influencia de temperatura sobre el crecimiento de bacterias basado en la degradación de hidrocarburos. Finalmente, se ha realizado una aproximación de genómica funcional utilizando el modelado matemático de la red metabólica codificada en el genoma de *Alcanivorax borkumensis* con el fin de profundizar en la relación entre la composición del genoma y el fenotipo metabólico. El conjunto de genes, proteínas, reacciones y metabolitos que participan en la actividad metabólica se ha identificado, clasificado e interconectado para reconstruir una red metabólica *in silico*. Dicha reconstrucción metabólica ha permitido, mediante el uso de métodos basados en la restricción de flujos y en el Análisis de Equilibrio de Flujo (FBA), caracterizar los peculiares rasgos ecofisiológicos de este microorganismo.

Caracterización de levaduras de interés en jamón ibérico mediante técnicas de ácidos nucleicos

María Jesús Andrade Gracia

Directores: **Juan José Córdoba Ramos** y **Mar Rodríguez Jovita**.
Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura.

En jamón ibérico hay un importante desarrollo de levaduras durante el proceso de madura-

ción. Las levaduras parecen tener un papel destacado en la génesis de compuestos volátiles contribuyentes al aroma de productos cárnicos madurados. Así, dentro de la población de levaduras que se desarrolla en el jamón ibérico se han identificado distintos biotipos de *Debaryomyces hansenii* con diferente capacidad de formación de compuestos volátiles. Estas diferencias, que pueden generar variaciones en el aroma de los productos, podrían estar vinculadas al lugar de procesado (Denominaciones de Origen Protegidas, D.O.P.) y/o a las etapas de maduración. Es pues, de gran interés caracterizar la población de levaduras en función del lugar de procesado y fase de maduración, evaluando además la capacidad de los biotipos para generar compuestos volátiles.

En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la eficiencia de diferentes técnicas de ácidos nucleicos (RFLP de las regiones ITS y 18S del ADN ribosómico, RAPD-PCR y RFLP del ADN mitocondrial) para la caracterización de levaduras aisladas de jamón ibérico. El método más adecuado se ha utilizado para diferenciar los biotipos que producen mayor cantidad y variedad de compuestos volátiles asociados al aroma a curado, tratando de diferenciar por área de procesado y fase de maduración. De todos los métodos ensayados, el RFLP del ADN mitocondrial permitió caracterizar a nivel de especie y cepa las levaduras aisladas de jamón ibérico. El RAPD-PCR permitió tipificar los biotipos previamente determinados mediante RFLP del ADN mitocondrial. Así, el uso conjunto del RFLP del ADN mitocondrial y del RAPD-PCR es recomendable para la selección de levaduras como cultivos iniciadores y el posterior control de su implantación.

Con el RFLP del ADN mitocondrial se encontraron 15 biotipos diferentes, que se adscribieron a *D. hansenii* y *Candida zeylanoides*, siendo la primera la predominante. La mayoría se detectaron en todas las D.O.P. Sin embargo, se detectaron biotipos exclusivos de algunas de D.O.P., lo que puede ser de gran utilidad como indicadores de procedencia geográfica. Además, el RFLP del ADN mitocondrial permitió observar diferencias en la cantidad y variedad de compuestos volátiles producidos en función del patrón de restricción de la especie y biotipo de levaduras. Así los aislados de *D. hansenii* mostraron mayor cantidad de compuestos volátiles relacionados con el aroma a curado que los de *C. zeylanoides*.

Además, se observaron diferencias relevantes en la producción de compuestos volátiles a lo largo del procesado de los biotipos diferenciados mediante RFLP del ADN mitocondrial y RAPD-PCR. Por consiguiente, ambas técnicas moleculares deberían aplicarse junto con la generación de compuestos volátiles en el medio de cultivo diseñado para la selección de levaduras como cultivos iniciadores en la industria cárnica.

Finalmente se evaluó la producción de compuestos volátiles de diferentes biotipos de *D. hansenii* en productos madurados (salchichón). Dos de los biotipos inoculados (E y C2) mostraron gran producción de compuestos volátiles en salchichón, por lo que pueden ser de gran utilidad como cultivos iniciadores en productos cárnicos.

Esta Tesis Doctoral ha sido desarrollada gracias a la financiación del proyecto del Ministerio

de Ciencia y Tecnología AGL2001-0804 y a la Beca Predoctoral para la Formación de Personal Investigador concedida a M^º Jesús Andrade Gracia.

De esta Tesis Doctoral se han derivado los siguientes artículos científicos publicados en revistas incluidas en Journal Citation Report:

1. Andrade y col. 2006: *International Journal of Food Microbiology* 107, 48-58.
2. Andrade y col. 2009: *Food Chemistry* 113, 457-463.
3. Andrade y col. 2009: *Food Microbiology* 26, 578-586.
4. Andrade y col. 2010: *Meat Science* 84, 377-383.
5. Andrade y col. 2010: *Meat Science* 85, 256-264.

Obtención de moléculas lineales de AS-48 que conserven la estructura tridimensional y la actividad biológica de la molécula nativa

Manuel Montalbán López

Directores: Mercedes Maqueda, Eva Valdivia y Manuel Martínez-Bueno.

Departamento de Microbiología, Universidad de Granada.

AS-48 es una bacteriocina circular de síntesis ARibosómica producida por diferentes especies de *Enterococcus*, constituida por cinco alfa hélices con un plegamiento de tipo saposina. AS-48 se sintetiza como un prepéptido que sufre la eliminación del péptido señal y la unión de los extremos por enlace peptídico para originar la molécula madura que posee una gran estabilidad y amplia actividad antibacteriana.

En este trabajo se ha planteado la linearización de AS-48 con el fin de estudiar cómo afecta la circularización a la estructura, actividad y estabilidad de la molécula. Para ello se generaron variantes lineales mediante proteólisis controlada con diversas enzimas. La termolisina, en condiciones parcialmente desnaturizantes, generó una forma abierta y dos fragmentos que mantenían la actividad en orden decreciente respecto a la molécula nativa. Se trataba de proteínas helicoidales, menos estructuradas en ambiente acuoso, pero similares a la nativa cuando se adicionaba dodecil sulfato sódico. Se demostró que la circularización no es esencial para la actividad de AS-48 aunque contribuye a mantener la estabilidad y actividad de la proteína.

Por ello, se planteó la apertura de AS-48 por la propia unión cabeza cola y por las dos regiones más extensas que conectan hélices. Se realizó permutación circular en el gen y se empleó *Escherichia coli* como hospedador. En ningún caso fue posible la detección de las moléculas abiertas en las condiciones ensayadas, ni en las diversas cepas usadas (deficientes en proteasas y enriquecidas en ARN para codones raros). El análisis

transcripcional mostró niveles adecuados de los respectivos ARNm, por lo que la proteólisis en la célula puede ser la explicación más plausible.

Estos genes fueron también fusionados al extremo carboxilo de la proteína LytA de *Streptococcus pneumoniae* logrando así la producción de ambas moléculas reconocidas por anticuerpos específicos. La optimización del corte con el enzima específico generó fragmentos activos cuyos tamaños no se correspondían con los esperados. El resultado fueron proteínas químicas que mantenían parte de la etiqueta fusionada -según se demostró por espectrometría de masas y western blot- y la actividad antibacteriana.

También se han construido genes que codifican las proteínas obtenidas por proteólisis y su expresión se ha ensayado en *Lactococcus lactis* fusionadas a señales de secreción junto a los genes responsables del exporte, bajo un promotor inducible con nisina. Sin embargo no ha sido posible su obtención, a pesar de que los determinantes de resistencia frente a AS-48, que también habían sido clonados, fueron eficientemente expresados en esta bacteria.

Análisis de secuencias multilocus en estudios de taxonomía, filogenia y evolución de *Pseudomonas*

María Magdalena Mulet Pol

Directora: Elena García-Valdés Pukkitts.

Dep. de Biología, Facultad de Ciencias, Universitat de les Illes Balears.

El género *Pseudomonas* está compuesto por un número elevado de especies metabólicamente muy versátiles. En la actualidad hay 120 especies reconocidas y se describen continuamente nuevas especies.

El método actualmente aceptado para discriminar entre especies bacterianas es la hibridación DNA-DNA, pero este método tiene sus limitaciones (tiempo requerido, necesidad de experiencia en desarrollo, no define distancias entre especies, no es acumulativo). En esta tesis se ha propuesto un nuevo método, fiable y acumulativo para la definición de especies en el género *Pseudomonas*, basado en la técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA). La enorme diversidad genética de las especies de este género la hacen un banco de pruebas ideal en el que se pueden validar nuevos métodos. La técnica de MLSA permite además elucidar la diversidad genética del género, su filogenia y su taxonomía. Además, se han creado nuevas herramientas bioinformáticas, y el conjunto de datos es accesible a través de Internet (PseudoMLSA Database).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

Se ha establecido la filogenia del género *Pseudomonas* basada en los genes: 16S rRNA,

gyrB, *rpoB* y *rpoD*. Pueden distinguirse 2 grandes linajes: *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*. El linaje *P. fluorescens* con 6 grupos: *P. anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. straminea* y *P. syringae* y el linaje *P. aeruginosa* con 3 grupos: *P. aeruginosa*, *P. oleovorans* y *P. stutzeri*. Otras cepas tipo no se afilian a ningún linaje y aparecen en ramas independientes: el grupo *P. oryzihabitans* y las cepas tipo *P. luteola*, *P. pachastrellae* y *P. pertucingena*.

El análisis del concatenado de los cuatro genes se presenta como una metodología de gran valor para la adscripción a especies de nuevas cepas de *Pseudomonas*.

El gen *rpoD* posee un poder de discriminación superior al de los otros genes estudiados en las 107 cepas de *Pseudomonas*; seguida de los genes *gyrB* y *rpoB*.

Los cebadores del gen *rpoD* diseñados y evaluados en este estudio, Ps30EG/Ps790EG, son selectivos para la detección de *Pseudomonas*. Estos cebadores pueden ser combinados en una PCR anidada ("nested PCR") para incrementar la sensibilidad en la detección de *Pseudomonas* en muestras ambientales cuando éstas se encuentran presentes en bajo número.

La base de datos PseudoMLSA (www.uib.es/microbiologiaBD/Welcome.php) permite integrar y vincular los diferentes tipos de información disponible sobre el género *Pseudomonas*. Esta es una herramienta útil para el análisis de secuencias multilocus, y para la identificación y caracterización de nuevos aislamientos de *Pseudomonas*.

Se ha podido restringir el análisis de secuencias multilocus (MLSA) a tres genes (16S rRNA, *gyrB* y *rpoD*) para diferenciar las 18 genomovares de *P. stutzeri* descritas en la actualidad. El MLSA es un método válido para asignar nuevas cepas a genomovares ya existentes, o para detectar otras nuevas. La cepa CCUG 46542 ha sido asignada como una nueva genomovar (gv19).

Intestinal microbiology in Crohn's disease: A study of *Escherichia coli* as a potential etiologic agent

Margarita Martínez Medina

Director: **Librado Jesús García Gil**.
Universitat de Girona.

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica que puede afectar a hombres y mujeres de distintas edades. La prevalencia e incidencia son mayores en países desarrollados, diagnosticándose en España unos 2.000 casos nuevos cada año. Los síntomas principales son la presencia de diarrea, a menudo con sangre, dolor abdominal y pérdida de peso, además de múltiples complicaciones y manifestaciones extraintestinales. A pesar de la intensa investigación realizada, la etiología de la enfermedad de Crohn se desconoce todavía. Se han implicado tanto factores genéticos e inmunológicos, que confieren susceptibilidad al individuo, como factores externos o ambien-

tales, incluyendo la microbiota intestinal y/o el estilo de vida.

El objetivo principal de la tesis fue describir las poblaciones bacterianas especialmente asociadas a los enfermos de Crohn, con la intención de identificar posibles agentes etiológicos. Para ello, comenzamos analizando la composición global de la comunidad bacteriana presente en la mucosa intestinal utilizando métodos moleculares. Este primer estudio permitió identificar qué especies se hallaban más frecuentemente en enfermos de Crohn (CD) respecto a individuos control (C), siendo *Escherichia coli* una de las especies bacterianas que se asoció a dicha enfermedad. A pesar de que *E. coli* es un microorganismo común del tracto intestinal, estudios previos realizados por otros investigadores ya apuntaban hacia este microorganismo como posible agente etiológico, en especial el patovar recientemente descrito 'adherent-invasive *E. coli* (AIEC)'. Por esta razón, el resto del trabajo se centró en el estudio de las poblaciones de *E. coli* asociadas a la mucosa intestinal.

El objetivo principal de la segunda parte del trabajo fue el de describir la riqueza, abundancia, diversidad y carácter patogénico de las poblaciones de *E. coli* y AIEC presentes en la mucosa intestinal. Para llevar a cabo este objetivo, se realizó el aislamiento de alrededor de 100 colonias de *E. coli* de la mucosa ileal y colónica de 20 pacientes de Crohn y 28 controles. Se utilizaron dos técnicas para analizar la clonalidad de los aislados, entre ellas la electroforesis en campo pulsado (PFGE). La identificación de cepas pertenecientes al patovar AIEC se realizó sobre 4314 aislados. Además, se determinó el serotipo, filogrupos, y genotipo (19 genes de virulencia) de los distintos subtipos de *E. coli* y AIEC obtenidos. A pesar de las similitudes de riqueza y diversidad de subtipos presentes en enfermos de Crohn e individuos control, la abundancia de *E. coli* era superior en enfermos de Crohn, especialmente en aquellos pacientes con afectación ileal ($P=0.001$). Se hallaron clones específicos de cada huésped, excluyendo la existencia de un clon o grupo clonal común entre los enfermos de Crohn. Las cepas compartían genes de virulencia característicos de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales, con una frecuencia similar en enfermos de Crohn y controles. En cambio, la prevalencia (% de individuos con AIEC: CD= 51.9%; C= 16.7%; $P=0.003$), la abundancia (% de AIEC/*E. coli*: CD= $3.8 \pm 5.0\%$; C= $1.5 \pm 3.8\%$; $P=0.039$) y la riqueza (número de subtipos de AIEC por paciente: CD= 0.8 ± 1.4 ; C= 0.2 ± 0.4 ; $P=0.015$) de AIEC era superior en enfermos de Crohn. Las cepas AIEC presentaron una gran variabilidad de serotipos y genotipos, pero el filogrupos B2 fue el más abundante entre ellas (AIEC: 64%; *E. coli* no-AIEC: 38%, $P=0.044$). Este es el quinto trabajo que describe la prevalencia de cepas AIEC en enfermos de Crohn, después de que el primero se publicase el año 2004. La exhaustiva aproximación metodológica utilizada permitió obtener valores de prevalencia más precisos, a la vez de obtener información acerca de parámetros ecológicos específicos del patovar AIEC, hasta el momento, no descritos. En general, los datos obtenidos en esta parte del trabajo apoyan la hipótesis que el patovar

AIEC está implicado en la enfermedad de Crohn. También se presentaron los estudios de caracterización de estas cepas AIEC y no-AIEC.

Los biofilms bacterianos que se encuentran en la mucosa intestinal se consideran importantes en la etiología y/o desarrollo de la enfermedad de Crohn. Por este motivo, determinamos la capacidad de formar biofilms de las cepas AIEC y compararlas con cepas no-AIEC. El índice de formación de biofilms fue contrastado con, además del fenotipo AIEC, el serotipo, el filogrupos y los genes de virulencia de las cepas. Fue interesante observar que las cepas AIEC presentaban índices de formación de biofilms superiores a las cepas no-AIEC ($P=0.007$) y que el 65.7% de cepas con una habilidad moderada-fuerte de formar biofilms eran AIEC. Además, los índices de adhesión ($P=0.009$) e invasión ($P=0.003$) se correlacionaban positivamente con la capacidad de formar biofilms. La motilidad (100%, $P<0.001$), el tipo de flagelina H1 (53.8%, $P<0.001$), los serogrupos O83 (19.2%, $P=0.008$) y O22 (26.9%, $P=0.001$), la presencia de genes de virulencia como *sfalfoCDE* (38.5%, $P=0.003$) e *ibeA* (26.9%, $P=0.017$), y el filogrupos B2 (80.8%, $P<0.001$) eran características frecuentes entre las cepas formadoras de biofilms. La principal contribución de esta parte del estudio fue describir la capacidad de formar biofilms *in vitro* como característica fenotípica asociada al patovar AIEC que podría tener implicaciones en la patogénesis de dicho patovar en la enfermedad de Crohn, ya sea confiriendo al patovar una colonización más estable de la mucosa, como confiriendo una protección contra agentes antimicrobianos, que conjuntamente podrían colaborar a que la infección sea crónica.

Dada la similitud observada en cuanto a los genes de virulencia entre el patovar AIEC y otras *E. coli* patógenas causantes de infecciones extraintestinales (ExPEC), también determinamos la frecuencia de cepas ExPEC con fenotipo AIEC y luego buscar si existe un origen filogenético común entre las cepas AIEC de origen intestinal y extraintestinal. La capacidad de adhesión, invasión y replicación en macrófagos de 63 cepas ExPEC se determinó mediante cultivos *in vitro* con células I407 y J774 para determinar el fenotipo AIEC. También se comparó la distribución de genes de virulencia (*papC*, *sfalfoCDE*, *afa/draBC*, *fimH*, *fimAv_{MT78}*, *hlyA*, *cnf1*, *cdt*, *iucD*, *neuC*, y *ibeA*) entre estas 63 cepas ExPEC (aisladas principalmente de casos de infección urinaria, sepsis y meningitis) y las 23 cepas AIEC intestinales. Se emplearon dos métodos para la determinar la relación genética entre las cepas AIEC intestinales y extraintestinales: PFGE y MLST (*Multilocus Sequence Typing*) secuenciando 7 genes de conservación de proteínas estructurales (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, y *recA*). Cabe destacar que solamente 4 (6.35%) cepas ExPEC, con serotipos O6:H1 (dos cepas), O83:H1 y O25:H4, presentaron fenotipo AIEC. Pero, interesantemente, se halló una relación genética entre éstas y otras AIEC de origen intestinal mediante MLST (ST73, ST135 y ST131 respectivamente). Este estudio ha permitido demostrar que la mayoría de cepas ExPEC no se comportan como AIEC, a pesar de la similitud genética que existe entre ambos patovares. Por lo tanto, se

confirma que el patovar AIEC es próximo al patovar ExPEC, pero posee características específicas relacionadas con su virulencia que, hasta el momento, solamente se pueden determinar fenotípicamente. Hacen falta estudios adicionales que tengan como objetivo identificar cuál es la maquinaria genética implicada en conferir el fenotipo AIEC.

Los resultados de este trabajo coinciden con investigaciones previas que describen la alteración bacteriana presente en enfermos de Crohn. Además, apoya la hipótesis que implica el patovar AIEC como agente etiológico de dicha enfermedad inflamatoria intestinal. Contribuimos también en la descripción de las poblaciones de *E. coli* asociadas tanto a la mucosa intestinal de individuos sanos como pacientes de Crohn aportando datos acerca de aspectos ecológicos y patogénicos de éstas, así como en la caracterización de cepas AIEC, hallando nuevos aspectos fenotípicos que podrían estar relacionados con su patogénesis.

Implicación de las envolturas celulares en el mecanismo de inactivación microbiana mediante tecnologías emergentes de conservación: desarrollo de procesos combinados

María Somolinos Lobera

Directores: **Rafael Pagán Tomás** y **Diego García Gonzalo**.

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

En la actualidad los consumidores demandan alimentos de gran calidad, seguros desde un punto de vista sanitario, mínimamente procesados y sanos.

Durante los últimos años se ha realizado un enorme esfuerzo investigador con objeto de poner a punto nuevos métodos de conservación de los alimentos, como los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) y las Altas Presiones Hidrostáticas (APH), capaces de inactivar los microorganismos sin causar alteraciones indeseables en las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos. Sin embargo, debido a las limitaciones de los equipos y a la gran resistencia de ciertas especies microbianas frente a estas tecnologías, se está trabajando en el desarrollo de procesos más complejos que, combinando diversas tecnologías, permitan lograr mayor estabilidad y seguridad de los alimentos sin detrimento de su calidad.

Para establecer una combinación inteligente de diversos métodos de conservación es necesario conocer con exactitud su mecanismo de inactivación. La existencia de daños subletales en las envolturas celulares normalmente es cla-

ve en el diseño de procesos de conservación basados en la combinación de estas tecnologías y conservantes químicos. Con objeto de evitar el uso de aditivos artificiales, en la actualidad se buscan agentes antimicrobianos alternativos, de origen natural, como los aceites esenciales, que resulten inocuos para los consumidores.

Esta tesis ha demostrado la existencia de daño subletal en las envolturas celulares de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Dekkera bruxellensis* y *Saccharomyces cerevisiae* tras la aplicación de diferentes tecnologías de conservación, como los tratamientos térmicos, PEAV, APH o la adición de citral. Se detectaron daños subletales en más del 99,99 % de la población superviviente en función de las condiciones de tratamiento. Así, las células dañadas mostraron una menor resistencia frente a otras barreras de conservación, lográndose su inactivación mediante el diseño de procesos combinados. Por ejemplo, se demostró efecto letal sinérgico entre tratamientos térmicos o de APH y citral, lográndose la inactivación de más de 5 ciclos de las poblaciones iniciales de *E. coli* y *L. monocytogenes*. Además, esta sinergia observada en *E. coli* podría relacionarse con los daños ocasionados por el calor o la presurización sobre la membrana externa, que facilitarían el acceso del citral a su estructura diana.

En resumen, esta investigación indica que un análisis exhaustivo del mecanismo de inactivación microbiana por un determinado método de inactivación, así como la evaluación de los factores que afectan a la resistencia microbiana puede resultar de gran ayuda en el diseño de procesos de conservación de alimentos más adecuados. Además, la detección de daño subletal en las envolturas celulares puede mostrar las condiciones bajo las cuales diversos métodos de conservación pueden actuar de manera sinérgica, permitiendo la obtención de productos microbiológicamente seguros y con una calidad organoléptica adecuada.

Evolución experimental de la gama de huéspedes del Virus del grabado del tabaco (TEV)

Patricia Agudelo-Romero

Directores: **Santiago F. Elena Fito** y **Rafael Sanjuán Verdeguer**.

Instituto de Biología molecular y celular de plantas -IBMCP- (CSIC/UPV).

En la actualidad, nuevos virus de plantas han aumentado debido a cambios en el medio ambiente y a malas prácticas agrícolas. Por esto, es importante determinar los factores genéticos y evolutivos implicados en la aparición de estos nuevos virus. El objetivo fundamental de esta Tesis es simular un proceso de emergencia viral.

Los virus de plantas muestran una alta variabilidad en sus gamas de huéspedes por lo que

pueden ser especialistas o generalistas. En nuestro primer conjunto de experimentos, exploramos el coste que supone la ampliación de la gama huéspedes en términos de eficacia viral del Potyvirus del grabado del tabaco (TEV). Primero, empleando huéspedes pertenecientes a la misma familia taxonómica (tabaco y pimiento). Segundo, en huéspedes pertenecientes a familias taxonómicas alejadas (tabaco y arábidopsis). Estos experimentos muestran que la adaptación a un nuevo huésped tiene un efecto pleiotrópico antagonista en el huésped original. Concluyendo que ampliar la gama de huéspedes implica un coste en términos de eficacia promedio, de manera que la eficacia viral no se maximiza para cada huésped sino que existe un compromiso¹.

En un segundo conjunto de experimentos, exploramos si la adaptación del virus a arábidopsis conlleva cambios en el tipo de interacciones que éste establece con la planta a nivel del transcriptoma. Más concretamente, nos preguntamos: (1) ¿Qué cambios se observan en el patrón de expresión génica del huésped tras la infección de un virus emergente? (2) ¿Cómo cambia la red de interacciones a medida que el virus se adapta a su nuevo huésped. Para desarrollar este trabajo utilizamos micromatrices de cDNA. Donde identificamos un conjunto de genes de la planta cuya expresión se altera tras la infección con TEV, muchos de ellos implicados en respuesta a estreses bióticos y abióticos². Este conjunto de genes cambió a medida que el virus se adaptó a su nuevo huésped aumentando su eficacia y virulencia, observándose que muchos genes de respuesta a estrés biótico dejaron de ser activados después de la infección. Estos cambios fueron consecuencia de un número limitado de mutaciones en el genoma de TEV. De hecho, un solo cambio en el virus es el responsable de los nuevos síntomas en la planta³.

Por último, comprobamos si la adaptación de TEV al ecotipo (*Ler-0*), también aumenta su eficacia y virulencia en otros ecotipos. Para establecer si la adaptación viral es específica de un genotipo del huésped o si, por el contrario, facilita el acceso del virus a otros genotipos. Existe un buen número de grados de susceptibilidad a TEV en Arabidopsis, esta variabilidad se debe al alelo dominante *RTM1* (restricción del movimiento de TEV 1). Para esto, evaluamos 9 ecotipos de arábidopsis con diferentes niveles de susceptibilidad a TEV. En los que observamos que el virus adaptado a *Ler-0* era capaz de infectar y generar síntomas en ecotipos que eran resistentes a la infección con el TEV ancestral⁴. Estos resultados sugieren que poseer el alelo de resistencia en el locus *RTM1* no es condición suficiente para que la planta sea resistente a TEV.

1. Agudelo-Romero P, de la Iglesia P, Elena SF. 2008. *Infect. Genet. Evol.* 8(6):806-14.
2. Agudelo-Romero P, Carbonell P, de la Iglesia F, Carrera J, Rodrigo G, Jaramillo A, Pérez-Amador MA, Elena SF. 2008. *Virology* 7(5):92-102.
3. Agudelo-Romero P, Carbonell P, Pérez-Amador MA, Elena SF. 2008. *PLoS ONE* 11(3): e2397.
4. Lalic J, Agudelo-Romero P, Carrasco P, Elena SF. 2010. *Phil. Trans. R. Soc. B.* (Accepted).

Engineering and production of quality viral proteins in prokaryotic and eukaryotic systems

Mónica Martínez Alonso

Directores: **Antonio Villaverde, Neus Ferrer Miralles y Rob Noad.**
Universidad Autónoma de Barcelona.

La posibilidad de obtener proteínas con aplicaciones industriales o terapéuticas mediante la tecnología del DNA recombinante ha revolucionado la industria biotecnológica. A pesar de esto, la producción de proteínas recombinantes en sistemas heterólogos aún no está optimizada, y muchas veces estas proteínas se obtienen en forma insoluble. La selección de un sistema de expresión adecuado es importante para conseguir obtener la proteína en una forma funcional y soluble. En esta tesis se ha utilizado una GFP recombinante como proteína modelo para estudiar agregación y actividad durante la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* y en el sistema de expresión de baculovirus.

Al producir nuestra proteína modelo en *E. coli*, ésta se obtiene mayoritariamente en forma de cuerpos de inclusión con una elevada actividad biológica. Nuestros resultados indican que aunque es posible mejorar la solubilidad de la proteína optimizando parámetros del proceso de producción, las condiciones que permiten mejorar los niveles de producción resultan en una disminución de la calidad conformacional de la proteína obtenida. Ya que no es posible maximizar al mismo tiempo el rendimiento del proceso de producción y la calidad de la proteína obtenida, el diseño del proceso deberá optimizarse en función del parámetro más relevante para el uso final de la proteína.

Además, la versión soluble de esta proteína contiene una amplia gama de agregados solubles, que conforman una población heterogénea en cuanto a estructura secundaria y funcionalidad. Esto indica que los cuerpos de inclusión, que son más homogéneos que su versión soluble, pueden entenderse como una pequeña subpoblación dentro del total de especies proteicas recombinantes. Por otra parte, la calidad de la proteína recombinante representa un promedio estadístico de la calidad de cada una de estas especies.

Una de las estrategias más utilizadas para mejorar la solubilidad de proteínas recombinantes consiste en la coexpresión de moduladores del plegamiento. Al coexpresar la chaperona bacteriana DnaK y su cochaperona DnaJ con nuestra GFP modelo producida en *E. coli*, observamos una disminución de la agregación, que estaba asociada a proteólisis. El cambio de huésped de estas chaperonas juntamente con nuestra proteína modelo para producirlas en el sistema de expresión de baculovirus en células de insecto o larvas permitió mantener la actividad foldasa de DnaKJ eliminando su actividad proteolítica asociada, ya que ésta es dependiente

de proteasas bacterianas. En el sistema de expresión de baculovirus observamos mejoras en los niveles de proteína total y soluble, la estabilidad proteolítica, solubilidad y actividad biológica al ser coexpresada con las chaperonas bacterianas DnaKJ. Además, hemos podido confirmar en un sistema eucariota el concepto de que el rendimiento y la calidad de la proteína obtenida son parámetros antagónicos que no se pueden favorecer de forma simultánea en procesos de producción.

Por último, también hemos podido comprobar que las chaperonas bacterianas son funcionales en un sistema eucariota. Esto permite ampliar el catálogo de moduladores del plegamiento disponibles para su uso en sistemas eucariotas.

Biodiversidad de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica de vinos tintos de la variedad Cencibel: caracterización molecular y tecnológica para la selección de cepas

Patricia Ruiz Pérez

Director: **María Llanos Palop Herreros.**
Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha.

Se ha realizado un estudio de la biodiversidad y la caracterización tecnológica de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica espontánea de vinos tintos de la variedad Cencibel elaborados en bodegas de Castilla-La Mancha con el objetivo de seleccionar aquellas cepas autóctonas que presentaran las mejores propiedades para ser utilizadas como cultivos iniciadores.

Para ello, se tomaron muestras de vino elaborado en 6 bodegas de 4 provincias (Albacete, Ciudad Real, Cuenca y Toledo) de Castilla-La Mancha, en dos vendimias consecutivas.

La caracterización genética de los aislados utilizando diferentes técnicas moleculares (RAPD-PCR, REA-PFGE y DD-PCR) puso de manifiesto que la RAPD-PCR es una técnica adecuada para el genotipado de estos aislados, tanto por su capacidad de discriminación intraespecífica, comparable con la de la REA-PFGE, como por su sencillez metodológica. Por el contrario, la DD-PCR mostró una escasa reproducibilidad lo que la invalida para estudios de biodiversidad.

Los resultados del estudio de caracterización genética pusieron de manifiesto la presencia de genotipos coincidentes en muestras tomadas en diferentes vendimias y procedentes de bodegas situadas en diferentes provincias de la región, lo que confirma la existencia de una microbiota bien adaptada a las condiciones ecológicas de esta región vitivinícola.

La identificación de los aislados mediante la técnica 16S-ARDRA mostró que *O. oeni* es la especie predominante en la fermentación maloláctica de los vinos de la variedad Cencibel, si bien también han podido identificarse, aunque en baja proporción, las especies: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *Lc. mesenteroides*.

En el estudio de caracterización tecnológica efectuado a los 84 aislados representantes de los diferentes genotipos obtenidos en la etapa de caracterización genética, destacaron dos cepas de *O. oeni*, las cepas C22L9 y D13L3, siendo los vinos elaborados con la cepa C22L9 los preferidos por los catadores en el análisis sensorial.

El ensayo de implantación, utilizando vinos de las variedades Tempranillo, Syrah, Cabernet Sauvignon y Tinto de la Pámpana Blanca, realizado con la cepa C22L9 y con la cepa comercial *O. oeni* PN4, puso de manifiesto que la cepa C22L9 se implanta de forma satisfactoria en todas las variedades ensayadas, habiéndose obtenido en algunos casos porcentajes de implantación superiores a los de la cepa comercial.

Los resultados obtenidos han permitido tener un mejor conocimiento del proceso microbiológico que ocurre en la fermentación maloláctica de los vinos de la variedad Cencibel y han permitido seleccionar una cepa de *O. oeni* con excelentes propiedades para ser utilizada como cultivo iniciador a escala industrial.

La puesta a disposición de las bodegas de cepas autóctonas, seleccionadas en base a criterios enológicos adecuados a las exigencias del mercado actual, reportará importantes beneficios a la industria del sector. Por un lado, permitirá un control eficiente de la fermentación maloláctica, evitando riesgos innecesarios que siempre implican un coste económico, y por otro, permitirá la obtención de vinos higiénicos de calidad con características enológicas propias.

Caracterización de cepas de *Streptococcus suis*, serotipos 2 y 9, aisladas de ganado porcino en España

Verena Blume Serrano

Directores: **José Francisco Fernández-Garayzábal Fernández y Ana Isabel Vela Alonso.**
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

Las infecciones por *Streptococcus suis* son consideradas actualmente una de las principales patologías del cerdo en países de cría porcina industrial, y su implicación en procesos clínicos y su carácter zoonótico son factores que han condicionado que su estudio sea emergente en la Unión Europea. Pese a su importancia, poco se conoce sobre la estructura de la población de *S. suis* y la potencialidad de determinados clones para producir patología en el ganado porcino. Para poder ampliar el conocimiento sobre estas

cuestiones, en el presente trabajo se ha realizado una caracterización fenotípica (perfil bioquímico, serotipificación y estudio de la expresión de las proteínas relacionadas con la virulencia MRP, EF y SLY) y una caracterización genética (electroforesis en campo pulsado [PFGE] y análisis de la secuenciación de múltiples genes [MLST]) de cepas aisladas de procesos clínicos y de portadores en el ganado porcino en España. También se ha estudiado su diversidad y relaciones genéticas así como la posible existencia de clones prevalentes responsables de la mayoría de casos clínicos. Finalmente, se han comparado las cepas clínicas y las cepas aisladas de animales portadores respecto a la expresión de los distintos factores relacionados con la virulencia, así como el estudio de la variabilidad de los genes que codifican para dichos factores. La caracterización se ha centrado en los aislados de los serotipo 2 y 9 por ser los más prevalentes, en España y en Europa.

Los estudios realizados permiten confirmar que el serotipo 2 es el más prevalente en la población de *S. suis* del ganado porcino español, así como el incremento en el aislamiento del serotipo 9 como responsable de casos clínicos respecto de los datos de prevalencia tradicionalmente observados en España.

Se estudió en todas las cepas la expresión de los marcadores de virulencia MRP, EF y SLY, así como la detección de sus correspondientes genes (*mrp*, *epf* y *sly*) y la variabilidad de éstos mediante su secuenciación directa. Se hallaron diferencias en la expresión de los factores de virulencia en relación con el serotipo. Las cepas del serotipo 2, expresaron mayoritariamente los fenotipos MRP⁺EF⁺SLY⁺ y MRP⁺EF⁺SLY⁻, mientras que entre los aislados del serotipo 9, fueron los fenotipos MRPEF⁺SLY⁺ y MRPEF⁺SLY⁻ los más frecuentemente aislados. En los genes *sly* y *epf* se halló un 100% de homología con las secuencias publicadas independientemente del serotipo o de la condición clínica, mientras que en el gen *mrp* se hallaron mutaciones silenciosas en determinadas localizaciones dependiendo del serotipo. El estudio de la expresión de los marcadores de virulencia, MRP, EF y SLY, así como de los genes que codifican para ellos, no permitió diferenciar las cepas clínicas y las cepas aisladas de portadores entre los aislados de un mismo serotipo.

La caracterización genética de los aislados mediante PFGE confirmó la relativamente alta diversidad en la población de este patógeno, similar en ambos serotipos. Los serotipos 2 y 9, se agruparon en dos grupos genéticos separados (A y B), encontrándose una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el serotipo 9 y el grupo A, y el serotipo 2 y el grupo B. Las diferencias genéticas entre estos serotipos mediante el análisis PFGE coincidiría con la distinta expresión de las proteínas asociadas a la virulencia por ambos serotipos, sugiriendo que los serotipos 2 y 9 formarían poblaciones de *S. suis* distintas genética y fenotípicamente. Los resultados de MLST mostraron que la mayoría de los aislados clínicos de serotipo 2 analizados pertenecían al clon ST1 ampliamente distribuido en Europa. Por el contrario, la mayor parte de los aislados clínicos del serotipo 9 pertenecieron al clon ST61,

poco relacionado genéticamente con el clon ST87 prevalente en Europa. Las diferencias halladas a nivel genético entre los aislados del serotipo 9 estudiados y los aislados europeos en este serotipo, coinciden con las diferencias halladas en nuestro estudio de caracterización fenotípica ya que solamente un 2,1% de estos aislados expresaron MRP⁺, mientras que la mayoría de aislados europeos de este serotipo expresan MRP⁺. Los datos de caracterización mediante MLST sugieren que la actual diseminación del clon ST61 tiene su origen en cepas pertenecientes al mismo complejo clonal detectadas en España a principios de la década actual.

El sistema toxina-antitoxina, $\epsilon\zeta$, como inhibidor de la proliferación celular e inductor de tolerancia

Virginia Soledad Lioy

Director: Juan Carlos Alonso.
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).

En la actualidad existe una necesidad urgente de encontrar nuevos compuestos para luchar contra la aparición de bacterias patógenas resistentes a antibióticos y de conocer los mecanismos que hacen a éstas tolerantes a los mismos. Los sistemas de Toxina-Antitoxina (TA), implicados en el mantenimiento estable de plásmidos y en la regulación de estrés, se encuentran conservados en plásmidos de bacterias Gram-positivas resistentes a vancomicina o eritromicina. En el plásmido pSM19035, aislado de una cepa de *S. pyogenes* resistente a eritromicina, la antitoxina ϵ_2 interacciona con la toxina ζ , neutralizando su actividad fosfotransferasa. Cuando ζ queda libre induce, a través de un mecanismo desconocido, dos estados celulares (estasis y tolerancia), tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*. La estasis celular se ve caracterizada por una drástica reducción en la tasa de replicación, transcripción, traducción y síntesis de nucleótidos. Sin embargo, si las células se someten a la acción prolongada de la toxina ζ , las mismas no pueden recuperarse del estado “durmiente” y una subpoblación muere por lisis celular ($\approx 30\%$).

La mayor parte de las bacterias en un cultivo son susceptibles a los antibióticos, pero existe una pequeña fracción que es insensible a los mismos (células persistentes). En este trabajo, hemos demostrado que ζ induce una pequeña subpoblación de células que son insensibles a su efecto tóxico, independientemente de la fase de crecimiento. En presencia de un antibiótico y ζ se observó un aumento en la sensibilidad al compuesto antimicrobiano, indicando que la toxina induce un tipo de “persistencia” diferente al inducido por los antibióticos. Hemos demostrado que la expresión de la antitoxina ϵ_2 sólo es capaz de revertir las células que son insensibles a la acción de la toxina ζ , sin observar un aumento de las células persistentes y aumentando la sensibilidad a los antibióticos. Esto indica que el es-

tado de estasis inducido por ζ no es responsable de la persistencia a antibióticos.

Todos estos resultados hacen del sistema $\epsilon\zeta$, un candidato ideal para desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos. Así, a través de dinámica molecular buscamos los aminoácidos más relevantes en la estabilidad del sistema $\epsilon\zeta$. Encontramos que los residuos Asp18 y Glu22 son los más importantes para la estabilidad del complejo $\epsilon\zeta$. Para validar las predicciones *in silico*, analizamos los aminoácidos por medio de mutagénesis dirigida y desarrollamos un ensayo de BRET para evaluar la estabilidad de esos mutantes. En este sistema, el gen de la antitoxina fue fusionado al gen de la luciferasa (Luc- ϵ) y el de la toxina al gen de la proteína verde fluorescente (ζ -gfp). Como resultado, Luc- ϵ es capaz de transferir eficientemente energía al aceptor fluorescente ζ -gfp, dando una alta señal de BRET. No obstante, cuando el residuo Asp18 de ζ fue cambiado por una alanina (ζ D18A), la interacción Luc- ϵ : ζ D18AK46A-GFP se vio fuertemente afectada, indicando que es esencial para la estabilidad del complejo TA. Con estos resultados hemos demostrado que es posible romper un modulo TA, ofreciendo una nueva diana para luchar contra las cepas resistentes a antibióticos.

Descripción de nuevas especies de *Lactobacillus* y desarrollo de sondas específicas para la detección de microorganismos en vinos mediante un Nanochip

Rosario Mañes Lázaro

Directores: Isabel Pardo y Sergi Ferrer.

Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València.

El vino es el resultado de la multiplicación y del metabolismo de numerosos microorganismos a partir del zumo de uva. A lo largo del proceso de vinificación, podemos encontrar diversas especies de hongos, levaduras y bacterias. De entre estos tres grupos, los más importantes por los efectos que causan en el vino, son las levaduras, las bacterias lácticas (BAL) y las bacterias acéticas (BA). Las dos primeras pueden tener un efecto positivo o negativo en la calidad del producto final, mientras que las BA siempre juegan un papel negativo en el vino.

La correcta identificación de los microorganismos presentes durante la fermentación del mosto es importante, ya que generalmente, el efecto que producen en el vino suele ser dependiente de la especie, o incluso de la cepa de la que se trate. Por ello, se han desarrollado gran cantidad de técnicas de identificación con diferentes niveles resolutivos, que se han utilizado

para la caracterización de los microorganismos del vino.

En este trabajo se han caracterizado mediante una aproximación polifásica, una serie de BAL aisladas de vino y pertenecientes al género *Lactobacillus*, que han dado lugar a tres nuevas especies: *Lactobacillus bobalius*, *Lactobacillus uvarum* y *Lactobacillus oeni*, y a la descripción, por primera vez en vino, de *Lactobacillus satsumensis*.

También se ha diseñado una batería de sondas para la detección de los microorganismos presentes en vino mediante un Nanochip, incluyendo las nuevas especies. El Nanochip es un microchip electrónico que permite la detección directa de los microorganismos del vino, pese a ser un medio complejo y con gran cantidad de inhibidores, sin necesidad de cultivarlos. Para ello, es necesaria la extracción del ADN total del vino, y la posterior amplificación por PCR de los fragmentos con los que hibridan las sondas específicas diseñadas.

En esta tesis doctoral, se ha estudiado la evolución de las especies microbianas en vinos industriales mediante el Nanochip, y los resultados se han comparado con los obtenidos por otras técnicas moleculares (16S-ARDRA, ITS-RFLP y PCR específica) que implican el cultivo de los microorganismos.

Tras el análisis se observa que, generalmente, los mejores resultados se obtienen al combinar todas las técnicas empleadas. Sin embargo, la identificación de los microorganismos del vino con el Nanochip supone una interesante alternativa a otras técnicas moleculares de identificación que requieren del cultivo de los microorganismos. Las principales ventajas del Nanochip son su rapidez y su capacidad de detectar varios microorganismos en múltiples muestras al mismo tiempo. Estas ventajas suponen que se puedan adoptar tempranamente medidas de seguridad que eviten alteraciones antes de que la elevada concentración de microorganismos comprometa la calidad final del vino.

Genes implicados en la variabilidad antigénica, la resistencia a antimicrobianos y la virulencia en *Streptococcus pyogenes* en España (1994-2006)

Virginia Rubio López

Director: **Juan Antonio Sáez Nieto**.
Instituto de Salud Carlos III, Servicio de Bacteriología, Laboratorio de Taxonomía, Facultad de Ciencias biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

Streptococcus pyogenes (SGA) es el agente causal de una extensa variedad de cuadros clínicos, desde faringitis a infecciones invasivas graves. La incidencia de las enfermedades producidas por SGA experimentó una disminución en las últimas

décadas hasta 1980, año en el que comienza una reemergencia de enfermedades invasivas graves como fiebre reumática, fascitis necrotizante, síndrome de shock tóxico e incluso brotes epidémicos de escarlatina. También se ha observado un incremento en las tasas de resistencia a macrólidos y tetraciclina, antibióticos empleados como tratamiento alternativo a la penicilina.

El análisis de los cambios en la epidemiología y virulencia de las cepas circulantes de SGA es importante para reconocer y controlar este tipo de infecciones. En España existe poca información disponible sobre la epidemiología de las cepas circulantes a nivel global, de modo que el principal objetivo del estudio fue analizar la composición antigénica, resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia de 898 cepas españolas de SGA procedentes de 13 cuadros clínicos enviados por 75 laboratorios españoles entre 1994 y 2006.

Se caracterizaron el antígeno T, presente en la pared celular y el gen *emm* (proteína M), que codifica el principal factor de virulencia de SGA. La amplia diversidad de genes *emm* y antígenos T mostró 48 combinaciones *emm*-T, siendo las más frecuentes *emm*4T4, *emm*1T1, *emm*28T28, *emm*12T12 y *emm*6T6. Mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado se observó una elevada diversidad genética en la población estudiada, no obstante, se detectó cierta clonalidad en los serotipos *emm*1T1, *emm*3T (3-NT-3/13), *emm*11T11, *emm*77T28 y *emm*78T11.

Mediante 2 PCR múltiples se analizó la presencia de 10 genes que codifican toxinas estreptocócicas (*speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *ssa*, *smeZ*) en una selección de 686 cepas de SGA. Los genes de toxinas cuya codificación es cromosómica, *speB*, *speF* y *speG*, fueron detectados en la mayoría de las cepas mientras que los genes *speH* y *speI* fueron los menos frecuentes. Se identificó una gran variabilidad de perfiles toxigénicos (119), constituyendo los 10 más frecuentes el 53,6%. Determinados genes y perfiles de toxinas se observaron con serotipos concretos, demostrando que el perfil toxigénico de las cepas se asocia con el serotipo y no con el cuadro clínico producido.

El estudio de sensibilidad a antimicrobianos mostró tasas de resistencia a eritromicina del 32,8% y del 6,8% a tetraciclina.

La resistencia a eritromicina se debió a la prevalencia de algunos clones asociados con la misma: *emm*75T25, *emm*4T4, *emm*28T28, *emm*11T11, *emm*6T6 y *emm*12T12. El fenotipo M (76,9%), responsable de la resistencia mediante bomba de flujo, prevaleció sobre MLS_B c (20,3%) y MLS_B i (2,7%). Los genes de resistencia a macrólidos *mef*(A/E) y *msr*(D) fueron predominantes sobre *erm*(B) y *erm*(TR), así como la combinación *mef*(A/E) + *msr*(D).

*emm*77T28 (100%) y *emm*11T11 (50%) fueron los serotipos que mostraron mayor resistencia a tetraciclina. La presencia conjunta de los genes *tet*(M)+*tet*(O) fue predominante frente a *tet*(M) y *tet*(O) por separado.

El 2,1% de las cepas fueron co-resistentes a eritromicina y tetraciclina, destacando *emm*11T11 (45,8%). Todas las cepas presentaron el fenotipo MLS_B de resistencia a macrólidos y al menos los genes *tet*(M)+*erm*(B).

Vacunación gag/env frente al virus Maedi Visna y papel de las moléculas coestimuladoras B7 y el interferón gamma como adyuvantes inmunológicos

Ximena de Andrés Orbegozo

Directores: **Beatriz Amorena Zabalza y Damián de Andrés Cara**.
Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra.

Los lentivirus de pequeños rumiantes, que incluyen el virus Maedi Visna (VMV) y el virus de la artritis encefalitis caprina, causan una infección crónica que evoluciona hacia una enfermedad con distintas formas clínicas y culmina con la muerte del animal. En la actualidad, los correspondientes métodos profilácticos y terapéuticos están en fase de desarrollo, entre ellos la vacunación. Este trabajo pretende contribuir a un mayor conocimiento sobre la forma de potenciar la respuesta inmune en la vacunación frente a este tipo de lentivirus y sobre estrategias de inmunización que permitan lograr, tras el desafío con el virus, un descenso de la infección o de las lesiones.

Para ello, se han propuesto y evaluado distintas estrategias de vacunación-desafío en ovinos, basadas en dos inmunizaciones por bombardeo epidérmico de plásmidos (pN3) con genes de *gag* y *env* de VMV, solos o en combinación, un recuerdo con un virus vaccinia Ankara modificado que expresa los correspondientes genes virales, y un desafío con la estirpe homóloga de VMV. Asimismo, se han incluido en la inmunización plásmidos con un gen de adyuvante inmunológico, el *IFN-γ* o el de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (CD80 solo y CD80 en combinación con CD86).

La inmunización epidérmica con el gen *gag* y/o el gen *env*, indujo la formación de respuesta tanto humoral como celular antes y después del desafío con el virus, pero la carga proviral sólo se vio reducida en el grupo inmunizado con "gag solo" en sangre, y en el grupo inmunizado con *gag* y *env* en el tejido linfóide, mientras que la inmunización con "env solo" no afectó a la carga proviral pero aumentó el desarrollo de lesión. La inclusión del gen del *IFN-γ* ovino en la inmunización no tuvo un gran efecto en la respuesta inmune, en la carga proviral o en el desarrollo de lesiones, a pesar de que indujo una disminución en la expresión de p25 en el pulmón. La inmunización en presencia de uno o ambos genes de las moléculas coestimuladoras, dio como resultado una activación específica de células T CD4+ y una producción específica de anticuerpos (antes y después del desafío, respectivamente), pero sólo el uso simultáneo de los genes de ambas moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en la inmunización con los genes *gag* y *env* del VMV, tuvo un efecto adyuvante, aumentando de forma transitoria la respuesta citotóxica específica tras la inmunización y reduciendo de forma significativa

la infección temprana tras el desafío con dicho virus, dando como resultado un 50% de protección en los animales vacunados con dichas moléculas. También originó unos cambios inmunológicos (lesiones leves) en órganos diana.

Comprehensive analysis of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipA and LipC lipases

Cristina Bofill Bosch

Directora: **Pilar Díaz Lucea**

Departamento de Microbiología,
Facultad de Biología, Universidad
de Barcelona.

La tesis que lleva por título “Comprehensive analysis of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipA and LipC lipases” se enmarca en los objetivos generales de nuestro grupo de investigación, que consisten en el aislamiento, caracterización y producción de enzimas con interés biotecnológico. En este contexto, la presente tesis doctoral forma parte del proyecto global que tiene como objetivo el desarrollo alternativo de emulsionan-

tes poliméricos para ser utilizados en la industria alimentaria.

La cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. 42A2 transforma secuencialmente, por acción de varias enzimas, el ácido oleico en derivados hidroxilados, que serán polimerizados posteriormente por acción de una o varias lipasas en estólicidos (poliésteres de ácidos grasos con gran interés biotecnológico). Por ese motivo, la presente tesis doctoral se centró en el aislamiento, la clonación y la caracterización de las lipasas extracelulares LipA y LipC de la cepa *Pseudomonas* sp. 42A2. Incluyendo el análisis de la regulación génica de ambas enzimas y la optimización de sus propiedades bioquímicas mediante el uso de técnicas en evolución dirigida.

A partir del estudio del sistema lipolítico de la cepa *Pseudomonas* sp. 42A2 se identificaron y se aislaron dos genes codificantes *-lipA* y *-lipC-*. Ambos genes se clonaron en la propia cepa parental y se procedió a la purificación y caracterización de las dos lipasas. LipA y LipC presentaron diferentes propiedades bioquímicas y fisiológicas que les confieren distintos roles en la célula. Por un lado, LipA mostró un carácter mesófilo, preferencia por sustratos de cadena mediana e inhibición por la presencia de aceite de oliva. Por el contrario, LipC es una enzima psicrófila, con capacidad de adaptación a distintos sustratos en fun-

ción de cambios de temperatura, gran tolerancia a iones pesados y con activación en presencia de aceite de oliva. A parte, se estudió la producción de LipA y LipC de *Pseudomonas* sp. 42A2 en situación de estrés nutritivo, observando un incremento solo de la actividad de LipC. Ambas enzimas se clonaron en los huéspedes heterólogos *E. coli* y *Bacillus subtilis* juntamente con la chaperona LipH, necesaria para el correcto plegamiento de las dos proteínas y por lo tanto para obtener la forma enzimáticamente activa. Sin embargo, la actividad lipolítica detectada en los clones recombinantes obtenidos fue siempre mucho menor comparada con la actividad de la cepa parental. Siendo necesario la clonación de los dos genes por separado (lipasa/foldasa) y realizar el plegamiento de la enzima *in vitro*. Para intentar mejorar la clonación de LipA en huéspedes heterólogos, se procedió a la obtención de una variante de LipA independiente de foldasa mediante técnicas de evolución dirigida. Sin embargo, las distintas técnicas empleadas no fueron suficientes para obtener dicha variante, significando que LipA presenta una elevada especificidad y necesidad de LipH. A parte, se realizó la mejora de la termoestabilidad de LipC mediante diseño racional y evolución dirigida, obteniendo 10 potenciales variantes enzimáticas con más resistencia a la temperatura que la enzima parental.

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.**

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
- Bordes Benitez, Ana
- Fernández Orts, Eva María
- Jorge Blanco, José Carmelo
- Lafarga Capuz, Bernardo
- López Ponce, Francisco José
- Medieros Almendros, Jesús
- Miranda Casas, Consuelo
- Rubio Vallejo, Manuel Fco.
- Sesma Bea, Begonia
- Vázquez Domínguez, Evaristo

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

Bioseguridad y biocontención: reflexiones

Xavier Abad

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA). UAB-IRTA. Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona. 08193, Bellaterra. España

xavier.abad@cresa.uab.es

Tel.: 34-93-581.45.64 • Fax: 34-93-581.44.90

En las dos últimas décadas, el incremento de interés, y la preocupación que viaja de su mano, por las enfermedades emergentes y reemergentes, muchas de ellas zoonóticas, causadas tanto por bacterias como por virus (coronavirus del SARS, influenza aviar altamente patógena, virus de la gripe A (H1N1)) ha alimentado el diseño, construcción y puesta en marcha de una plétora de nuevas instalaciones y laboratorios de bioseguridad y biocontención (Manuel, 2008) en Europa, EEUU, pero también en África y Asia.

Los conceptos de bioseguridad, biocontención y bioprotección no están todavía claros para ciertos segmentos de la comunidad científica, algunos incluso directamente implicados en instalaciones en las que se manipulan patógenos peligrosos, y menos aún para el público en general. Por otro lado ofrece oportunidades profesionales para los microbiólogos pues los centros o laboratorios que pongan en marcha instalaciones de biocontención, con nivel de bioseguridad 3 o superior, necesitarán personal con una profunda base microbiológica e interés tecnológico para aplicar estos conceptos de una manera coherente (estricta pero no maximalista).

Vamos a empezar por una definición de los conceptos a discutir a partir de la información aportada por los diccionarios. Así, por **Safety** entendemos: *the state of being safe; freedom from occurrence or risk of injury, danger, or loss* o sea, Calidad de seguro; libre y exento de todo peligro, daño o riesgo (Diccionario RAE, 20ª edición).

Por **Security** entendemos: *freedom from danger, risk, etc; safety. / something that secures or makes safe; protection; defense. / precautions taken to guard against theft, sabotage, the stealing of (military) secrets...*, es decir, resguardar a una persona animal o cosa de un perjuicio o peligro, poniéndole algo encima, rodeándole, etc. (Diccionario RAE, 20ª edición).

Por **Contain** entendemos: *to hold or include within its volume or area; / to keep under proper control; restrain* o Llevar o encerrar dentro de sí una cosa a otra (Diccionario RAE, 20ª edición).

Y aquí un primer apunte. Incluso en EEUU, donde surgieron los términos, **biosafety** hace ya más de 20 años (en la 1ª edición de la guía *BMBL-Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, de 1984) y **biosecurity** a principios del siglo XXI (adquiere carta de naturaleza en la 5ª edición de BMBL, en 2007, que le dedica toda una sección) hay dudas sobre cómo aplicarlos y cuáles son sus esferas de atención, pero esto se hace más proceloso al traducir dichos términos: en español y en francés traducen ambos como bioseguridad o *biosécurité* (por mucho que bioprotección también se traduce al francés como *biosûreté*), respectivamente. A efectos de clarificación y desde este momento traduciremos **biosafety** como **bioseguridad** y **biosecurity** como **bioprotección**, sin intención de sentar ninguna cátedra.

Hagamos un somero repaso a estos tres conceptos a menudo confundidos o con zonas de sombra. La **Bioseguridad** (Figura 1) está íntimamente relacionada con el establecimiento y ejecución de procedimientos para minimizar el riesgo (ya que el riesgo cero es inalcanzable) en el uso, manipulación y propagación de microorganismos patógenos (de animales, plantas o seres humanos), y está definitivamente asociado a las actividades internas de un centro de investigación o instalación concreta. Los procedimientos y prácticas de bioseguridad dependerán del agente (su patogenicidad, rango de huéspedes, estabilidad y ruta de transmisión, etc.) y de la actividad a acometer (volumen del material infeccioso, concentración del mismo, si hay experimentación animal asociada, etc.). La bioseguridad se centra en reducir la exposición y/o la liberación de materiales biológicos infecciosos, y es objeto de la preocupación y de trabajo de personal científico en tareas de gestión, con la asistencia de personal investigador y técnico. La **Biocontención** (Figura 1) está mucho más relacionada con los factores físicos y constructivos asociados al diseño y al proceso constructivo (*comissioning*) del edificio que albergará estas actividades (y por tanto, recae en el terreno de los arquitectos, ingenieros y equipos constructivos-

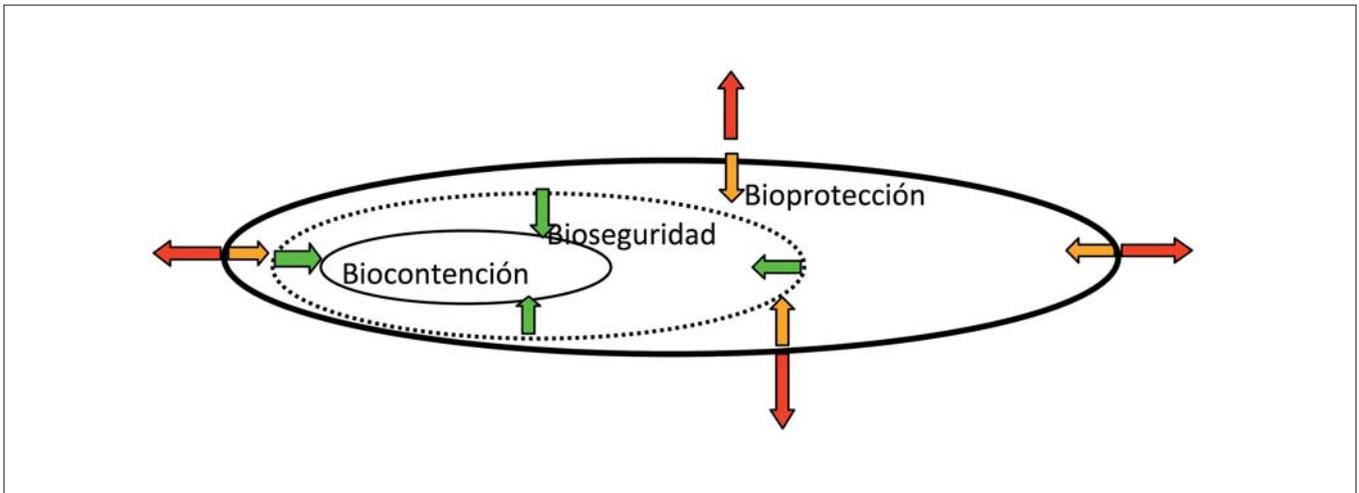


Figura 1. Ámbitos de acción de la biocontención, bioseguridad y bioprotección.

UTES) y a los equipos que en él se instalen (Cabinas de Seguridad Biológica (CSB) o jaulas de animales)(Clough et al., 1994; Gilman y Fink, 2006; Keller et al., 1983). Finalmente, la **bioprotección** (*biosecurity* en inglés) (Figura 1), muchas veces utilizada erróneamente como sinónimo de bioseguridad, está intensamente relacionada con la toma de medidas para prevenir las actividades externas (pero también internas) de algunas personas, a través del robo o uso ilícito, que puedan comprometer la contención de los patógenos. La bioprotección atañe a los medios físicos y administrativos (protocolizados) para asegurar el control del material biológico y de la información (datos y personas) que podrían poner en peligro la salud pública o provocar pérdidas económicas cuantiosas como resultado de una liberación maliciosa, pérdida intencionada, robo, etc. Y es mucho más de lo que imaginamos (puertas, cámaras y guardas). La bioprotección trata de prevenir la potencial proliferación de armas biológicas (*bio-weapons*) mientras que la bioseguridad trata de mitigar el biopelegrino (*biohazard*) (Cook-Degan et al., 2005). De lo definido se deduce que esta tarea no compete a los científicos, si no que más bien es responsabilidad de los equipos gestores o directivos de las instalaciones o los poderes públicos. Sin embargo, no pensemos que la bioprotección es un problema puramente tecnológico, es más bien un problema que radica en las personas.

GRUPOS DE RIESGO, NIVELES DE BIOSEGURIDAD Y EVALUACIÓN DE RIESGO

Los microorganismos han sido clasificados en 4 **grupos de riesgo** (WHO, 2004), sistematización que sólo es aplicable en los trabajos de laboratorio. No es nuestro objetivo detallar estos grupos; solo debemos remarcar que no hay una equivalencia exacta entre estos grupos de riesgo (GR1 a GR4) y los **niveles de bioseguridad** (NBS1 a NBS4) con sus equivalencias *Biosafety Level* (BSL) 1 a 4 en inglés. El grupo de riesgo

clasifica un patógeno dentro de una escala humana (el daño que puede infligir al ser humano o a sus intereses: ganadería, agricultura) mientras la bioseguridad hace referencia a las prácticas y procedimientos operativos pero también al diseño, construcción y equipamiento de la instalación (por tanto a los elementos de biocontención que disponemos para trabajar). La decisión de asignar una actividad experimental con un patógeno concreto a un nivel de bioseguridad (NBS) debe basarse en una **evaluación del riesgo** coherente (ver Figura 2). A un patógeno de nivel de riesgo 2 se le asigna comúnmente un nivel de bioseguridad 2, pero en circunstancias concretas (muy altas concentraciones, alta probabilidad de generación de aerosoles, etc.) puede demandarse un NBS3.

¿Y qué papel juega aquí la bioprotección? Puesto que se interesa sólo por aquellos microorganismos patógenos que pueden tener un doble uso, es decir, que pueden ser utilizados con fines terroristas, su campo de preocupación-actuación es menor. Hay muchos microorganismos de los GR2 y GR3 que no están en la lista de Agentes Seleccionados. Y... seamos flexibles. En el inicio del brote de la nueva gripe A (H1N1) en México las primeras muestras para analizar fuera del propio México se vehicularon a Canadá, y no al CDC de EEUU, vecinos como son, como consecuencia de una aplicación estricta de la reglamentación de Agentes Seleccionados que impidió su entrada rápida en suelo estadounidense (SEMP, 2009).

INSTALACIONES

El trabajo con microorganismos de los niveles GR2 a GR4 se hace en instalaciones diseñadas a tal efecto, ya sean de laboratorios de investigación universitarios, de otros centros de investigación, hospitalarios, o de empresas. Es en estos centros donde aplicaremos las medidas de bioseguridad apoyándonos en los elementos de biocontención,

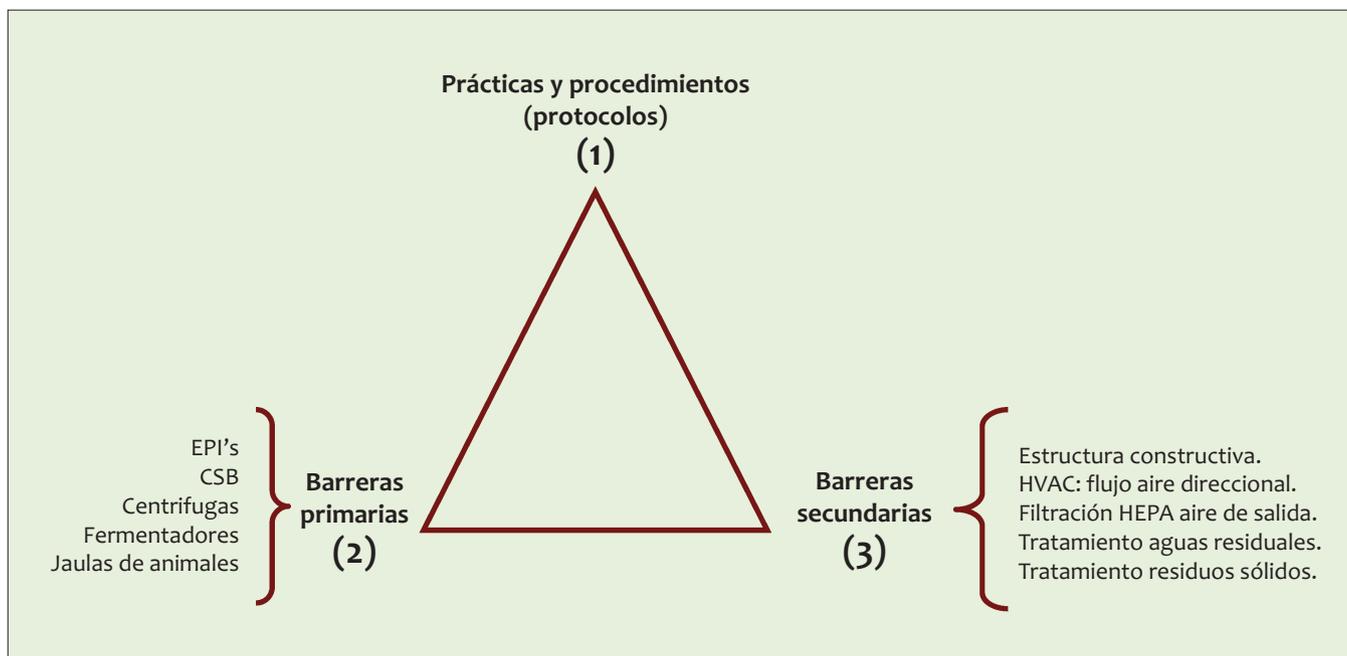


Figura 2. Aspectos a evaluar en bioseguridad.

- (1) El vértice de mayor impacto en la evaluación del riesgo.
- (2) Con diferencia, la más importante es aquella proporcionada por las CSB.
- (3) Fundamentales en la protección del medio ambiente y la comunidad (bioprotección) también contribuyen a la bioseguridad.

y donde, si procede, someteremos a regulaciones de bioprotección a una parte (o a la totalidad) de nuestro trabajo y personal. Durante el diseño y construcción de instalaciones de niveles de bioseguridad 3 y 4 (NBS3 y NBS4, respectivamente), las futuras necesidades de biocontención y bioprotección deben jugar los papeles principales. Todos los requerimientos operacionales y de trabajo deberían estar listados en un documento que incluya las futuras actividades y procesos a ejecutar, y una evaluación del posible incremento de necesidades y cómo se podrían satisfacer las mismas (lo que después discutiremos como **flexibilidad**). Es evidente que no podemos esperar que los investigadores (microbiólogos en nuestro caso) lideren estas actividades, pero deben ser ellos quienes delimiten el terreno de juego, ya que los requerimientos de bioseguridad (que serán la suma de procedimientos normalizados de trabajo más las capacidades de biocontención de la instalación) sí son responsabilidad del personal de apoyo técnico y científico que quedará al cargo de la instalación una vez esta se ponga en marcha. Este es el momento de arquitectos, ingenieros y equipos constructivos (muchas veces UTEs: Uniones Temporales de Empresas). Serán ellos los que decidirán, por ejemplo, que en instalaciones NBS3 o NBS4 deben utilizarse unos materiales constructivos y no otros (por ejemplo hormigón y no ladrillo), y que los sellados de las conducciones se harán con uno u otro sellador, o dónde colocar las válvulas anti-retorno en los circuitos, etc. (Frasier y Talka, 2005).

También es el momento de decidir qué tipo y extensión de bioprotección deseamos instalar en nuestro edificio: circuito cerrado de cámaras que vigilen el perímetro del edificio, circuito cerrado de cámaras para los boxes de experimentación animal para la vigilancia de los mismos, zonas de acceso paulatinamente más restringido (como las pieles de una cebolla) mediante lectores de tarjetas o lectores biométricos o incluso chequeos personales (Frasier y Talka, 2005; Gronvall y Bouri, 2008) que de hecho no están restringidos a las instalaciones NBS3 y NBS4 y también pueden ser implantados en instalaciones NBS2 (Gronvall y Bouri, 2008).

La construcción de instalaciones NBS3 o NBS4 es técnica y tecnológicamente muy complicada, y hay pocos estándares universalmente aceptados (IVBWG, 2006). De hecho, muchas tecnologías o aplicaciones en bioseguridad, biocontención y bioprotección están en continuo desarrollo y con mejoras anuales continuas (tratamientos de residuos, sistemas de extinción de incendios, sistemas de estanqueidad o hermeticidad, etc.). Muchos sistemas complejos deben aunar su actividad de modo cooperativo: sistemas HVAC (**H**eating, **V**entilating and **A**ir **C**onditioning), sistemas de filtración de aire (HEPA o ULPA), su ubicación y su control, tratamientos de aguas y efluentes contaminados (ya bien sean térmicos, por lotes o en flujo continuo o químicos, por hidróxido sódico o hipoclorito), sistemas de descontaminación (de personal por duchas de aire o agua; o

duchas químicas en caso de ir en traje integral; de salas o aparatos por fumigación con peróxido de hidrogeno vaporizado o formaldehído), sistemas de extinción de incendios, sistemas de acceso de seguridad, pero también componentes arquitectónicos o estructurales (hermeticidad de puertas y ventanas, paredes y pinturas resistentes a golpes y reacciones químicas promovidas por los desinfectantes utilizados, etc.). Cualquier decisión errónea, o simplemente no acertada, puede tener importantes repercusiones en el coste final. De hecho, una de las más usuales malas decisiones en una instalación de biocontención es el ahorro de dinero en la etapa constructiva eliminando redundancias y sistemas flexibles. No es redundante, sino fundamental, disponer de alternativas a un corte de suministro eléctrico (mediante generador propio *bien dimensionado* o conexión a otra línea), de agua (mediante tanques de almacenamiento que permitan suplir temporalmente la falta de suministro), o averías en aparatos o sistemas clave: los ventiladores de impulsión y extracción (estos ventiladores determinan las depresiones en gradiente que son la base de toda biocontención; deben estar duplicados, como mínimo, dos ventiladores de extracción y otros dos de impulsión y además una unidad de cada deben estar asociadas y ser independientes del otro par, para llegado el caso, proceder a una desconexión puntual de una pareja sin afectar la biocontención, y por ende la bioseguridad, que no la bioprotección; aquí ésta no juega ningún papel), el incinerador (mediante un método alternativo de procesamiento de las carcasas animales como puede ser la hidrólisis alcalina; Frasier y Talka, 2005) o el sistema de descontaminación de líquidos (alternando un sistema químico, por hidróxido sódico, por ejemplo, y otro térmico, ya sea en batería o en flujo continuo, con la posible alternativa de ozonización de los efluentes finales). Si es económica y espacialmente posible, todas las redundancias y alternativas posibles deben ser incluidas, trabajando como sistemas conmutables. Estos criterios de redundancia son casi imperativos en una instalación NBS3 o NBS4, porque ¿Qué haríamos con una instalación de biocontención en marcha si de repente perdiéramos la presión negativa o si en una instalación NBS3 para grandes animales, como es CReSA, fuésemos incapaces de procesar el residuo líquido y sólido que generan los animales y las personas cada día? Recordemos que los costes constructivos de una instalación NBS3 típicamente son entre un 200 y un 400% superiores a una instalación NBS2 equivalente y esta diferencia de costes se hace aún mayor (entre un 200 y un 800%) cuando en ambas instalaciones incluimos los costes operativos. Aviso para navegantes: puesto que los costes de mantenimiento operativo de las instalaciones de alta biocontención son extremadamente altos (consumo energético, mantenimiento, personal técnico altamente cualificado) estos exceden rápidamente los costes constructivos. Sólo si antes de iniciar el diseño y la construcción se ha garantizado un programa de financiación adecuado a largo plazo la instalación podrá tener éxito y ser plenamente operativa.

F. Xavier Abad Morejón de Girón es Doctor en Biología en 1994 por la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. Desde 2006 desempeña el cargo de Gestor de Laboratorios de Biocontención-NBS3 del *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CReSA: UAB-IRTA), un centro de investigación dedicado a la salud animal localizado en el Campus de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).



Sus principales intereses científicos están en la persistencia de virus animales y humanos en el medio ambiente, con particular atención al agua, los *fómites* y los alimentos, los procesos o técnicas de inactivación y eliminación para asegurar la seguridad viral de hemoderivados, cosméticos y alimentos, y también, los temas de bioseguridad y biocontención en laboratorios de investigación microbiológica, entre otros. Autor de más de 25 publicaciones, la mayoría en revistas internacionales; más de 50 comunicaciones a congresos e integrante de redes relacionadas con la bioseguridad de instalaciones y laboratorios.

Una vez finalizada la construcción de la instalación, controles sistemáticos de cumplimiento de especificaciones (sistemas eléctricos, controles de acceso, puntos críticos de biocontención como serían los conductos y penetraciones, etc.) y exigentes pruebas de validación deben ser ejecutadas. Estas validaciones, que controlan y registran los parámetros críticos de acuerdo con las especificaciones protocolizadas, nos darán una imagen realista de las capacidades de nuestra instalación por lo que respecta a la biocontención. Evidentemente estas pruebas son realizadas por compañías expertas y familiares a estas metodologías, pero deben ser seguidas muy de cerca por el personal científico responsable de la gestión de la instalación porque forma parte del núcleo duro de sus responsabilidades y tareas. Aprovechando este periodo de validaciones, debe entrenarse intensamente al personal técnico propio en todos los detalles de los sistemas, procedimientos y actividades de mantenimiento. Una formación inicial intensa del personal de laboratorio en el cumplimiento estricto de las normas de la instalación (aquí sí podemos hacer una equivalencia estricta a normas de bioseguridad) debe permanecer por siempre como una actividad de prioridad máxima (Kimman et al., 2008).

Una vez finalizadas **todas** las validaciones (no sólo de los elementos estructurales del edificio sino de autoclaves, *airlocks* y sistemas de descontaminación asociados, CSB, centrifugas, etc.) y superadas con éxito, la instalación está lista para iniciar sus actividades. Periódicamente, sin embargo, el laboratorio deberá revalidar todos los sistemas críticos, aunque con una intensidad y extensión menor que la validación primigenia.

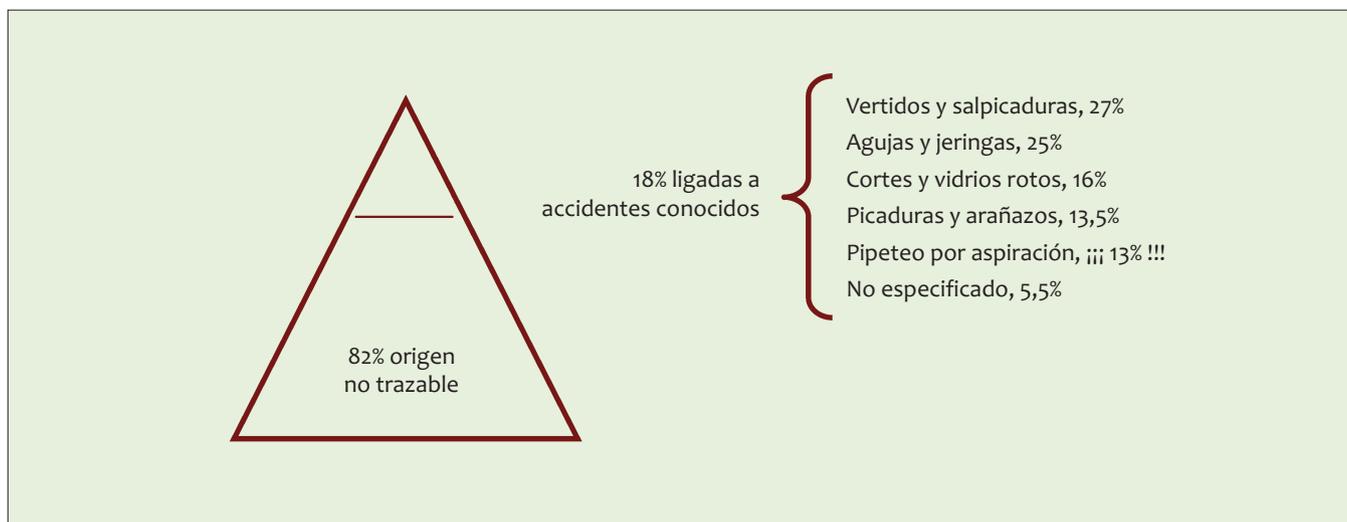


Figura 3. Origen de los fallos en bioprotección.

DE VUELTA A LOS TÉRMINOS

Bioseguridad, biocontención y bioprotección (ver **Figura 1**): no debemos confundir sus significados. La bioseguridad (prácticas de manipulación y minimización del riesgo) y la biocontención (confinamiento físico de los patógenos) son asuntos tan viejos como la propia manipulación de los patógenos. La bioprotección (que no es estrictamente un asunto científico) es de aparición más reciente, y tiene un fuerte impacto mediático en el público en general.

Veámoslo con un ejemplo. En muchas ocasiones, en una instalación NBS₃, puede ser necesaria la preparación de suspensiones bacterianas o víricas de alto título infeccioso, implicando el uso de centrifuga para la separación de fases. A lo largo de este proceso de centrifugación, la bioseguridad, la biocontención y la bioprotección juegan sus papeles, a veces simultáneamente, a niveles que se superponen. La bioseguridad trata de dar respuesta a preguntas como: ¿Cómo centrifugar una suspensión infecciosa manteniendo un riesgo de infección bajo? A través de elementos de protección individual (EPIs), su adecuada utilización, y de unos procedimientos de trabajo razonados y razonables. La biocontención se preocupa de las características de la centrifuga ¿es toda ella hermética y por tanto previene la formación de aerosoles? o ¿sólo el rotor es hermético? ¿Puede la centrifuga ubicarse dentro de una cabina de seguridad biológica (CSB)? ¿Es lógico poner una centrifuga dentro de una CSB sin afectar la direccionalidad del flujo? ¿Puede abrirse el rotor o los cestillos herméticos dentro de una CSB próxima? ¿Cómo es el laboratorio donde la centrifuga se encuentra ubicada? ¿De qué manera circula el aire dentro del laboratorio? ¿Puede el laboratorio ser sellado y descontaminado? Finalmente, la bioprotección busca respuestas adecuadas a preguntas como: ¿Quién tiene acceso permitido en esa instalación, o en ese laboratorio, cuando el trabajo está en ejecución?

¿Quién es el responsable de dar estos permisos o delimitar los perfiles de acceso? ¿Están estos procesos de entrada y salida controlados por medios electrónicos (tarjeta) o biométricos? ¿Hay un sistema de vídeo controlando la actividad en los laboratorios y/o boxes de experimentación animal? ¿Todos los movimientos del personal externo (visitantes, servicios asistencia técnica) dentro de la instalación son directamente supervisados por personal del centro? ¿Hay establecido un control adecuado y exhaustivo del banco de material biológico patógeno del centro?

Si queremos realmente mejorar nuestra preparación y capacidad de reacción en temáticas de bioseguridad tenemos que hacer un esfuerzo en remover o eliminar nuestras prevenciones mentales pero también *departamentales* o *institucionales* a la hora de informar de errores y brechas en la bioseguridad y bioprotección. Debemos perseguir una clara definición de lo que para nosotros constituye una exposición a un agente biológico, reforzar el interés de nuestro personal por entrenamientos en bioseguridad y, tan importante o más que lo citado anteriormente, *gastar dinero* en el mantenimiento de la infraestructura física de biocontención (sistemas electrónicos, mantenimiento de gradientes de presiones, sistemas informáticos de control) de los laboratorios o instalaciones después de su construcción.

INFECCIONES ADQUIRIDAS EN EL LABORATORIO (O EL FRACASO DE LA BIOSEGURIDAD)

Las infecciones adquiridas en el laboratorio (*Laboratory Acquired Infections*, LAI) se definen como aquellas infecciones sintomáticas o asintomáticas, que son contraídas a través de actividades laborales o por estar en el laboratorio, como resultado del trabajo con organismos infecciosos (Kimman et al., 2008; Sewell, 1995; Sulkin, 1961). En

cierto modo suponen el fracaso de las medidas de bioseguridad y biocontención implantadas, aunque ello se deba a una deficiente praxis de un trabajador (lo que habría fracasado es nuestro sistema de entrenamiento y supervisión, entonces).

Se llevan ya contabilizados cerca de 5000 casos con unos 200 muertos, pero las LAIs están disminuyendo desde la década de los años 90, posiblemente por una mejora en las instalaciones y materiales de contención y por una mejora en los protocolos de bioseguridad (Collins y Kennedy, 1999). Además se ha observado una fuerte disminución de los casos debidos a la formación de aerosoles infecciosos, mientras se mantiene la incidencia de los cortes, pinchazos de agujas y salpicaduras (Figura 3); y un desplazamiento de los principales patógenos implicados pasando de *Brucella spp*, *Coxiella burnetti*, *Salmonella typhi* y *Francisella tularensis*, seguido de *Mycobacterium tuberculosis* antes de los años 80 a *Mycobacterium tuberculosis*, arbovirus, *Coxiella burnetti*, Hantavirus y *Brucella spp*, desde los años 80 hasta la actualidad.

!!! Pero todo resulta más complejo !!! Si el microorganismo existe en el laboratorio pero no en la comunidad, podemos estar relativamente seguros del foco y etiquetar la infección de un trabajador como LAI; sin embargo, si el microorganismo también está presente en la comunidad, el origen de la infección ya no es tan fácilmente identificable. Por ejemplo, en Bélgica, en 1995, los trabajadores de laboratorio mostraron una incidencia de tuberculosis 5,4 veces superior a la población general (Ronveaux *et al.*, 1997), valores que también se han encontrado en otros países (Austria, Alemania, Gran Bretaña, Japón)(Collins y Grange, 1999). El riesgo medio anual de seroconversión (medido por la prueba de la tuberculina) es del 1,0% en Canadá (Menzies *et al.*, 2003) en los trabajadores de laboratorio, mucho más alta que el de la población general.

Sin embargo, no nos engañemos. Seguro que no tenemos una idea total de lo que está realmente sucediendo pues no hay requerimiento legal de declaración de las LAIs con excepción del Reino Unido; hemos de contar con una fuerte subestimación desde el momento que muchos trabajadores no lo hacen por temor a ser sancionados, y una buena parte de las infecciones proceden de forma subclínica y solo se pueden trazar si se realizan pruebas serológicas periódicas a los trabajadores. Sumemos a ello que algunas infecciones requieren de un largo periodo de incubación antes de manifestarse, lo que hace difícil enlazar la enfermedad con el incidente del laboratorio, si lo hubo.

!!! Atención a las LAIs asociadas con la manipulación y trabajo con animales de experimentación !!! Debemos tener presente que siempre hay un riesgo de transmisión (infecciones zoonóticas) a partir de animales aparentemente sanos, no inoculados experimentalmente. Un claro ejemplo lo tenemos en las cerca de 230 infecciones por hantavirus (2/3 sintomática, 1/3 asintomáticas) en investigadores que creían trabajar con roedores no infectados. La adopción de unas medidas mínimas; guantes, indumentaria de laboratorio, protección respiratoria, es altamente recomendable.

Estas medidas de bioseguridad pasan a ser **obligatorias** cuando se trabaja con animales inoculados experimentalmente, siempre que los patógenos inoculados sean zoonóticos y se haya descrito transmisión aerógena.

CONCLUSIÓN

La seguridad no puede ser alcanzada, o plasmada, en términos absolutos. Esta idea debe quedarnos muy clara. Es un concepto relativo, un ideal inalcanzable si se quiere, definido por un balance entre nuestros márgenes de tolerancia, aceptabilidad y factibilidad, esto es, un equilibrio entre el coste de las medidas de bioseguridad y bioprotección y los beneficios potenciales de dicho trabajo para la sociedad (Kimman *et al.*, 2008).

No busquemos tampoco hacer competir los términos de bioseguridad, biocontención y bioprotección entre ellos para establecer una especie de prevalencia de alguno sobre los demás. Cuidemos que la necesaria bioprotección (pero no aquella superflua) no menoscabe o impida (incluso por la vía de reducción de los fondos disponibles) nuestras actividades y programas basados en pautas y procesos de bioseguridad bien pensados y demostrables. Considerémoslas como lo que son, facetas de un mismo cristal, palabras con significados complementarios que deben usarse en un ambiente general de trabajo responsable, pues estamos manipulando microorganismos patógenos, y nos debemos a los demás, pero también a nosotros. Y en este trabajo responsable, aportando unos conceptos y conocimientos claros y una aplicación estricta de los mismos, los microbiólogos tenemos mucho que aportar, siempre que estemos también interesados en adentrarnos en campos (ingeniería, diseño de instalaciones, legislación) que nos son, en principio, un poco lejanos.

REFERENCIAS

- Appendix 10. *Minimum standards for laboratories working with FMDV in vitro/in vivo*. Adopted by 38th General Session of European Commission for the Control of Foot-and-mouth Disease (EuFMD), 30th April 2009. www.fao.org/ag/againfo/commissions/docs/SecurityStandards_2009.pdf
- CDC y HIH. 2007. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*. 5th edition.
- Collins CH y Grange JM. 1999. Tuberculosis acquired in laboratories and necropsy rooms. *Communicable Disease and Public Health* 2(3): 161-167.
- Collins CH y Kennedy DA. 1999. *Laboratory acquired infections*, 4th ed. London: Butterworth Heinemann.
- Cook-Deegan RM, Berkelman R, Megan Davidson E, FINDER S, Heitman E, Kelley MC, King NMP, Moseley R, Thomas JC, Tilden SJ y Vangsnes NM. 2005. *Issues in biosecurity and biosafety*. *Science* 308:1867-1868.
- Clough G, Wallace J, Gamble MR, Merryweather ER y Bailey E. 1994. A positive, individually ventilated caging system: a local barrier system to protect both animals and personnel. *Lab Animals* 29: 139-151.

- Frasier D y Talka J. 2005. Facility design considerations for select agent animal research. *ILAR Journal* **46**:23-33.
- Gilman EA y Fink RI. Primary barriers and equipment-associated hazards. In: *Biological safety: Principles and Practices 4th edition* Edited by D.O. Fleming and D.L. Hunt. Washington DC, 2006.
- Gronvall GK y Bouri, N. 2008. Biosafety Laboratories. *Biosecur Bioterror* **6**: 299-307.
- Heckert RA y Kozlovac JP. Special considerations for Agriculture Pathogen Biosafety. In: *Biological safety: Principles and Practices 4th edition* Edited by D.O. Fleming and D.L. Hunt. Washington DC, 2006.
- Heckert RA y Kozlovac JP. 2007. Biosafety levels for animal agriculture pathogens. *Appl Biosafety* **12**: 168-174.
- IVBWG-International Veterinary Biosafety Working Group. 2006. *Veterinary Containment Facilities: design & Construction Handbook*. Editors: Peter Mani and Paul Langevin.
- Keller GL, Mattingly SF y Knapke FB Jr. 1983. A forced-air individually ventilated caging system for rodents. *Lab Anim Sci* **33**: 580-582.
- Kimman TG, Smit E y Klein MR. 2008. Evidence-based biosafety: a review of the principles and effectiveness of microbiological containment measures. *Clin Microbiol Rev* **21**: 403-425.
- Manuel J. 2008. Oversight without obstruction: the challenge for high-containment labs. *Environ Health Perspectives* **116**: A487-A489.
- McSweeney E. 1999. Hot times for hot labs. *ASM News* **65**: 743-746.
- Menzies DA, Fanning A, Yuan L, Fitzgerald JM y Canadian Collaborative Group in Nosocomial Transmission of Tuberculosis. 2003. Factors associated with tuberculin conversion in Canadian microbiology and pathology workers. *Am J Resp Crit Care Med* **167**: 599-602.
- Ronveaux O, Jans B, Wanlin M y Uydebrouck M. 1997. Prevention of transmission of tuberculosis in hospitals; a survey of practices in Belgium, 1995. *J Hosp Infect* **37**: 207-215.
- SEMP-Suburban Emergency Management Project. 2009. Biosafety vs Biosecurity: What is the difference? Biot. Report #629, June 28.
- Sewell DL. 1995. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin Microbiol Rev* **8**: 389-405.
- Sulkin SE. 1961. Laboratory acquired infections. *Bacteriol Res* **25**(3):203-209.
- WHO. 2004. *Laboratory biosafety Manual*, third edition, Geneva.



VIII Reunión Grupo de Microbiología Molecular SEM

10-12 Noviembre 2010 | Barcelona, Parc Científic, Auditori Antoni Caparrós

Es un placer anunciar la VIII REUNIÓN DEL GRUPO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DE LA SEM que tendrá lugar en Barcelona del miércoles 10 al viernes 12 de Noviembre de 2010.

Esperamos vuestra participación activa en esta reunión, donde tendremos la oportunidad de conocer los avances más destacados en el campo de la microbiología molecular y podremos debatir las tendencias y desafíos en esta área.

Estamos trabajando en la activación de la página web del congreso, que estará disponible en los próximos días, para poder realizar los trámites relacionados con la inscripción y presentación de comunicaciones.

En próximas comunicaciones os proporcionaremos toda la información necesaria para participar en esta reunión.

Esperamos veros en Barcelona!

Comité organizador
Prof. Antonio Juarez
Dr. Cristina Madrid
Dr. Carlos Balsalobre
Dr. Eduard Torrents



Xemeneia de la Pedrera
Antoni Gaudí. Passeig de Gràcia

<http://www.ibecbarcelona.eu/events/molmicro2010/>

Secretaría Molmicro2010 | C/ Baldiri Reixac 10-12 | 08028 – Barcelona (Spain)
molmicro2010@ibecbarcelona.eu



VIII WORKSHOP “Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria”

(<http://quiro.uab.cat/workshopMRAMA>)

Del 24 al 27 de noviembre de 2009, tuvo lugar el VIII workshop sobre Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria (MRAMA), en la sala de actos de la Facultad de Veterinaria de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB; Bellaterra, Cerdanyola del Vallès), dirigido por los Drs. Marta Capellas Puig y Josep Yuste Puigvert, profesores de Ciencia y tecnología de los alimentos, y organizado por el *Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments* (CERPTA) y el Departamento de Ciencia animal y de los alimentos de la UAB. Celebrado anualmente, el workshop MRAMA, de un contenido aplicado y de futuro, amplía y difunde los conocimientos teóricos y prácticos sobre métodos innovadores para detectar, contar, aislar y caracterizar rápidamente los microorganismos habituales en los alimentos y el agua.

Como cada año, el ponente principal fue el profesor Dr. Daniel Y. C. Fung, de la *Kansas State University* (KSU; Manhattan, Kansas, EUA). El Dr. Fung es catedrático de Ciencia de los alimentos del *Department of Animal sciences and industry*; su especialidad es la microbiología de los alimentos y, dentro de este campo, es un científico de prestigio

internacional en el ámbito de los métodos rápidos y miniaturizados y la automatización. Además, es director del workshop internacional sobre Métodos rápidos y automatización en microbiología, que también tiene lugar anualmente en Manhattan, KS y que cumplió su 29ª edición el pasado junio. Ganador del Premio Internacional del *Institute of Food Technologists* (IFT) en 1997, por la organización de esta serie única de workshops internacionales; el Premio al Mejor Educador Waksman de la *Society for Industrial Microbiology* en 2001; el Premio a la Excelencia en la Docencia Universitaria del *College of Agriculture* de la KSU en 2005; 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: más de 18.000 alumnos y director de 112 estudiantes graduados (33 doctorados y 79 másters). Editor asociado sénior de *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Miembro de honor de la *American Academy of Microbiology*, el IFT y la *International Academy of Food Science and Technology*. En 1995, fue invitado

a dar una conferencia en el Instituto Pasteur de París (Francia) con motivo de la conmemoración del 100º aniversario de la muerte de Louis Pasteur. El Dr. Fung tiene, pues, una larga experiencia en el tema del *workshop*, lo que permitió ofrecer ponencias de gran calidad, de contenidos muy ricos y completos sobre las diversas disciplinas de la microbiología alimentaria. De hecho, al Dr. Fung, también se le conoce como el “padre” de los métodos microbiológicos miniaturizados, porque en este campo fue pionero y actualmente es uno de los investigadores más expertos y especializados del mundo, y ha ensayado con resultados positivos y ha aportado un alto número de técnicas innovadoras. Indudablemente, su presencia fue muy provechosa, y contribuyó a un buen aprendizaje de los métodos microbiológicos más recientes y eficaces.

El *workshop* contó con otros conferenciantes de renombre. Se encargó de la ponencia inaugural la Dra. Cécile Lahelec, directora honoraria de investigación de la *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments* (AFSSA), en Alfort (Francia), que informó exhaustivamente sobre la cooperación internacional en microbiología alimentaria. El Dr. Armand Sánchez Bonastre, director del Servicio veterinario de genética molecular de la UAB y profesor de nuestro Departamento, habló sobre la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método genético puntero para detectar e identificar microorganismos. El Sr. Martín Iorlano, responsable del laboratorio de Microbiología de APSALAB SL, en Reus, explicó su experiencia en la puesta a punto y la implantación de la PCR para *Salmonella* spp. en piensos y materias primas. La Dra. Teresa Esteve Nuez, responsable del Servicio de Análisis biológicos cuantitativos del *Centre de Recerca en Agrigenòmica*, perteneciente al consorci CSIC – IRTA – UAB, en Barcelona, transmitió a los asistentes sus conocimientos sobre la detección, la legislación y la evaluación de riesgos en materia de organismos modificados genéticamente (OMGs). El Sr. David Tomás Fornés, responsable del laboratorio de Microbiología y Biología molecular de ainia.centro tecnológico, en Paterna, participó con una interesante ponencia sobre el control de calidad interno en laboratorios de microbiología. Y el Dr. Ferran Ribas Soler, presidente de la Comisión de Normalización y Validación de la Sociedad Española de Microbiología (SEM), en Madrid, habló sobre estudios de equivalencia europeos entre métodos para enumerar *Escherichia coli* y enterococos en aguas de baño.

Además, asistieron importantes empresas de microbiología, que explicaron y mostraron sus productos (funcionamiento, ventajas y limitaciones, y técnicas en que se basan). Estas empresas, que patrocinaron el VIII *workshop* MRAMA, fueron: 3M España SA (y 3M Deutschland GmbH –Alemania–), AES CHEMUNEX España SA (y AES CHEMUNEX –Francia–), Applied Biosystems SA, BD Diagnostic Sys-

tems, bioMérieux España SA, Bioser SA, Eppendorf Ibérica SLU, GeneSystems SA (parte de Pall Life Sciences), IUL SA, Laboratorios MICROKIT SL, MicroPlanet Laboratorios SL (distribuidor de BioControl Systems Inc y LIOFILCHEM srl), Nirco SL (distribuidor de Neogen Europe Ltd), Olympus España SAU, Oxoid SA (parte de Thermo Fisher Scientific Inc), y Roche Diagnostics SL. También asistió BIOTECON Diagnostics GmbH (Alemania).

El *workshop* ha sido una actividad exitosa, tanto por los ponentes y sus ponencias, como por la asistencia de público y la participación de las empresas de microbiología. Reunió a 197 personas, de diversos colectivos nacionales e internacionales:

1. Laboratorios, consultorías e industrias agroalimentarias: entre otros, de los sectores cárnico y avícola, lácteo, *chips*, *snacks* y frutos secos, bebidas analcohólicas (aguas, zumos de frutas, bebidas refrescantes) y alcohólicas (cervecero, vitivinícola, cava), aromas, ingredientes y aditivos, alimentación animal; y algunos de ámbito no alimentario: biotecnológico, veterinario, cosmético, químico, material para laboratorios, etc.
2. Personal técnico, profesores y estudiantes de la UAB (licenciaturas de Ciencia y tecnología de los alimentos, Veterinaria, Biología; tercer ciclo; y Departamentos de Ciencia animal y de los alimentos, Sanidad y anatomía animales, y Química) y otras universidades y escuelas, como la *Universitat de Lleida*, la *Universitat Rovira i Virgili* (Reus), la Universidad de Zaragoza, la Universidad de Burgos, la Universidad de Córdoba, la *University of Surrey* (Guildford, Reino Unido), la *University of Jordan* (Ammán, Jordania), la *King Abdulaziz University* (Jeddah, Arabia Saudí), la *National University of Malaysia* (Selangor, Malasia), la Universidad Autónoma Chapingo (México), y la *Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril* (Portugal).
3. Otros centros de investigación: *Unitat de Tecnologia dels aliments*, del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries* (IRTA); AZTI – Tecnalia; Nestlé Research Center (Lausana, Suiza); *State Veterinary Institute Prague* y *State Veterinary Institute Olomuc* (ambos de Chequia); e *Institute for Food Microbiology* (Nesher, Israel).
4. Administración: *Agència de Protecció de la Salut* (Barcelona), *Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel* (Instituto Central del Servicio Médico del Ejército; Kronshagen, Alemania), *Royal Medical Services – Jordan Armed Forces* (Ammán, Jordania), *Kenya Bureau of Standards* (Nairobi, Kenia).

También estuvieron presentes la *Associació Catalana de Ciències de l’Alimentació* (ACCA), entidad colaboradora

con el *workshop* MRAMA, y EyPASA – Revista Alimentaria, publicación oficial del *workshop*. Otras entidades que colaboran son la SEM y el Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Research Institute.

Durante tres días, se realizaron unas sesiones prácticas en el laboratorio, en las que se trabajó con algunos equipos y los productos más innovadores dentro del campo de los métodos rápidos y la automatización. Se organizaron otras actividades: (i) talleres sobre Uso de los recursos para microbiología predictiva disponibles en internet, a cargo de la Sra. Montse Vila Brugalla (Agència de Salut Pública, Barcelona); (ii) talleres sobre Inmunosensores electroquímicos para detectar bacterias patógenas, a cargo de las Dras. María Isabel Pividori Gurgo y Anabel Lermo Soria y la Sra. Susana Liébana Girona (Departamento de Química de la UAB); (iii) visitas a una empresa de biología molecular, para Aplicaciones de la PCR en tiempo real.

Hubo una mesa redonda, con el Dr. Fung, otros ponentes, y profesionales de empresas de microbiología y laboratorios de análisis, moderada por el Dr. José Juan Rodríguez Jerez, director del Observatorio de la seguridad alimentaria de la UAB y profesor de nuestro Departamento. Con la mesa redonda, sobre la instrumentación en microbiología de los alimentos, las tendencias del mercado mundial y otros temas de actualidad del sector, y las ponencias del *workshop*, se constató la importancia de la preparación de la muestra y la extracción del ADN previos al análisis por PCR, el interés por la microbiología de las aguas, y la diversidad de necesidades en cuanto a métodos microbiológicos; así como los progresos en el desarrollo de soluciones que aportan rapidez, precisión, sensibilidad y especificidad.

El IX *workshop* MRAMA se celebrará del 23 al 26 de noviembre de 2010



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

El depósito de cepas en las colecciones de cultivos microbianos

Esperanza Garay
Directora de la CECT.

Como es sabido, una de las principales misiones de las Colecciones de Cultivos (CC) o los Centros de Recursos Microbianos (CRM) es aceptar cepas para su conservación a largo plazo. Existen diferentes tipos de depósito:

- **Depósito público**, mediante el cual la información sobre el microorganismo se incorpora al catálogo *on line* de la colección y la cepa está a disposición de los usuarios, sean investigadores, empresas u otras instituciones públicas o privadas. Este tipo de depósito no conlleva gastos para el depositante, pero sí representa para la colección un gasto de personal y de medios para su comprobación y mantenimiento.
- **Depósito restringido**, en cuyo caso ni el microorganismo ni la información sobre el mismo se encuentra a disposición de otros usuarios. No se incorpora al catálogo *on line*, y la colección se encarga de su mantenimiento. Este tipo de depósito sí conlleva un coste para el depositante.
- **Depósito para fines de patentes**, regulado por el tratado de Budapest (www.wipo.int/treaties/es/registration/budapest/). Se trata de un requisito imprescindible para poder tramitar una patente en la que intervengan microorganismos. También conlleva un coste para el depositante.

Es importante resaltar algunos aspectos generalmente poco conocidos por los investigadores que afectan al proceso de depósito y a la duración del mismo:

1. No todas las CC/CRM aceptan cualquier tipo de microorganismo, ya que algunos requieren unas condiciones de cultivo o mantenimiento especiales que pueden caer fuera del ámbito de experiencia del personal de la colección. En caso de duda es necesario contactar con la colección antes de iniciar los trámites o de hacer cualquier envío. Si la colección contactada no puede aceptar el depósito generalmente proporcionará información sobre alguna otra que sí pueda.
2. Los CC/CRM tienen en sus páginas *web* instrucciones y formularios para las diferentes opciones de depósito. Si la colección está reconocida como Autoridad Internacional de Depósito para fines de patentes, los formularios se ajustarán a lo marcado por el tratado de Budapest. Para los restantes depósitos deben ser conformes con el Convenio sobre la Diversidad Biológica (www.biodiv.org) y con las directrices de la OCDE para los Centros de Recursos Biológicos. En el caso de la CECT estos formularios están accesibles desde el apartado Servicios-Depósito de cepas en www.cect.org. Es necesario que el depositante rellene toda la información que se solicita.
3. La CECT especifica en la misma página las condiciones de envío de las cepas para evitar contaminaciones, desecaciones excesivas o roturas. Es importante seguirlas para que las cepas lleguen en buenas condiciones y evitar retrasos o devoluciones.
4. Si se trata de cepas tipo de bacterias o arqueas para la descripción de un nuevo taxón, el Comité Internacional para la Sistemática de Procariotas (ICSP, *International Committee on Systematics of Prokaryotes*), junto con el *International Journal on Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM), exigen que, previamente a la publicación de cualquier nuevo nombre (o combinación), los autores aporten certificados que acrediten la disponibilidad pública de las cepas tipo en al menos dos CC/CRM de países diferentes. La implantación de esta medida ha supuesto algunos esfuerzos adicionales no sólo para los taxónomos sino también para las propias colecciones:
 - a. Los investigadores no siempre son conscientes de que el proceso de expedición del certificado de depósito por parte de la colección implica actualmen-

te no sólo una comprobación de la pureza y viabilidad, sino también de la autenticidad, para lo cual se requiere la realización de diversas pruebas fenotípicas y/o genético-moleculares, que dependen del tipo de microorganismo.

- b. Según el IJSEM, el proceso de obtención de dicho certificado puede tardar de 6 a 8 meses, o incluso más, dependiendo del microorganismo, por lo cual es muy importante que el investigador envíe la cepa a la colección con antelación suficiente, y **nunca cuando ya está el artículo a punto para enviar**. Ni la colección ni el IJSEM son responsables de los retrasos ocasionados en la publicación por causa del retraso en el envío de la cepa.
- c. Por todo ello, muchas colecciones requieren ya el envío del manuscrito donde se va a describir en nuevo taxón o al menos la información sobre la caracterización del mismo con el fin de poder comparar con los resultados obtenidos en la propia colección.

IMPORTANCIA DEL DEPÓSITO DE CEPAS EN LOS CC/CRM Y LOS RETOS QUE SUPONE PARA DICHAS INSTITUCIONES

Además de las cepas tipo, es recomendable depositar en las colecciones públicas o en los Centros de Recursos Microbianos reconocidos las cepas que aparecen en las publicaciones científicas. Las razones para ello son tanto científicas como prácticas:

- Se incrementa la diversidad microbiana mantenida *ex situ*, lo que representa un potencial uso para estudios básicos o aplicados, por lo que se aprovechan mejor los recursos microbianos generados mediante proyectos financiados en su mayor parte con fondos públicos.
- Al estar disponibles para la comunidad científica se posibilita que cualquier otro investigador confirme los resultados obtenidos.

- Se ha comprobado estadísticamente que el índice de impacto de la publicación aumenta de forma considerable, lo cual es beneficioso para los autores / editores de la publicación.
- El hecho de que la cepa esté depositada en una colección garantiza su conservación a largo plazo en buenas condiciones.

Sin embargo, el depósito de microorganismos en régimen público en las CC o CRM supone en la actualidad unos costes de personal y de material elevados. Esto se agrava en el caso de cepas de difícil cultivo o conservación. Además hay que tener en cuenta que la mayor parte de las cepas mantenidas en las CC/CRM no generan suficientes beneficios como para compensar su mantenimiento a lo largo de tantos años.

Actualmente, esta situación afecta a todos los CC/MRC en mayor o menor grado, pero es especialmente grave en aquellas colecciones que, como la CECT, carecen de financiación sostenida por parte de los organismos públicos y dependen exclusivamente de los ingresos obtenidos por el conjunto de servicios prestados o por los proyectos de investigación conseguidos en régimen de competencia pública.



Nuevos socios de la SEM

Altas del 24/11/2009 al 23/4/2010

- | | | |
|-------------------------------------|--|--------------------------|
| • Álvarez Martín, Pablo | • Laureano Adame, Laura | • Roces Rodríguez, Clara |
| • Álvarez Morales, María del Carmen | • Ortega Casamayor, Emilio | • Ruano Gallego, David |
| • García Morales, Luis | • Pérez Davó, Azahara | • Torres Quesada, Omar |
| • González González, Luis | • Pérez Montaña, Francisco | |
| • Jiménez Díaz, Rufino | • Picón Gálvez, Antonia M ^a | |

Recuerdos de mi experiencia postdoctoral

Oscar Zaragoza Hernández

Laboratorio de referencia en micología. Centro Nacional de Microbiología. ISCIII.
Crta. Majadahonda-Pozuelo, Km 2. Majadahonda. 28220 Madrid, Spain.

ozaragoza@isciii.es



Sólo he visto llorar a mi padre cuatro veces: dos por fallecimiento de familiares, una por razones que no vienen al caso, y la cuarta el día que partí hacia Nueva York para comenzar mi estancia postdoctoral. Mi madre también lloró, aunque ella es de lágrima fácil. Ese es uno de los momentos que más recuerdo de aquella etapa, y que me hizo darme cuenta que aquella aventura que comenzaba tenía dimensiones mayores de las que había imaginado.

Foto 1. Fotografía en la entrada del Albert Einstein College of Medicine.

LOS PRELIMINARES

Aunque no llegué a Nueva York hasta finales del año 2001, mi estancia postdoctoral fue un proceso que comenzó antes con los consejos que recibí por parte de **Carlos y Juana María Gancedo**. Durante meses traté de decidir si quería irme fuera de España para hacer un “postdoc”. Aunque sabía que debía hacerlo, el apego a mi familia, la incertidumbre por el futuro, el peso de la tradición de mi generación, que hace que tengamos miedo a abandonar el lecho familiar sin trabajo fijo ni piso a estrenar, y otras razones me impedían decidirme. Y no lo habría hecho sin el apoyo de Carlos y Juana María. “*Creemos que debes hacer una estancia postdoctoral en el extranjero porque eres competitivo*”, me dijeron. Esas palabras fueron el impulso definitivo que necesitaba. Carlos comenzó a preguntar cuáles eran los mejores investigadores del campo de las infecciones fúngicas. Así consiguió una lista en la que destacó un nombre: **Arturo Casadevall**. Gran productividad y laboratorio en Nueva York, ciudad que soñaba con conocer. ¡Parecía ideal! Le envié un correo preguntando la posibilidad de incorporarme a su grupo, y me contestó al cabo de pocos minutos. Recuerdo que sufrí algo de taquicardia, ya que aquellas líneas que me disponía a leer podrían cambiar el rumbo de mi vida. ¡Y vaya si lo hicieron! Arturo Casadevall escribió un correo agradeciendo mi interés y preguntando por personas de referencia. Él también me envió el nombre personas a las que me invitaba a contactar para que me dieran referencias sobre él. Este detalle me hizo darme cuenta que estaba tratando con una gran persona. Finalmente, y tras varios correos, me confirmé que podía incorporarme a su grupo.

Durante los días previos a mi partida sólo pensaba con gran tristeza en cómo meter 27 años de vida en dos maletas de 22 kilos y un bulto de mano. Mi madre solucionó ese problema y me proveyó de lo esencial, aunque todavía no entiendo cómo pudo acoplar también casi cuarenta pares de calcetines, alguno de los cuales conservo aún sin estrenar. Al menos tenía la tranquilidad de que Marimar (novia entonces y actual esposa y madre de mi hijo) viajaba conmigo para ayudarme a instalarme. En medio de los preparativos, ocurrió un suceso que conmocionó al mundo, los atentados del 11-S. Recuerdo que esos días intercambié con el que iba a ser mi futuro jefe unos correos muy emotivos, cuyo contenido queda entre nosotros. Curiosamente, mi visado fue sellado el día anterior, con lo que no tuve problemas burocráticos. Ese acontecimiento elevó no solo mi nivel de nerviosismo, sino también el de mi familia, e hizo que los días previos a mi partida tuvieran connotaciones casi dramáticas. Sin embargo, la decisión estaba tomada, y llegué a Nueva York el día 4 de octubre de 2001.

LLEGADA A NUEVA YORK

Marimar sólo se quedó conmigo las dos primeras semanas, y sin ella todo habría sido más difícil. El estudio que me había sido asignado estaba totalmente diáfano, sin nada que ocultara un centímetro cuadrado del parquet. Ella fue quien lo amuebló con los requerimientos mínimos, lo que facilitó mi adaptación. El día que regresó a España fue uno de los más tristes de mi vida, y a partir de ahí debía encarar una nueva etapa sólo. ¡Y no fue fácil! Recuerdo que al principio los viernes estaba deprimido, ya que llegaba el fin de semana y la soledad. Los domingos por la tarde, en cambio, la idea de volver a ver a mis compañeros me volvía a animar.

Cuando pasaron las dos primeras semanas (las cuales dediqué a establecerme), llegó el día de mi incorporación, pero tras la primera media hora en el laboratorio, estuve a punto de regresar a España. No entendía a la mitad de mis compañeros por su acento, y además, me enteré que la manera de comunicarse con el jefe era por correo electrónico, o previa cita con la secretaria, algo que no entraba en mi cabeza. Pero resistí mi primer impulso y decidí incorporarme a aquella rutina. Con el tiempo, terminé considerando aquello como normal.

MI RELACIÓN CON EL JEFE

MI primer encuentro con Arturo Casadevall marcó mi opinión sobre él y nuestra futura relación. Yo esperaba que me explicara el proyecto en el que iba a trabajar. Pero para mi sorpresa, su primera frase fue una pregunta: “*What do you want to do when you leave my lab?*” Nunca me hubiera esperado esa pregunta, con lo que le contesté lo primero que me vino a la cabeza. A continuación expuso cuál era su visión de cómo debía orientar mi trabajo para reforzar mi formación. Me pidió que durante los primeros días hablara con la gente del laboratorio, y decidiera qué proyecto quería desarrollar. Al cabo de una semana, nos volvimos a reunir y discutimos unas ideas que había tenido. Entonces me dio mi primera lección de inmunología, y usando un papel que tenía suelto por el despacho, me explicó el llamado *Damage-Response Framework*, que es un nuevo marco conceptual que explica las relaciones patógeno-huésped (Nat. Rev. Microbiol. (2003) 1:17-24). Todavía conservó aquel papel (Figura 2) como conservó primeras ediciones de Pasteur, Cajal y una postal de Koch. Comencé a trabajar en aquel proyecto, basado en microarrays, pero también en otros más menos ambiciosos para aprender determinadas técnicas. Tras seis meses, decidí abandonar los *microarrays*, que sólo me daban problemas y dolores de cabeza, y me concentré en los mini-proyectos, que a la larga fueron muchos mucho más productivos. Aquella fue una de las decisiones más acertadas de mi estancia allí.

Desde aquella primera reunión tuve una gran admiración por Arturo. Siempre fue un hombre afable, humilde, comprensivo. Siempre tuvo palabras de aliento, hasta el punto que un día le dije que por favor dejara de halagarme y sólo me dijera cuando no estaba contento con mi trabajo. Recuerdo una vez en que todos mis resultados eran erróneos por mal diseño de un protocolo. Se lo comuniqué a Arturo con cierto miedo, y aunque no esperaba una bronca acalorada, sí esperaba un toque de atención para que no cometiera esos errores de principiante. Nada más lejos de la realidad, ya que su respuesta fue: “*I am very happy that you found out about this, and I am sure that now it will work*”. Ésa era su manera de motivar a su gente, y por ello, no me importaba trabajar ni fines de semana ni durante la noche. Arturo se levantaba muy temprano, y a las tres y media de la madrugada ya estaba trabajando. En varias ocasiones nos intercambiábamos mensajes a las 4 de la madrugada, al final de los cuales me ordenaba me fuera ya a dormir, igual que haría un padre con su hijo. Por supuesto, también tuvimos nuestros desencuentros. Ahora me avergüenzo de mis reacciones soberbias e irrespetuosas en aquellas situaciones. Pero también entonces Arturo me demostró su categoría humana, ya que nunca utilizó su jerarquía como jefe para imponer su criterio, y siempre trató de solventar la situación de la manera más satisfactoria. Solía reunirme con él una vez a la semana para discutir el trabajo.

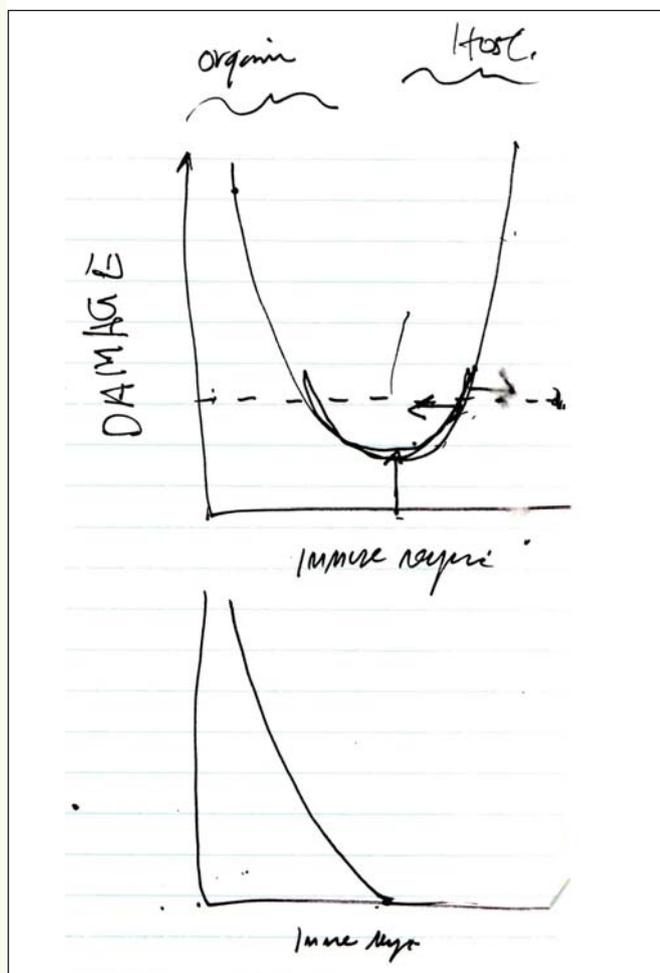


Foto 2. Representación gráfica del Damage Response Framework. Esquema original de Arturo Casadevall.

Pero muchas veces usábamos ese tiempo para hablar política, economía, etc. Y me contaba historias de su vida que le habían enseñado algo, como la historia del manicomio de la Habana o la historia de la piscina, las cuales recuerdo con enorme cariño. Además, todos los días pasaba por el laboratorio antes de irse a casa. Recuerdo que se sentaba a mi lado, con los pies encima de otra silla, y hablábamos un rato. Resultó que varios de mis artículos se originaron en esos momentos en los que sus pies estaban a la altura de la cadera. Dejé su laboratorio cuando me concedieron un contrato “Ramón y Cajal”. Cuando se lo comuniqué, fue muy directo: “I know that you don’t like compliments, but I am very proud of you”, palabras que casi me hicieron llorar. El día de la despedida quise darle las gracias, pero comencé a llorar y no pude articular palabra. Me abrazó, y se fue diciendo simplemente “It’s hard”. Aunque entonces fue muy triste, creo que mi estancia allí no pudo terminar de mejor manera.

EL CENTRO DE TRABAJO

El laboratorio estaba situado en el Albert Einstein College of Medicine, que es un centro de primera línea para rea-

lizar investigación dónde tuve todos los recursos para llevar a cabo mi trabajo, incluso tecnologías de última generación. Además, aprendí mucho sobre Albert Einstein, figura que despierta en mí una gran curiosidad intelectual. Aunque el Centro estaba situado en el Bronx (barrio tabú para turistas) yo me movía por sus calles con total confianza y le llegué a coger cariño. Bien es verdad el Bronx no es sólo lo que sale en las películas, y el Einstein está situado en una de las zonas “buenas”. Vivía en la residencia de postdoctorales, que era un edificio antiguo con muchos problemas. Pero en mi estudio llegué a sentirme casi como en casa, con estampitas de la Virgen que me había dado mi madre, fotos de amigos, y mil recuerdos de España que Marimar iba dejando por las paredes y estanterías cada vez que me visitaba.

Aunque mi rutina diaria la realizaba en el Bronx, iba a Manhattan con gran frecuencia. Mis primeros recuerdos están asociados al ambiente creado por el 11-S y posteriores ataques con carbunco, pero enseguida me di cuenta que Manhattan tenía una enorme potencia cultural. Además de ver muchos shows de Broadway, me hice aficionado a la Ópera, y todos los años veía decenas de representaciones. Incluso Plácido Domingo me firmó su biografía y pude cruzar unas palabras con él. Fui a toda clase de restaurantes y cada vez que probaba una comida nueva era una gran experiencia. Me aficioné a correr, y llegué a clasificarme para la maratón de Manhattan, algo que espero realizar algún día. Y miles de otras experiencias. Hago énfasis en este aspecto porque la ciudad y el entorno durante el postdoctoral tienen una gran influencia en el estado de ánimo, y por tanto, en el trabajo.

Nunca podría haber disfrutado tanto mi estancia postdoctoral sin las amistades que nacieron allí. He pensado mucho en la razón por la que surgieron lazos tan fuertes y he llegado a la conclusión que la razón es porque actuábamos como familia. Mis mejores amigos surgieron a partir de un accidente que me obligó a pasar por el quirófano. Fue entonces cuando aparecieron una serie de personas con las que forjé una enorme amistad. No había día en el que no nos juntáramos para cenar, o ir al cine, o cualquier otra cosa que nos ofreciera Nueva York. Sara, Irene, Andrés, Sara G, Gemma, Nareen, Daniel, Jose, Loles... Ninguno vive en Madrid, pero siguen siendo mi núcleo de amigos más íntimos.

La distancia con mi familia y mi novia fue sin duda el mayor punto negro de mi estancia allí. Pero fue esa distancia la que hizo que todos los años me visitaran mis padres (y mi hermano en alguna ocasión), y pudiera hacerles de guía, no sólo en Nueva York, sino también en el Gran Cañón, Las Vegas, Washington, y otra decena de lugares que mis padres nunca habrían conocido de otra manera. Igualmente, la distancia con Marimar hizo que disfrutáramos de nuestros encuentros de manera especial, lo cual contribuyó a afianzar nuestra actual relación.

Ya han pasado más de cuatro años desde que regresé a España, y en retrospectiva creo que fui afortunado en todos los aspectos que involucran una estancia postdoctoral: elección del grupo (en lo que el consejo del director de tesis es una ayuda inestimable), entorno que me rodeó, amistades, relación con el jefe y desarrollo del trabajo. El tiempo que pasé en Nueva York me ayudó a crecer, no sólo como investigador, sino también como persona. Las experiencias que viví y los amigos que encontré siguen siendo parte de mi vida actual, amigos entre los cuales tengo el privilegio de contar ahora con Arturo Casadevall.

El singular mundo de las levaduras enológicas

Jesús Manuel Cantoral Fernández y María Esther Rodríguez Jiménez

Laboratorio de Microbiología Enológica. Facultades de Ciencias.

Universidad de Cádiz. 11.510 Puerto Real (Cádiz)

jesusmanuel.cantoral@uca.es

mariaesther.rodriguez@uca.es

UN POCO DE HISTORIA

Las levaduras han formado parte de la civilización humana desde tiempos remotos. Las evidencias más antiguas datan del Neolítico; se han encontrado restos de hace 7400-7000 años correspondientes a sales tartáricas y resinas en algunos ejemplares de cerámica de aquella época. El ácido tartárico sólo está presente en las uvas en grandes cantidades y se ha postulado que la resina, concretamente del árbol *Pistacia*, se añadía como un conservante antibacteriano, suponiendo este hecho una fuerte evidencia sobre procesos de vinificación en aquel periodo prehistórico.

También se han descubierto evidencias de vinos hechos en Egipto y Fenicia hacia el año 5000 a.C. Investigadores actuales han demostrado que el ADN aislado de un supuesto jarro de vino de Abydos (3150 a.C.), tenía una secuencia estrechamente relacionada con el genoma de levadura modernas (*Sacharomyces cerevisiae*). La revelación del proceso de elaboración se atribuye a Osiris, entre los egipcios, y a Dionisios, entre los griegos. Los hebreos afirman que fue Noé el primero en cultivar la vid, y el vino siempre ha ocupado un lugar preeminente entre sus ritos y costumbres, así como en las fiestas de los primitivos griegos y romanos.

A su vez, los chinos fueron expertos conocedores del arte de fermentar el mosto de la uva y los primeros en reglamentarlo. En el año 2285 a.C. un hombre fue castigado severamente por mezclar vino de uva con licor de arroz. Hacia el año 2000 a.C. el vino empezó a producirse en Grecia y Creta. Más tarde, los romanos extendieron la vinificación por todo el Mediterráneo y en el 500 a.C. el vino empezó a producirse en Sicilia, Italia, Francia, España, Portugal y norte de África. Los cultivos de vides también se extendieron por los Balcanes y los romanos los extendieron hacia Alemania y otras partes del norte de Europa hasta alcanzar la Bretaña.

Ya en el siglo XVI, la viticultura se practicaba ampliamente en Francia, siendo uno de los mayores productores mundiales. Pero surgieron problemas: había que buscar la forma de evitar que la fermentación secundaria, producida en el vino de champagne después de embotellado, explosionara. El tapón hasta entonces utilizado estaba formado por tejido de lana y lacre. Fue el monje Dom Perignon (1638-1715) quien introdujo la utilización del corcho, técnica que había aprendido de los españoles, junto con una botella de mayor grosor. Con eso, la segunda fermentación pudo desarrollarse normalmente, dando origen al champagne. Fue entonces cuando el monje pronunció

su conocida exclamación: “¡Venid rápido hermanos, estoy bebiendo estrellas!”

Durante el siglo XVI, los exploradores europeos introdujeron la vid en el Nuevo Mundo y en el siglo XVII, los colonizadores alemanes lo implantaron en el sur de África. Posteriormente, en 1697, se extendió la vinificación a California, y más de un siglo después a Australia y Nueva Zelanda. En España, no sabemos con seguridad en qué lugar comenzaron a realizarse los primeros cultivos de vid, ni quienes fueron los introductores de las técnicas de elaboración del vino. Diversas fuentes apuntan que los primeros viñedos se habrían asentado en el litoral sudoccidental andaluz, constituyendo el punto de entrada y la zona geográfica de las viñas españolas más antiguas.

Esta teoría está avalada por la presencia de los fenicios en la Península hace unos 3000 años aproximadamente. Este pueblo comerciante fundó un puerto en el sudoeste al que llamaron Gades (Cádiz, en la actualidad). Después, se trasladaron hacia el interior, plantando vides en las montañas circundantes. Concretamente, en las Ruinas del Castillo de Doña Blanca (El Puerto de Santa María) se han encontrado restos de lo que podrían haber sido lagares de elaboración de vino, que datan del siglo IV a.C.

El vino que se producía en esta región llamada de Ceret (Jerez) se elaboraba cociendo el mosto recién fermentado para obtener altas graduaciones alcohólicas y poder así resistir el transporte hacia el Mediterráneo. A estos vinos se les añadía agua para su consumo y presentaban muchas impurezas porque la fermentación era imperfecta, razón por la que se les añadía ámbar, pez, resinas, etc. Hacia el año 138 a.C. comenzó la dominación romana, iniciándose una corriente comercial muy importante de productos de esta región hacia la metrópoli. En el año 711 da comienzo la dominación árabe, que en el sur de España duró más de cinco siglos. Durante todo ese tiempo, la zona sudoccidental siguió siendo un importante centro de elaboración de vinos, a pesar de la prohibición coránica. La producción de pasas y la obtención de alcohol con fines medicinales actuaban en cierta forma como excusas para el mantenimiento del cultivo de la vid y de la elaboración de vinos, hasta que la conquista por Alfonso X el Sabio en 1264 supuso un gran cambio para los vinos de esta región.

La elaboración del vino fue probablemente la primera experiencia del hombre con las levaduras. Aquellos primitivos viticultores se dieron cuenta de que solamente era necesario prensar las uvas y luego dejar el zumo (llamado mosto) fermentar, ya que

Jesús Manuel Cantoral Fernández

(Vega de Monasterio, León, 1955) es licenciado en Biología por la Universidad de León. Realizó la Tesis Doctoral (1988) con el Dr. Juan Francisco Martín en distintos aspectos moleculares del hongo *Penicillium chrysogenum*, completando su formación en las Universidades de Bristol (U.K.), Berlín (Alemania) y Washington (Seattle, EEUU). En el año 1991 se incorpora a la Universidad de Cádiz creando el grupo de "Microbiología Aplicada" centrando sus trabajos en levaduras enológicas, tanto de vinos jóvenes como sometidos a "crianza biológica", así como en hongos fitopatógenos. En el año 2003 obtiene una cátedra de Microbiología en la Universidad de León y posteriormente en el 2007 en la de Cádiz, donde continúa dirigiendo el grupo de investigación. Desde el año 2008 es Director del Departamento de "Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública", siendo nombrado en el año 2009 Académico Correspondiente de Mérito de la Real Academia de Medicina de Cádiz.



la superficie de las uvas contiene células de levadura preparadas para llevar a cabo la fermentación: **"Me gustaría imaginar el momento, perdido en la noche de los tiempos, cuando un desconocido morador de cuevas, quizás un oscuro benefactor del fructífero reino de Mesopotamia, felizmente descubrió que los zumos de frutas son mucho más sabrosos si se dejan reposar un tiempo. Quizás al mismo tiempo, algunos ancestros fermentadores desconocidos de *Saccharomyces cerevisiae* hicieron que su fortuita supervivencia fuera mejorada por la asociación con el hombre, y decidieron dejar al inseguro medioambiente y convertirse en el primer microorganismo domesticado"** (A. Vaughan y A. Martini, 1995).

Pero el concepto de levadura como microorganismo responsable de llevar a cabo la fermentación, no fue desarrollado hasta 7000 años más tarde, gracias a los trabajos de Pasteur (1872) y otros investigadores, que revelaron por primera vez el mundo oculto de la actividad microbiana. Al saber que las levaduras eran las responsables de la biotransformación del mosto (compuesto principalmente por glucosa y fructosa) en alcohol y dióxido de carbono, los vinificadores pudieron controlar el proceso desde el viñedo hasta la planta de embotellamiento.

Con el posterior desarrollo de las técnicas microbiológicas, las levaduras con características apropiadas fueron seleccionadas y en 1890, Müller-Thurgau introdujo el concepto de "fermentación inoculada" empleando cultivos puros de levaduras. Como resultado, la calidad y la cantidad de vino producido fueron enormemente mejoradas.

Los primeros análisis genéticos de levaduras comenzaron a mediados de la década 1930-1940, con la introducción de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en el laboratorio. Desde entonces, el mantenimiento de cultivos con fines investigadores, ha dado lugar a lo que hoy conocemos como cepas estándar (o de referencia) de laboratorio. La gran mayoría deriva de un aislamiento realizado por Emil Mrak a partir de higos en descomposición en Merced, (California, 1938). Dicho aislamiento, conocido como EM93, corresponde a una levadura *S. cerevisiae* diploide, donadora de al menos el 85% del genoma de la cepa haploide S288C, secuenciado en el año 1996.

BIOLOGÍA DE LAS LEVADURAS

Las levaduras son hongos unicelulares. Su nombre procede del verbo latino *levare* (levantar), debido al efecto característico producido en algunos sustratos sobre los que actúan, como por ejemplo la masa del pan. Pueden ser clasificadas dentro de dos grupos filogenéticos: levaduras ascomicetos y levaduras basidiomicetos (en ambos casos se dan las formas teleomórfica y anamórfica). La forma teleomórfica es la forma imperfecta de la levadura o forma asexual, mientras que la forma anamórfica es la forma perfecta o sexual. La especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* pertenece al grupo de los ascomicetos, que se caracterizan por encontrarse las esporas sexuales o ascosporas en el interior de una bolsa o asca.

Saccharomyces cerevisiae posee un ciclo de vida complejo, teniendo la capacidad para reproducirse en estadios haploides o diploides, con la formación de cigotos entre células haploides compatibles. El tipo de reproducción es normalmente por brote o gemación mediante mitosis (asexual). Sin embargo, bajo privación de nutrientes, durante la fase estacionaria, se induce la esporulación o reproducción sexual. Tras la meiosis, una célula diploide genera cuatro esporas haploides encapsuladas en el asca (ascosporas). A su vez, las esporas libres pueden entrar en un ciclo vegetativo haploide o bien formar un cigoto diploide mediante conjugación.

Existen tres tipos de células vegetativas en función del tipo sexual, llamadas a , α (ambas haploides) y a/α (diploides). Las células del tipo a y α se conjugan entre sí para dar lugar a cigotos de tipo a/α , cuya eficiencia de apareamiento es mucho más alta que entre las del mismo tipo (que es muy baja o no se da). Los tipos sexuales en *S. cerevisiae* están controlados por un locus en el cromosoma III, llamado MAT (del inglés *mating type*, apareamiento) pudiendo aparecer dos alelos, a y α . Las cepas que pueden mantenerse estables durante muchas generaciones como haploides, siendo a ó α se llaman heterotálicas. Las cepas homotálicas son aquellas en las que se induce el cambio en el tipo (a cambia a α y viceversa) y la unión, para formar un cigoto, se realiza entre células que proceden de una misma espورا, de manera que la célula madre es la que cambia el tipo y se une con una célula hija de tipo opuesto para dar un diploide a/α . La mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son por lo general diploides y homotálicas y resulta difícil que en ellas se induzca la esporulación y por tanto la reproducción sexual.

El material genético de las levaduras se reparte entre el genoma nuclear, genoma mitocondrial y plásmidos citoplasmáticos. Además, el citoplasma puede contener dos moléculas de ARN bicatenario, que confieren a la levadura el llamado "factor killer". El ADN cromosómico en una célula diploide de *S. cerevisiae* constituye alrededor del 80% del total, con un tamaño estimado de 2×10^4 kilobases (kb) que se reparte entre 32 cromosomas lineales (16 pares de cromosomas), cuyos tamaños oscilan entre 200-2200 kb, aproximadamente. El cromosoma más grande es el XII, siendo además el más variable debido a que contiene el ADN ribosómico; es decir, genes que codifican para las distintas subunidades de ARN ribosómico: 25S, 18S, 5.8S y 5S, que forman parte estructural de los ribosomas. Estos genes ribosómicos, se encuentran repetidos en tándem alrededor de 100 veces en el cromosoma XII.

El ADN mitocondrial está constituido por un sólo cromosoma circular cerrado de doble cadena de aproximadamente 75-85 kb. Como ocurre con la mayor parte de las mitocondrias, en el caso de las levaduras existen muy pocas proteínas necesarias para las mitocondrias y que sean codificadas por ellas. Existe una clase de mutantes mitocondriales denominados *petite*, en los que la

mayor parte de la síntesis de proteínas mitocondriales está abolida debido a largas delecciones en el ADN mitocondrial. Tales mitocondrias no son funcionales y las levaduras que las contienen son incapaces de realizar la respiración aunque pueden crecer anaeróbicamente (fermentación). En la especie *S. cerevisiae* se ha puesto de manifiesto la existencia de un plásmido de ADN bicatenario circular de 2 μm de tamaño que contiene aproximadamente 6,3 kb y que se presenta en un número de entre 60 y 100 copias en el citoplasma.

Además, en el citoplasma, pueden aparecer dos moléculas lineales de doble cadena de ARN que están relacionadas con una toxina o “factor killer”. Estas dos moléculas de ARN son de diferente peso molecular y se denominan L y M. El tamaño del genoma de L es de 4.5 kb, mientras que el segmento M varía entre 1.3 y 2 kb. M codifica para dos tipos de proteínas, una toxina y un factor inmunitario, y L está relacionada con la síntesis de la cubierta proteica tipo vírico que envuelve ambas moléculas.

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco tipos de toxinas killer, K_1 , K_2 , K_3 , K_{28} y K_{3GR1} , siendo K_1 la de mayor agresividad, aunque no se considera importante en vinificación porque su óptimo de actividad se encuentra a un pH de 4.6-4.8. En cuanto a K_3 y K_{3GR1} , parece ser que son variantes del tipo K_2 . Las cepas killer aisladas de la fermentación son generalmente del tipo K_2 y K_{28} , debido probablemente a que el bajo pH óptimo para la actividad de estas toxinas se encuentra en el mosto (pH 2.8-3.8). Las levaduras vínicas silvestres (indígenas) con fenotipo killer están muy extendidas por muchas regiones del mundo. La presencia de estas levaduras en el mosto y posteriormente en la fermentación puede significar un problema en las fermentaciones que son inoculadas con levaduras seleccionadas, ya que si el inóculo está preparado con levaduras sensibles, como son muchas de las levaduras comerciales, pueden llegar a ser suprimidas por las cepas killer durante la fermentación. Como consecuencia se pueden producir fermentaciones lentas o incluso paradas, y aumentar la acidez volátil, la producción de H_2S y aromas indeseables.

PROCESOS DE VINIFICACIÓN. SELECCIÓN DE LEVADURAS

La fermentación alcohólica comienza en los depósitos de fermentación, una vez que el mosto, obtenido tras el prensado de las uvas, se clarifica y se corrige adicionando ácido tartárico. La transformación del mosto en vino es un proceso microbiológico muy complejo en el que están implicadas distintas especies de levaduras, las cuales metabolizan el azúcar del mosto generando etanol y dióxido de carbono. La reacción química más simple de la fermentación fue la propuesta por Gay-Lussac, aunque el proceso es mucho más complejo y en él están implicadas al menos 12 reacciones distintas y diversos productos secundarios. Tras la fermentación se obtienen vinos con una graduación de 11° en grado alcohólico (v/v).

Durante la fermentación espontánea de los mostos se produce una sustitución secuencial de las distintas especies de levaduras, de manera que se pueden diferenciar tres fases durante el proceso. En la primera fase cuando el grado alcohólico es bajo predominan levaduras de diversos géneros como *Kloeckera*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Rodotorula*, *Kluyveromyces*, etc. Tales levaduras aseguran el inicio de la fermentación pero a medida que ésta avanza y aumenta el grado alcohólico son desplazadas por otras pertenecientes al género *Saccharomyces*, siendo las cepas de la especie *S. cerevisiae* las principales responsables de la fermentación. Es esa diversidad de cepas de levaduras la que aporta al vino la complejidad y tipicidad en las características sensoriales.

María Esther Rodríguez Jiménez

(Puerto de Santa María, Cádiz, 1971) es licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Cádiz. Realizó la Tesis Doctoral con los Drs. Jesús Manuel Cantoral y Laureana Rebordinos con el título “Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas” (2007). Sus trabajos se han centrado en la caracterización de levaduras enológicas mediante el uso de técnicas moleculares y posterior selección para el uso como levaduras iniciadoras de la fermentación, así como su seguimiento e implantación en el proceso de vinificación, mejorando sustancialmente las propiedades organolépticas del vino y garantizando sus peculiaridades de producción. En la actualidad se encuentra realizando una estancia postdoctoral en el CSIC-IATA de Valencia bajo la supervisión de los Drs. Emilia Matallana y Agustín Aranda.



Las fermentaciones espontáneas pueden aportar alta calidad a los vinos con un carácter típico de la región donde se producen, proporcionándoles así diferenciación y un valor comercial añadido (Fleet, 2008). El inconveniente de estos procesos naturales es que son impredecibles, pudiéndose producir inicios tardíos, paradas o fermentaciones lentas o proliferación de levaduras contaminantes u otras indígenas que no aporten al vino las características deseadas. Aún así, en numerosas bodegas tradicionales europeas se siguen realizando fermentaciones espontáneas utilizando una adecuada combinación de conocimientos artesanales y tecnológicos que aseguran el éxito del proceso. Una alternativa a las fermentaciones espontáneas son las fermentaciones inoculadas a partir de cultivos iniciadores preparados con levaduras seleccionadas. Normalmente estas levaduras están disponibles en el mercado en forma de concentrados secos activos (levaduras secas activas, LSA) y su uso en la mayoría de las bodegas se ha convertido en una práctica habitual para asegurar la reproducibilidad del producto final año tras año. Sin embargo, la utilización de estas levaduras, normalmente foráneas de la zona productora, presenta algunos inconvenientes como es la pérdida en la tipicidad de los vinos.

Todos estos aspectos están proporcionando nuevos retos para mejorar las cualidades y valor de los vinos obtenidos con fermentaciones inoculadas. Uno de estos retos es la utilización de levaduras autóctonas seleccionadas (LAS) en una zona productora determinada, y otro es la utilización de cultivos iniciadores mixtos como alternativa al uso de cultivos puros.

En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo la selección de levaduras autóctonas para la mejora de un vino blanco elaborado por Bodegas Barbadillo S.L. en Sanlúcar de Barrameda. El estudio implicó, primero caracterizar la diversidad de cepas presentes en la fermentación espontánea, para tener un mayor conocimiento de las cepas más representativas del proceso y posteriormente evaluar las características enológicas de esas cepas en condiciones de laboratorio.

Las técnicas moleculares que permiten la caracterización de levaduras industriales y discriminan entre las distintas cepas son habitualmente la electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Figura 1) y el análisis del polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial (Figura 2).

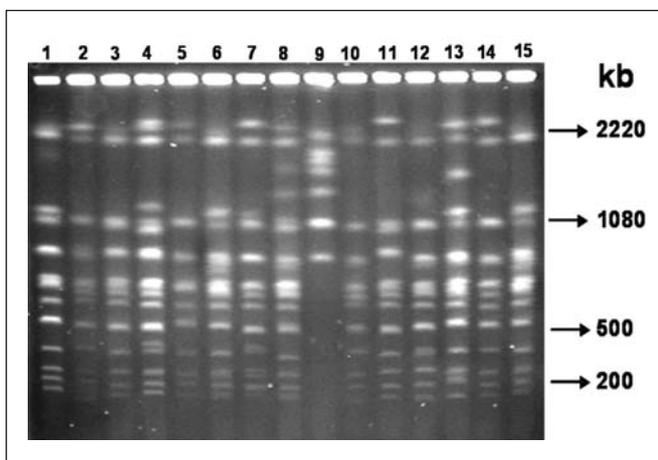


Figura 1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE). Cariotipo electroforético de 15 cepas de levaduras autóctonas aisladas de la fermentación espontánea en la cosecha del año 1999. El aislamiento 9 corresponde a una levadura no-*Saccharomyces*, detectada por no presentar las cuatro bandas típicas de *S. cerevisiae* presentes por debajo de 500 kb en el gel de electroforesis.

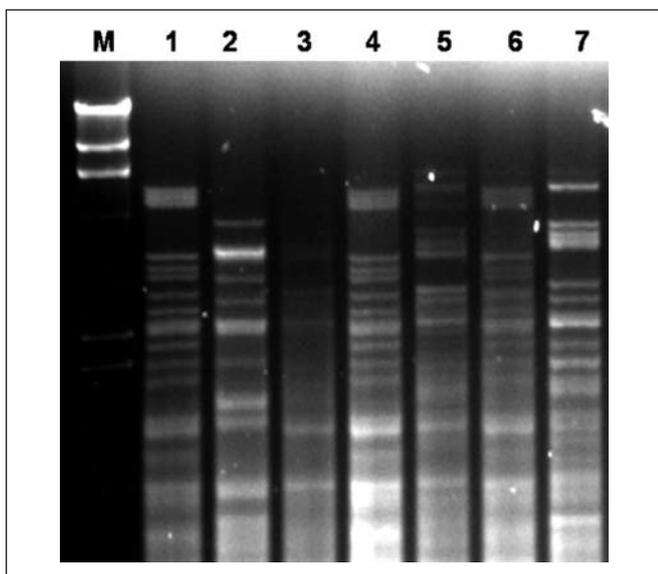


Figura 2. Longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial. Perfiles de restricción del ADN mitocondrial de distintos aislamientos de levaduras (1-7) para la enzima de restricción *HinfI*. M corresponde al marcador λ -*HindIII*.

La primera técnica analiza el número y tamaño de los cromosomas de las levaduras y la segunda mide variaciones en la secuencia del ADN mitocondrial afectado por los sitios de corte de determinadas endonucleasas de restricción.

Tras seleccionar tres levaduras autóctonas y probarlas en condiciones industriales en varias campañas, comprobamos, mediante cariotipo electroforético, que no todas fueron buenas competidoras en las fermentaciones y sólo una de ellas se encontraba de forma mayoritaria en las fermentaciones, de manera que posteriormente sólo utilizamos esta levadura para inocular las fermentaciones. En los años en los que esta levadura fue predominante, los vinos obtenidos fueron de mejor calidad.

En nuestra opinión, para asegurar el buen desarrollo de la levadura inoculada durante el proceso, es necesario que el cultivo iniciador esté bien adaptado a las condiciones finales de fermentación. Uno de los criterios a tener en cuenta en la preparación del inóculo iniciador sería por ejemplo esperar a que tuviese un contenido en azúcar bajo, de esta forma al adicionarlo al mosto, el medio quedaría parcialmente alcoholizado evitando así el desarrollo de levaduras no deseadas que normalmente están presentes en el mosto (Rodríguez *et al.*, 2010).

LAS LEVADURAS DE “VELO DE FLOR” DE LOS VINOS DE “CRIANZA BIOLÓGICA” (FINOS Y MANZANILLAS)

Las levaduras de “velo de flor” son las responsables del proceso de “crianza biológica” (Figura 3) de los vinos producidos en el marco de Jerez y Sanlúcar de Barrameda en la provincia de Cádiz y de Montilla-Moriles en la de Córdoba, así como en otras regiones vitivinícolas del mundo, como Sudáfrica, California, Cerdeña o Hungría. Estas singulares levaduras, constituyen un caso especial de levaduras vínicas que aparecen al final de la fermentación alcohólica del vino, formando una biopelícula en la superficie que se denomina “velo de flor” ya que aparecen de manera especial en primavera (periodo de la floración). El “velo de flor” surge de forma espontánea como un mecanismo adaptativo que permite a las levaduras desarrollarse en un medio en el que están obligadas a asimilar etanol y glicerol mediante respiración, que son las principales fuentes de carbono una vez agotados los azúcares fermentables. Estas levaduras son las únicas capaces de desarrollarse en el vino tras el proceso de encabezado (adición de alcohol vínico hasta llegar a una concentración de etanol del 15-15,5 %).

La crianza del fino en el Marco de Jerez, tiene un primer periodo de envejecimiento estático en botas o depósitos (sobretablas), a continuación se somete al proceso de envejecimiento dinámico mediante el sistema de criaderas y solera. Este sistema consiste en una serie de filas de botas de roble (600 litros de capacidad), cada una de las cuales contiene vino del mismo tipo y con el mismo grado de crianza (escala). Las botas no se llenan por completo, se deja vacía una sexta parte de su capacidad, lo que genera una amplia superficie y una cámara de aire que permite el desarrollo de estas levaduras filmógenas en dicha superficie. En la fila más próxima al suelo está el vino más viejo (1ª escala o solera), de donde se extrae el vino (saca) para el embotellado. Las botas de la solera se rellenan (rocío) con vino de la fila superior (2ª escala o 1ª criadera), que se rocían a su vez con vino de la siguiente (3ª escala) y así sucesivamente con una serie de escalas hasta llegar a las sobretablas, que se rellenan con vino nuevo (15 % etanol) (Figura 4). Entre las diversas transformaciones de interés enológico que las levaduras de flor producen sobre la composición del vino destaca la liberación de acetaldehído, que es producido directamente mediante oxidación de etanol como primer paso para su asimilación. El acetaldehído aporta al vino el olor punzante y característico del fino, por lo que se considera su concentración en el vino como un índice del grado de crianza. Además, el acetaldehído es punto de partida de numerosas reacciones que se producen durante el envejecimiento y que contribuirán decisivamente al buqué y color que definen a los finos.

Se han realizado múltiples trabajos para caracterizar las levaduras de velo de flor, en los cuales se pone de manifiesto que en las barricas de crianza aparecen casi exclusivamente levaduras de la especie *S. cerevisiae*, aunque se pueden diferenciar cuatro grupos según pruebas de asimilación y fermentación de azúcares

Figura 3. Proceso de Vinificación. Proceso de vinificación representando el conjunto de operaciones que se realizan desde la recogida de la uva en el viñedo hasta la obtención de los distintos tipos de vinos. Tras la fermentación alcohólica, se obtienen vinos jóvenes con 11° alcohólico (v/v). La adición de alcohol a estos vinos hasta obtener 18° permite obtener los vinos olorosos bajo crianza físico-química; mientras que la adición de alcohol hasta 14-15° permite la obtención de finos y manzanillas bajo crianza biológica.

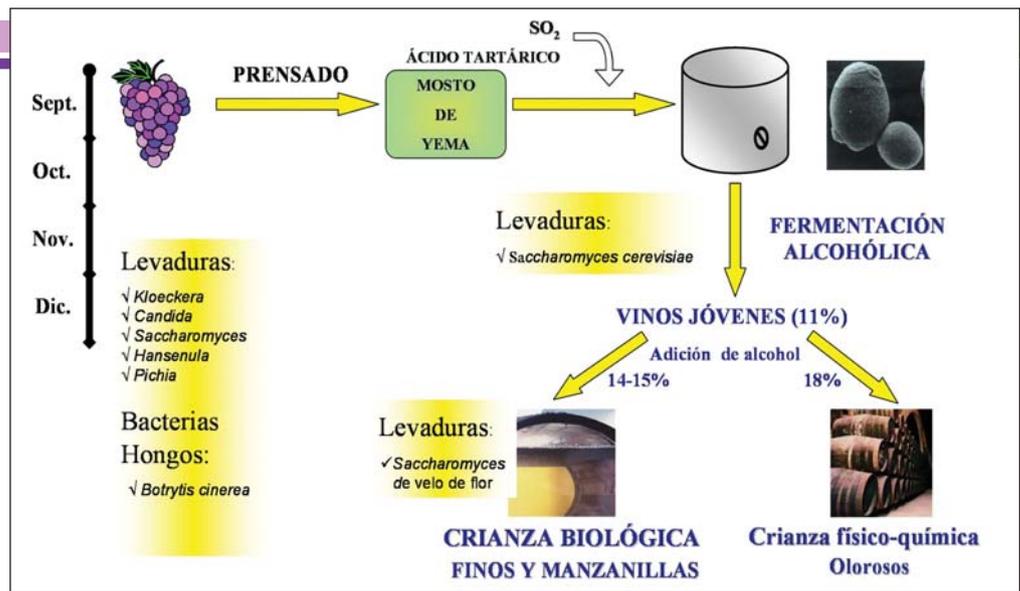


Figura 4. Crianza Biológica
 Izquierda: Dinámica del proceso de envejecimiento del vino fino mediante criaderas y solera (la más cercana al suelo). Derecha: Aspecto de la película (biofilme) de levaduras de velo de flor formada en la superficie del vino durante la crianza biológica. Estas levaduras tienen dos funciones principales: i) contribuir con su metabolismo a las características organolépticas de los finos y manzanillas y ii) aislar al vino del aire evitando así que se oxide.



que se catalogan como razas fisiológicas: *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* y *rouxii*. El desarrollo de las técnicas de Biología Molecular ha permitido caracterizar genéticamente estas levaduras, concluyendo que estos grupos son muy heterogéneos, apareciendo una gran variabilidad genética entre ellas que podrían reflejar la selección artificial debido al sometimiento de estos organismos a condiciones industriales tan específicas. Nuestro grupo ha llevado a cabo una amplia caracterización de estas levaduras en un sistema dinámico de envejecimiento del vino de “criaderas y solera” utilizando las técnicas moleculares de PFGE y los RFLP-ADNmt, descritas en el apartado anterior, llegándose a establecer una correspondencia entre un determinado tipo de levaduras presentes en el velo y el estado de envejecimiento del vino (Mesa et al., 1999, 2000)

Las levaduras de velo de flor tienen una presencia constante en la bodega (desde que se comenzó la crianza biológica de vinos hace unos 200 años) y se encuentran sometidas a una fortísima presión de selección que incluye su crecimiento en presencia de grandes cantidades de etanol (15-15,5%) y acetaldehído (200-800 mg/L), dos inhibidores del crecimiento celular con demostrada actividad mutagénica. Por ello, estas levaduras son de especial interés para la realización de estudios de evolución cromosómica. En nuestro laboratorio hemos realizado un estudio novedoso del polimorfismo cromosómico al comparar dos cepas de levaduras industriales mediante el uso de “chips” de ADN (*microarrays* o *micromatrices*) de *S. cerevisiae*, que ha puesto de manifiesto los mecanismos específicos de recombinación y las secuencias afectadas por éstos, que posibilitan la evolución de estas cepas indus-

triales y su adaptación al ambiente (Infante et al., 2001). La hibridación comparativa del genoma entre estas dos cepas de velo de flor puso de manifiesto que ambas poseen amplificaciones de grandes regiones genómicas. Las amplificaciones responden a fenómenos de reorganización cromosómica mediados por puntos calientes de recombinación estratégicamente situados en el genoma. Además, los “amplicones” contienen genes clave para la adaptación de las levaduras de flor al ambiente extremo en el que se desarrollan, y muchos de ellos se encontraron sobreexpresados para comparar el transcriptoma de dichas cepas con cepas de laboratorio no adaptadas al ambiente industrial.

Estos resultados proporcionaron evidencias de que las reorganizaciones cromosómicas pueden funcionar como un mecanismo general de evolución adaptativa para las levaduras que crecen en ambientes muy selectivos. De manera que los agentes químicos como el etanol y el acetaldehído, presentes en altas concentraciones en el medio, provocan roturas de la doble hélice de ADN en puntos sensibles del genoma de las levaduras. La reparación de dichas roturas por mecanismos alternativos a la recombinación homóloga genera grandes reorganizaciones cromosómicas que dan lugar, tras la división mitótica, a cambios en el genoma que permiten la aparición de cepas mejor adaptadas al ambiente. La caracterización de los mecanismos de evolución adaptativa del genoma de estas levaduras de velo de flor fue la primera vez que se realiza en levaduras industriales y ha proporcionado un modelo de evolución genómico global íntimamente ligado a la influencia ambiental que puede ayudar a comprender los modelos de evolución actuales (Infante et al., 2003).

LEVADURAS ENOLÓGICAS, VINO Y SALUD

Hablar de levaduras enológicas conlleva tratar, al menos escuetamente, algunos aspectos más interesantes sobre el vino y la salud. A fin de cuentas como ya dijera el Dr. Gregorio Marañón **“Vivir, es defenderse de la vida que nos va matando. En esta lucha, la eficacia del vino es incalculable”**.

Se podría definir el vino, de manera sencilla, como una solución hidroalcohólica ácida (3, 4 unidades de pH), conteniendo una dispersión coloidal acuosa con más de 500 sustancias, minerales, orgánicas, en estado sólido, líquido y gaseoso, de las cuales más de un centenar son volátiles y olorosas. El contenido de etanol en el vino oscila entre 90 y 150 mL por litro, dependiendo de la variedad de uva, tipo de vinificación y zona de producción, principalmente.

Aunque los beneficios saludables del vino han sido experimentados y reconocidos desde hace siglos, muchas de sus propiedades sólo han sido estudiadas con rigor y desveladas hace relativamente poco tiempo. Cada vez se conocen más efectos beneficiosos del vino en materia de nutrición y salud, especialmente los relacionados con el sistema cardiovascular. Esta actividad de prevención biológica del vino está justificada por su contenido, en concentraciones significativas, de diversos compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, resveratrol, etc.) que tienen una gran capacidad protectora de las lipoproteínas LDL frente a la oxidación.

En 1991 los Drs. Curt Ellison (Boston) y Serge Renaud (Lyon) presentaron un llamativo informe sobre lo que se ha venido llamando **“la paradoja francesa”**. Así, concluyeron que la menor mortalidad cardiovascular de los franceses se debía a su consumo diario de 300 a 400 mL de vino. En efecto, a pesar de tener iguales niveles de colesterol en sangre, la tasa de mortalidad por causas cardiovasculares en Francia supone un tercio de la observada en EEUU. Esta revelación desencadenó gran interés en todo el mundo por confirmar el papel beneficioso del vino consumido regularmente y con moderación, y por describir su modo de acción en el organismo, por ejemplo, contribuyendo a evitar la aglutinación de las plaquetas sanguíneas. El consumo moderado reduce en un 20% el riesgo de cáncer, infarto de miocardio y accidentes vasculares cerebrales.

La mayoría de las sustancias beneficiosas se acumulan en el hollejo de la uva. El vino tinto es más conveniente que el vino blanco debido a su proceso de elaboración, ya que el mosto se maceira con la piel y las pepitas, permitiendo que las sustancias saludables que contiene la piel de la uva pasen al vino. Además, la uva negra es más rica en taninos. La capacidad antioxidante del vino está directamente relacionada con su contenido en polifenoles.

En los últimos años, estudios científicos muestran que la ingesta comedida de vino es beneficiosa para nuestra salud, en especial para la prevención de enfermedades coronarias. Por supuesto, los beneficios para la salud derivados del consumo de vino en la dieta sólo se producen si hay un consumo prudente. Hábito que corresponde a un estilo de vida y a una cantidad recomendable por persona.

Asimismo, las bebidas alcohólicas elevan los niveles sanguíneos de colesterol HDL, conocido como **“colesterol bueno”**, porque remueve el exceso de colesterol del organismo, y disminuyen la tendencia de la sangre a coagular evitando la formación de trombos. Como ya se ha dicho, los compuestos antioxidantes del vino, son los responsables de disminuir la oxidación de las LDL (partículas de lipoproteínas de baja densidad o **“colesterol malo”**).

Este conjunto de observaciones, implica el redescubrimiento del valor medicinal de las bebidas alcohólicas que existía en la antigüedad, lo que no es una sorpresa para los estudiosos de

la historia del uso de alcohol. Antecedentes históricos y culturales, relacionan vino con salud y longevidad y existen numerosos testimonios que señalan que el vino, en especial en la cultura mediterránea, ha estado siempre asociado con efectos provechosos para la salud.

Recientemente, ha surgido un nuevo término asociado al vino: **“el enoturismo”**. El vino no se vende sólo, sino que, en gran medida, está asociado a la imagen del país o zona que lo produce. El beneficio del turismo se ha comprobado en varias experiencias internacionales, como es el caso del Napa Valley, situado en la costa de California en EEUU. Este valle es conocido mundialmente, no sólo por la excelente calidad de sus vinos, sino por la gran industria paralela dedicada al ocio que se mueve en torno a sus viñedos, no en vano recibe cerca de 8 millones de visitantes cada año. Otro ejemplo ilustrativo proviene de Australia que, gracias a una acertada campaña de promoción turística del país, evoca un ambiente de sol, playas, y ocio. Aquí, en España, numerosas bodegas han recuperado antiguas mansiones, palacios, castillos y edificios históricos, o bien modernos arquitectos diseñan bodegas llamativas por su arquitectura vanguardista, convirtiendo el mundo del vino en un foco de turismo, ocio y bienestar. A fin de cuentas y como certeramente afirmara el ilustre sir Alexander Fleming **“Es la penicilina la que cura a los humanos, pero el vino es el que los hace felices”**. Frase ligeramente modificada con motivo de su visita a las bodegas jerezanas en el año 1948, cuando después de degustar las bondades de estos vinos generosos dijo: **“Si la penicilina salva a los enfermos, el oloroso resucita a los moribundos”**.

AGRADECIMIENTO

A los compañeros que con su trabajo han forjado la pequeña historia del grupo de Microbiología Enológica de la UCA: Laureana Rebordinos, Juan José Mesa, Juan José Infante, Paco Deben, M^a Luisa Espinazo y a las últimas incorporaciones: Eugenia Muñoz y Paula Arместo. También a los Proyectos que lo han sostenido: 1FD97-0820-C04-04, J.A. ATT-03-2003, PETRI 95-0855 OP, así como la valiosa colaboración (OTRI) con las Bodegas Sandeman-Copri-mar y Barbadillo S.L.

BIBLIOGRAFÍA

- Fleet GH. 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, **8**: 979-995.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM y Young ET. 2001. Whole genome characterization of flor vellum wine yeast variants of *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarrays. *Yeast*, **18**-S1 (16-09). XXth International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology: Biotechnology and Industrial Applications.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM y Young ET. 2003. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics*, **165**: 1745-1759.
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L y Cantoral JM 1999. Characterization of yeasts involved in the biological ageing of sherry wines. *Food Science and Technology*, **32**: 114-120.
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L, Sánchez JA y Cantoral JM. 2000. Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **5**: 15-21.
- Rodríguez ME, Infante JJ, Molina M, Domínguez M, Reboordinos L y Cantoral JM. 2010. Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *J Appl Microbiol*, **108**: 1292-1302.
- Vaughan-Martini A y Martini A. 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J Ind Microbiol*, **14**:514-522.

CECT, año 2009



Esperanza Garay

Colección Española de Cultivos Tipo

SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

Como continuación de la certificación obtenida en 2004 según la norma ISO 9001:2000 para “la preparación, venta y distribución de cultivos microbianos (bacterias, hongos y levaduras)”, y la ISO 9001:2008 en diciembre de 2008, la CECT ha superado satisfactoriamente en diciembre la auditoría de seguimiento para esta última norma.

INVESTIGACIÓN (*)

- Proyectos:** La CECT ha participado en 4 proyectos de investigación, dos a nivel nacional y dos internacionales. De estos últimos cabe destacar el inicio con fecha 1 de febrero de 2009 del proyecto titulado: *European Consortium of Microbial Resource Centres –EMbaRC (FP7-228310)* (www.embarc.eu), en el que participan ocho colecciones europeas.
- Publicaciones y comunicaciones en congresos y reuniones científicas:** El personal de la CECT ha publicado 5 artículos en revistas y ha participado en 18 reuniones o congresos científicos nacionales e internacionales.

FORMACIÓN

El personal de la CECT ha continuado impartiendo el curso: “Conservación y control de cepas microbianas” (Certificado de post-grado teórico-práctico, Univ. de Valencia, XI edición), y ha asistido a diversos cursos de formación.

MEJORAS EN EL PERSONAL

Se han renovado todos los contratos y becas vigentes, y se ha contratado a Amparo Ruvira Garrigues desde julio de 2009 a cargo del proyecto EMbaRC.

CONVENIOS VIGENTES CON ORGANISMOS OFICIALES, EMPRESAS Y CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Contrato de Asesoramiento Técnico entre la *Universitat de València –Estudi General* y el *Institut Valencià D'Art Modern–IVAM*, para el aislamiento e identificación de hongos en las pinturas e instalaciones de éste último.

Convenio con las empresas Sanilabo S.L., Comercial Hospitalaria Grupo 3 S.L., Cientisol S.L., Fernández Rapado Productos Químicos S.A., y Quimimatraz S.C.P., para la distribución de las cepas procedentes de la CECT.

“*Memorandum of Understanding*”, firmado entre la *Universitat de València* y el *KRIBB (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology)*, que incluye a la *KCTC (Korean Collection for Type Cultures)*. El objetivo es fomentar el intercambio de recursos biológicos, personal y técnicas entre ambos centros, así como las actividades de investigación.

SERVICIOS PRESTADOS

Depósitos con fines de patente como Autoridad Internacional:	66
Nuevas cepas en depósito público:	137
Nuevas cepas en depósito restringido:	16
Identificaciones:	90
Cepas liofilizadas por encargo:	12
Cepas suministradas:	3857

Es de destacar el aumento importante en el número de depósitos respecto al año anterior.

(*) Más detalle sobre los proyectos y las publicaciones en la página web (www.cect.org)

MATERIAL DE REFERENCIA MICROBIOLÓGICO

Para facilitar el control de calidad en el laboratorio.

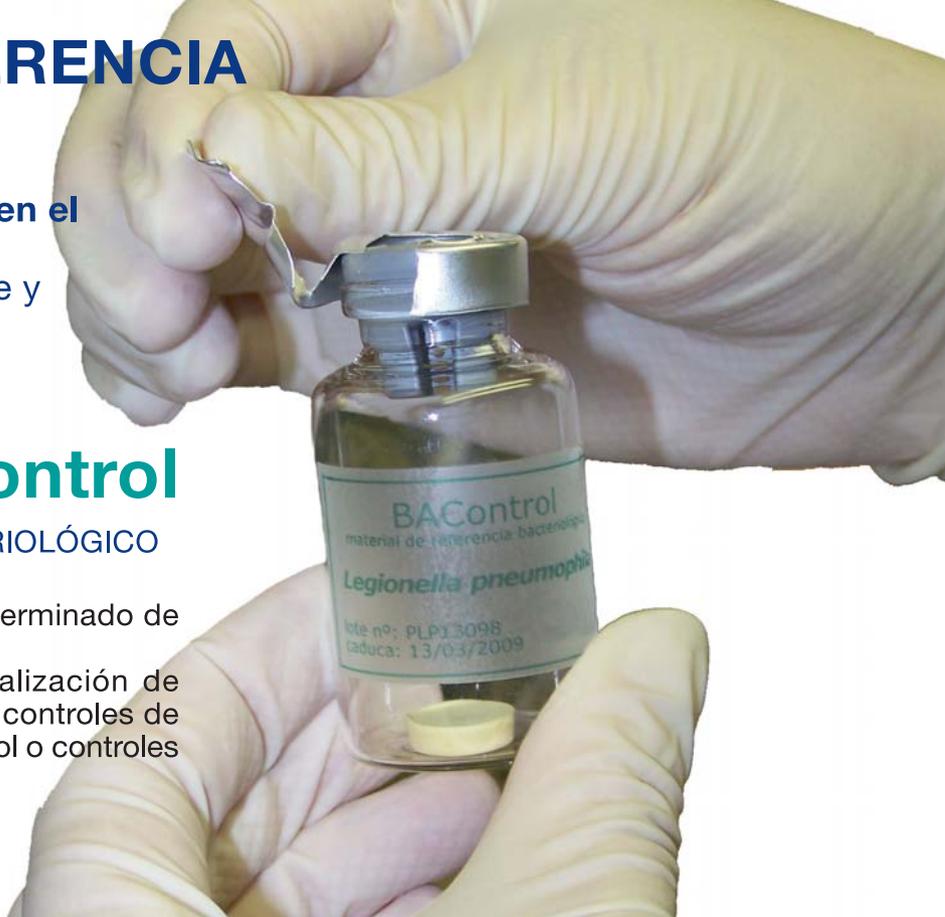
Fácil de usar, rápido, seguro, trazable y cuantitativo.

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 UN VALOR CERTIFICADO,

BACuanti

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



C/ Dracma 16
Pol. Ind. Las Atalayas
03114 Alicante (España)

T. +34 966 10 55 01
F. +34 966 10 55 03

www.ielab.es
ielab@ielab.es