# X Congreso Nacional SEM Microbiología del Medio Acuático

7-9 de septiembre de 2014
Elche/Orihuela

## Programa y Resúmenes

LABAQUA

bertin TECHNOLOGIES

GPS genetic PCR solutions

Laboratorios MICROKIT

Ateneo Cultural Casino Orcelitano

UNIVERSITAS Miguel Hernández

Ajuntament d'ELX

Excmo. Ayuntamiento de Orihuela

## Comité científico

Presidente: Dr. Juan José Borrego García (Universidad de Málaga)

Dr. Anicet Blanch Gisbert (Universidad de Barcelona)
Dr. Albert Bosch Navarro (Universidad de Barcelona)
Dr. Antonio Camacho Gonzalez (Universidad de Valencia)
Dr. Vicente Catalán Cuenca (Labaqua)
Dra. Maria José Figueras Salvat (Universidad Rovira i Virgili)
Dra. Silvia González Acinas (Instituto de Ciencias del Mar)
Dr. José Agustín Guijarro Atienza (Universidad de Oviedo)
Dr. Jesús López Romalde (Universidad de Santiago de Compostela)
Dra. Consuelo Esteve Sánchez (Universidad de Valencia)
Dra. Rosa M. Pintó Solé (Universidad de Barcelona)
Dra. Maria Jesús Pujalte Domarco (Universidad de Valencia)
Dr. Francisco Rodríguez Valera (Universidad Miguel Hernández)
Dr. Antonio Sánchez Amat (Universidad de Murcia)

## Comité Organizador

Dr. Antonio Martínez Murcia (Universidad Miguel Hernández)
Dr. Aaron Navarro García (Genetic PCR Solutions)
Dª Gema Bru Amoraga (Genetic PCR Solutions)
Dª Lyudmyla Korenyuk (Genetic PCR Solutions)

## Secretaría Técnica

***Genetic PCR Solutions™***
**by GENETIC ANALYSIS STRATEGIES S.L.**
*Edificio Quórum 3*
*Parque Científico Empresarial*
*Universidad Miguel Hernández*
*Avda. de la Universidad s/n,*
*03202-Elche (Alicante) Spain*
☎ Phone: 34-965429901
💻 Web: www.geneticpcr.com
☒ e-mail: info@geneticpcr.com

La organización de la X edición del Congreso Nacional SEM de Microbiología del Medio Acuático ha significado una gran satisfacción para nosotros y, por la concesión de esta oportunidad, deseamos expresar gratitud a la Asamblea del Grupo de Microbiología del Medio Acuático de la SEM celebrada durante el último congreso en Barcelona, el 13 de septiembre de 2012.

Nuestro agradecimiento más destacable se dirige a todos los participantes de este congreso que, aun salvando las dificultades que sufrimos todos, han contribuido con su presencia a hacer posible el proyecto. En particular, a los investigadores más jóvenes que han realizado el esfuerzo para traer sus comunicaciones y llevarán el peso de las sesiones científicas, otro de nuestros objetivos.

En la elaboración de nuestro plan y logística hemos venido siempre cogidos de la mano de las instituciones anfitrionas, nuestra Universidad Miguel Hernández, el Excmo. Ayuntamiento de Elche y el Excmo. Ayuntamiento de Orihuela, que avalan con garantía la consecución del programa propuesto. Nuestro agradecimiento por facilitar el trabajo a este Comité Organizador.

Y fundamental ha sido el haber podido contar con la colaboración de empresas tan reputadas como Labaqua S.A., Bertin Technologies y Laboratorios Microkit S.L. Destacamos nuestro agradecimiento al Ateneo Cultural Casino Orcelitano por la cesión de sus emblemáticos salones para los actos en Orihuela.

El peso de la secretaría y organización del congreso ha recaído sobre nuestra empresa de base tecnológica Genetic Analysis Strategies S.L., a la que el presidente de este comité desea expresar sincera gratitud.

El Comité Organizador

| | Domingo 7 | Lunes 8 | Martes 9 |
|---|---|---|---|
| 09:00-11:00 | | Sesión I. Patología de especies acuícolas I | Sesión III. Biodiversidad |
| 11:00-11:30 | | Pausa café | Pausa café |
| 11:30-13:45 | | Sesión II. Patología de especies acuícolas II | Sesión IV. Innovación tecnológica |
| 13:45-15:30 | | Tiempo libre almuerzo | Tiempo libre almuerzo |
| 15:30-16:15 | | Salida autobús Orihuela | Asamblea del Grupo MMA |
| 16:15-17:30 | | Conferencia plenaria | Sesión V. Ecología |
| 17:30-18:30 | Registro y recogida de documentación | Visita Universidad S.XVI y otros Monumentos Nacionales | |
| 18:30-19:00 | | | Acto de Clausura Premios |
| 19:00-19:30 | Acto Inaugural Conferencia de Apertura. Premio Investigación MMA | | Visita Centro Histórico de Elche |
| 19:30-20:00 | | | |
| 20:00-20:15 | | | |
| 20:30-21:00 | Recepción de bienvenida Palmeral de Elche | | |
| 21:00 | | Recepción Casino Orcelitano. Orihuela | Cena de Clausura H. Huerto del Cura Elche |
| 23:00 | | Autobús de regreso | |

## HOTELES Y RESTAURANTES RECOMENDADOS

H
1. Huerto del Cura
2. Hotel Milenio
3. Tryp Ciudad de Elche

⬡ Centro de Congresos Ciudad de Elche

4. Meson San Plácido (tradicional)
5. Donadry (italiano)
6. Tabarca (tapas)
7. ZEKI (turco)
8. Nuestra Barra (tradicional)
9. YAHO (chino)
10. Barra Sabors (menú)
11. Marfil (tapas)

1. **Sede del Congreso**

   Las reuniones tendrán lugar en el **Centro de Congresos Ciudad de Elche** situado en la calle Filet de Fora número 1. El lunes día 8 por la tarde el congreso se desplazará en autobús a Orihuela para visitar, entre otros Monumentos Nacionales, el Colegio de Santo Domingo, antigua Universidad de Orihuela (S.XVI) en donde tendrá lugar una conferencia plenaria seguida de un Cocktail en el Ateneo Cultural Casino Orcelitano.

2. **Registro y recogida de documentación**

   La secretaría para el registro en el congreso se abrirá el domingo 7 de septiembre de 17:30 a 19:00 en la recepción del Centro de Congresos de Elche.

3. **Preparación de sesiones científicas**

   Las presentaciones (formato-PPoint) deben ser enviadas por correo electrónico a la Secretaría del Congreso (xcmma@geneticpcr.com) con antelación suficiente para garantizar su almacenamiento en el ordenador de proyección. La duración de las ponencias no debe exceder de 10 minutos, para permitir que la audiencia participe con sus preguntas y comentarios.

Claustros interiores Universidad y Convento. Orihuela

Palmeral de Elche

**Recepción de bienvenida.** El palmeral de Elche (Patrimonio de la Humanidad) es una gran extensión de palmeras dentro del casco urbano de la ciudad que, con más de 200.000 ejemplares, se considera el más grande de Europa.

**Visita Universidad S.XVI.** Una de las primeras universidades de España. En 1569 se le concedió la categoría plena de Universidad Pública de todas las ciencias y artes, quedando equiparada con las Universidades de Salamanca, Alcalá de Henares y Valencia.

Universidad S.XVI. Orihuela

Palacio de Altamira

**Visita Centro Histórico de Elche.** El palacio de Altamira fue construido a finales del siglo XV, posiblemente sobre una obra anterior del siglo XII o XIII, que formaría parte de las defensas de la villa amurallada almohade. Actualmente alberga el Museo Arqueológico y de Historia de Elche.

**Cena de Clausura.** Tendrá lugar en un enclave único en pleno palmeral. Rodeados de agradables y exóticos jardines, deseamos a todos los congresistas disfruten de este último acto en un clima de tranquilidad.

Hotel Huerto del Cura

## Domingo 7 de septiembre

17:30 – Registro y recogida de documentación

19:00 – Acto Inaugural

19:30 – Conferencia de Apertura. Premio Tesis Doctoral
**Importancia sanitaria de *Arcobacter***
Dr. Arturo Levican Asenjo (Universidad Andrés Bello)

20:30 – Recepción de bienvenida
**Palmeral de Elche (Patrimonio de la Humanidad)**

**Lunes 8 de septiembre**

09:00 – **Sesión I. Patología especies acuícolas I**

Moderadores:
Dra. Alicia Estévez Toranzo
Dr. Jose Agustín Guijarro Atienza

**09:00** **Expresión *in vitro* de genes de virulencia e influencia del Quorum sensing sobre la especie *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* a lo largo de la curva de crecimiento**
Ana Dorinda Cabirta Falque (UVI) Pág.20

**09:15** **El sistema del interferón tipo I protege a juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) frente a la infección por VHSV**
Daniel Alvarez Torres (UMA) Pág.22

**09:30** **Determinación de la expresión génica inducida por el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, utilizando la técnica de RNA-seq en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss***
Natalia Ballesteros Benavides (CIB-CSIC) Pág.24

**09:45** **La salinidad como factor ambiental que regula la expresión de factores de virulencia en la bacteria patógena Photobacterium damselae subsp. damselae**
Ana Vences Lorenzo (USC) Pág.26

**10:00** **Brote infeccioso en anguila Europea silvestre causado por *Shewanella putrefaciens***
Consuelo Esteve Sánchez (UV) Pág.28

**10:15** **Eficacia del lagunaje en la eliminación de *Arcobacter* en aguas regeneradas y prevalencia de especies en función del método de cultivo**
Sara Rubio Arcos (URV) Pág.30

**10:30** **Estudio comparativo de la respuesta inmune innata del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), frente al patógeno *Streptococcus phocae***
Ruben Avendaño Herrera (UNAB) Pág.32

**10:45** **Monitorización de la presencia del herpesvirus de la ostra (OsHV-1) en coquinas de la costa de Galicia**
Juan Luís Barja Pérez (USC) Pág.34

11:00 – Pausa-café

**Lunes 8 de septiembre**

11:30 – **Sesión II. Patología especies acuícolas II**

Moderadores:
Dra. Consuelo Esteve Sánchez
Dr. Juan L. Barja Pérez


11:30 **¿Cómo influye la temperatura en el desarrollo de la lactococosis? Una aproximación transcriptómica e inmunoproteómica**
Mercedes Reguera Brito (UCM) Pág.36

11:45 **Caracterización de un sistema de secreción de tipo III codificado en el plásmido pPHDD2 de *Photobacterium damselae*: implicaciones en la virulencia**
Miguel Balado Dacosta (USC) Pág.38

12:00 **Regulación por sRNAs en la adaptación de *Vibrio harveyi* a la ausencia de nutrientes en agua de mar**
Olatz Ruiz Larrabeiti (UPV/EHU) Pág.40

12:15 **Estimulación del sistema mediado por Interferón tipo I de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) en respuesta a infecciones por betanodavirus**
Ana María Podadera González (UMA) Pág.42

12:30 **Presencia y acumulación de microorganismos patógenos en el mejillón cebra de aguas superficiales de Aragón**
Rosa Mosteo Abad (UNIZAR) Pág.44

12:45 ***Aeromonas piscicola* una especie descrita en salmónidos enfermos de Galicia y que ahora se aísla en Chile y en Finlandia**
Roxana Beaz Hidalgo (URV) Pág.46

13:00 **Identificación y caracterización de bacterias asociadas a mortalidad de juveniles de congrio colorado (*Genypterus chilensis*) cultivado en Chile**
Arturo Levican Asenjo (UNAB) Pág.48

13:15 **Caracterización *in vitro* e *in vivo* de un mutante de *Yersinia ruckeri* en el gen *acrR* con mayor expresión a 18ºC que a 28ºC**
Desirée Cascales Freire (UniOvi) Pág.50

13:30 **Determinación de órganos diana para la multiplicación y persistencia del virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV) en dorada (*Sparus aurata*, L.)**
Estefanía Jiménez Valverde (UMA) Pág.52

**Lunes 8 de septiembre**

13:45 – Tiempo libre-almuerzo

15:30 – Salida autobús

16:15 – Conferencia Plenaria
**Métodos rápidos para el control microbiológico de la calidad del agua potable**
Dr. Vicente Catalán Cuenca (Director I+D+i - LABAQUA S.A.)

17:30 – Visita a Orihuela
**Universidad del S.XVI y otros Monumentos Nacionales**

21:00 – Recepción Ateneo Cultural Casino Orcelitano. Orihuela

23:00 – Regreso a Elche

**Martes 9 de septiembre**

09:00 – **Sesión III. Biodiversidad**

Moderadores:
Dra. Silvia González Acinas
Dr. Antonio Camacho González


9:00 **Relevancia del esfuerzo en secuenciación masiva para la caracterización de la "biosfera rara" del océano profundo**
Pablo Sánchez Fernández (ICM-CSIC) Pág.54

09:15 **Microbiota autóctona de manantiales mineromedicinales clorurado sódicos**
Carmina Rodriguez Fernández (UCM) Pág.56

09:30 ***Neptunomonas atlantica* sp . nov., una nueva especie bacteriana aislada de vieira (*Pecten maximus*).**
Ana B. López Diéguez (USC) Pág.58

09:45 **Una posible nueva especie de *Vibrio*, cercana a *V. ichthyoenteri* y *V. scophthalmi*, aislada de doradas cultivadas.**
Maria Jesús Pujalte Domarco (UV) Pág.60

10:00 **Algas unicelulares pertenecientes a la clase Prymnesiophyceae revelan la diversificación evolutiva de la cianobacteria simbionte UCYN-A**
Francisco Cornejo Castillo (ICM-CSIC) Pág.62

10:15 **Evaluación de la composición bacteriana de los fangos activados mediante FISH y 16S amplicon sequencing**
Inés Arana Basabe (UPV/EHU) Pág.64

10:30 **Controversias taxonómicas dentro de la especie *Edwardsiella tarda***
Noemí Buján Gómez (USC) Pág.66

10:45 **La metagenómica de alto rendimiento revela un papel clave de las actinobacterias en la ecología de los medios acuáticos de agua dulce**
Rohit Ghai (UMH) Pág.68


11:00 – Pausa-café

**Martes 9 de septiembre**

11:30 – **Sesión IV. Innovación tecnológica**

Moderadores:
Dra. Rosa María Pintó Solé
Dr. Antonio Sánchez Amat


11:30 **Desarrollo y validación de diversos reactivos para la detección genética de patógenos mediante qPCR en el marco de AQUAVALENS**
Aaron Navarro García (genetic PCR solutions™) Pág.70

11:45 **Desarrollo de un chip de DNA para la detección de dianas génicas bacterianas de interés en el campo de la acuicultura**
Alejandro Labella Vera (UMA) Pág.72

12:00 **Selección de un vector estable de clonación en la bacteria marina *Marinomonas mediterranea***
María Alejandra Guerrero Rubio (UM) Pág.74

12:15 **Modelo matemático para la cinética de depuración de virus entéricos en moluscos.**
Jesús López Romalde (USC) Pág.76

12:30 **Comparación de los niveles de colifagos somáticos y enterovirus en nuevos procesos de higienización de biosólidos**
Julia Martín Díaz (UB) Pág.78

12:45 **Análisis de la diversidad de *Pseudomonas*-like en tratamiento de aguas con osmosis inversa mediante distintos métodos de identificación.**
Laura Sala Comorera (UB) Pág.80

13:00 **Selección de modelos de qPCR para el análisis de la expresión en *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida.***
Leticia Rivera Fernández (UVIGO) Pág.82

13:15 **Verificación de la infectividad de virus entéricos mediante técnicas moleculares**
Noemí Fuster Rabat (UB) Pág.84

13:30 **Nuevas placas preparadas de medio deshidratado DryPlates® de MICROKIT en microbiología de aguas.**
Jorge Sanchís Solera (MICROKIT) Pág.86


13:45 – Tiempo libre-almuerzo

15:30 – Asamblea Grupo SEM de Microbiología del Medio Acuático

16:15 – **Sesión V. Ecología**

Moderadores:
Dra. María Jesús Pujalte Domarco
Dr. Juan Iriberri Ramalle

16:15 **Abundancia y distribución global de las comunidades de virus marinas en el océano**
Elena Lara de la Casa (ICM-CSIC) Pág.88

16:30 **Patrones de diversidad globales de procariotas y picoeucariotas en el océano fótico y afótico**
Guillem Salazar Guiral (ICM-CSIC) Pág.90

16:45 **Microdiversidad de genomas individuales no cultivados de Bacteroidetes marinos**
Marta Royo Llonch (ICM-CSIC) Pág.92

17:00 **Evaluación de diferentes condiciones y medios de cultivo para la recuperación de *Aeromonas* en aguas regeneradas y mariscos**
Fadua Latif Eugenín (URV) Pág.94

17:15 **Calidad de las aguas de baño en playas turísticas del sur de Gran Canaria. Influencia de factores climáticos: tormentas de lluvias, oleajes y corrientes superficiales marinas. Un estudio a largo plazo.**
Leopoldo O'Shanahan Roca (ICCM) Pág.96

17:30 **Citotoxidad ejercida por el herbicida paraquat sobre la microalga de agua dulce *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard**
Marta Esperanza Llera (UDC) Pág.98

17:45 **Alteración de parámetros fotosintéticos en la microalga marina *Tetraselmis suecica* en presencia de tres antibióticos utilizados en acuicultura**
Marta Seoane Méndez (UDC) Pág.100

18:00 **Sensibilidad a la temperatura de la actividad enzimática extracelular en agua superficial del océano global.**
Naiara Abad Trueba (UPV/EHU) Pág.102

18:15 **Variación estacional de la composición y función de la comunidad bacteriana en el Cantábrico Oriental.**
Ainhoa Uranga Larralde (UPV/EHU) Pág.104

**Martes 9 de septiembre**

18:30 – Acto de Clausura
**Premio Microkit**
**Premios Comunicaciones**

19:00 – Visita Ciudad de Elche
**Ruta por el Centro Histórico de la ciudad**

21:00 – Cena de Clausura del Congreso
**Hotel Huerto del Cura. Elche**

# Comunicaciones y Conferencias

# Resúmenes

Conferencia de Apertura

# Importancia sanitaria de *Arcobacter*

**Levican A**[1,2], Figueras MJ[1]
[1]Unidad de Microbiología, IISPV, URV, Reus; [2]Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile

El género *Arcobacter* incluye especies consideradas patógenas emergentes, asociadas con patologías gastrointestinales y bacteriemia en humanos, y con diarrea, mastitis y abortos en animales. Sin embargo, su importancia sanitaria se ha subestimado ya que no se han definido las rutas de transmisión ni los factores de virulencia presentes en cepas patogénicas; además, los métodos de aislamiento e identificación aún son deficientes. En esta tesis doctoral se demostró que *Arcobacter* puede ser confundido con *Campylobacter* spp., lo que también contribuye a subestimar su importancia sanitaria. También se demostró la existencia de 5 nuevas especies de este género. Para su diferenciación se utilizó herramientas nuevas, tales como el *Matrix Assisted Laser desorption Ionization Time of Flight* (MALDI TOF) y un *Multilocus Phylogenetic Analysis* (MLPA) con los genes *rpoB, gyrB, hsp60, atpA* y *gyrA* concatenados. Considerando todas las especies incluidas actualmente en el género (n=17), se evaluó la utilidad de 5 de los métodos moleculares de identificación son todavía útiles para la identificación de las especies para las que se habían definido, demostrando que todos ellos generan un error entre el 16,8% y 67,4% de las cepas estudiadas. En este sentido, la ampliación del método 16S rRNA-RFLP para poder identificar todas las especies resultó ser de gran utilidad. Por otra parte, en esta tesis se observó una gran diversidad de especies de este género en muestras de mariscos y aguas residuales. Ambas matrices han sido poco estudiados a pesar de su importancia epidemiológica. Es estos estudios se demostró que el uso en paralelo del cultivo por siembra directa y post enriquecimiento, además de incubación en aerobiosis y microaerofilia, favorece la recuperación de una mayor diversidad. También se demostró que la mayoría de las especies de este género, en especial algunas cepas *A. butzleri, A. cryaerophilus, A. skirrowii, A. trophiarum* y *A. defluvii*, son potenciales enteropatógenos para el hombre, ya que presentaron factores de virulencia y fueron capaces de adherir e invadir células intestinales humanas Caco-2.

SESIÓN I. Patología de especies acuícolas I

# Expresión *in vitro* de genes de virulencia e influencia del Quorum sensing sobre la especie *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* a lo largo de la curva de crecimiento.

**Cabirta A**, Rivera L, Farto R, Pérez Nieto MT
Laboratorio de Microbiología marina. Universidad de Vigo

*Aeromonas salmonicida* es uno de los patógenos de peces más importantes en el campo de la acuicultura particularmente en el caso de los salmónidos. El objetivo de este trabajo fue conocer como varía la expresión de genes del sistema de secreción tipo III (SSTT) relacionados con la virulencia de esta especie a lo largo de la curva de crecimiento mediante el empleo de la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR). Para ello se utilizaron una cepa salvaje y dos mutantes de la misma para los genes *asa I/R*. Ambos mutantes presentaban alterado el sistema de comunicación celular Quorum Sensing. Analizando los resultados obtenidos mediante los métodos de Livak y Schmittgen (2001) y Hellemans y Vandesompele (2007), en la cepa salvaje se observaron valores de expresión elevados para los genes de virulencia (*ascC* y *ascV)* entre las 16 y 24h. Dichos valores se vieron significativamente alterados en las cepas mutantes estudiadas. Por su parte, los genes de QS muestran diferencias de expresión significativas entre la cepa salvaje y la mutante correspondiente. De esta forma concluimos que los genes relacionados con la virulencia están afectados por el mecanismo QS ya que sus diferencias se encuentran a niveles altos de densidad poblacional.

# El sistema del interferón tipo I protege a juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) frente a la infección por VHSV

**Álvarez-Torres D**[1,2], Podadera AM[1], Vieytes LP[1], Souto S[3], Bandín I[3], Béjar J[2], Alonso MC[1], García-Rosado E[1]
[1]Universidad de Málaga, Departamentos de Microbiología y de [2]Biología Celular, Genética y Fisiología; [3]Universidad de Santiago de Compostela, Instituto de Acuicultura.

El lenguado senegalés es susceptible a la infección por el Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV) en condiciones experimentales, por lo que es muy interesante determinar el papel del sistema inmune antivírico mediado por el interferón tipo I (IFN I) frente a estas infecciones. Para realizar este objetivo se estimuló el sistema del IFN I de juveniles de lenguado con poli I:C. Trascurridas 24 h estos mismos animales se inocularon con una dosis letal de un aislado de VHSV patógeno para lenguado. Los controles utilizados fueron: (I) animales inoculados con VHSV sin previa estimulación con poli I:C, (II) animales inoculados sólo con medio L15 y (III) animales inoculados únicamente con poli I:C. La actividad antiviral del sistema del IFN I se determinó mediante el cálculo de la mortalidad acumulada a los 30 d post-inoculación (p.i.), la determinación de la productividad vírica, y la cuantificación de ARN viral a distintos tiempos p.i. Los resultados mostraron una drástica disminución de la mortalidad, así como de la síntesis de ARN viral y de la productividad vírica en el grupo estimulado con poli I:C con respecto al grupo no estimulado, lo que indica que el sistema del IFN I de lenguado protege frente a la infección por VHSV. Para determinar el papel del sistema del IFN I en la protección observada, se cuantificó la transcripción de los genes estimulados por IFN (ISG) *Mx*, *ISG15* y *PKR,* detectándose un aumento del nivel de transcripción de los tres ISG en respuesta tanto a poli I:C como a VHSV. Además, la infección con VHSV de lenguados previamente estimulados con poli I:C causó una disminución en la transcripción temprana de los ISG analizados con respecto al control inoculado únicamente con poli I:C. Estos resultados indican una posible actividad antagonista de VHSV frente al sistema del IFN I de lenguado que afecta a los tres ISG analizados.

Este trabajo ha sido financiado mediante el Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía P09-CVI-4579.

# Determinación de la expresión génica inducida por el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, utilizando la técnica de RNA-seq en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* .

**Ballesteros N**[1], Artaza H[1], Alonso MD[1], Padilla G[1], Alonso M[2], Rodríguez S[1], Perez-Prieto S[1]
[1]Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid; [2] Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, NEIKER-Tecnalia, Bilbao

El virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) es un rabdovirus causante de la enfermedad de la necrosis hematopoyética infecciosa que provoca devastadoras epizootias en salmónidos cultivados. El virus es endémico de la costa oeste de Norte América, y en Europa la trucha ha sido la especie más afectada. Nuestro objetivo es contribuir a la obtención de datos sobre cómo se produce la respuesta a la infección viral, previos a ensayos con sistemas de vacunación oral. Para ello, se está estudiando a nivel transcriptómico la respuesta fisiológica e inmunológica del huésped ante la infección de IHNV en dos momentos diferentes: al inicio, cuando aún no existen manifestaciones clínicas (3 días) y en fase de infección aguda, con mortalidad (7 días). Para ello se ha utilizado la técnica de secuenciación masiva RNA-seq, que permite medir globalmente la expresión génica. Uno de los retos de esta técnica, consiste en el análisis de millones de lecturas que generan archivos de gran tamaño, para lo que se requiere una infraestructura con gran capacidad de cómputo, y herramientas bioinformáticas diseñadas para el análisis de expresión diferencial. En el presente trabajo se mostrarán los resultados obtenidos al aplicar RNA-seq usando por un lado el transcriptoma de la trucha arco iris (National Animal Genome Research Program) y por otro, el genoma recientemente publicado (Centre National de Séquençage), con el fin de determinar qué genes se expresan bajo diferentes condiciones (basal, a los 3, y a los 7 días post-infección). Se han obtenido genes involucrados en varias vías metabólicas (“pathways”) que se encuentran diferencialmente expresados entre los distintos grupos.

Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos AGL2010-18454 (MINECO) y 2010-20E084 (CSIC). N. Ballesteros agradece la concesión de una beca FPI del MINECO.

# La salinidad como factor ambiental que regula la expresión de factores de virulencia en la bacteria patógena *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*

**Vences A**, Rivas AJ, Lemos ML, Osorio CR
Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela

*Photobacterium damselae* subsp. *damselae* causa vibriosis en animales marinos e infecciones oportunistas en el ser humano que pueden evolucionar a septicemias mortales. Recientemente demostramos que tres hemolisinas, que incluyen la fosfolipasa D damselisina (Dly) y las dos hemolisinas formadoras de poro $HlyA_{pl}$ y $HlyA_{ch}$, juegan un papel clave en la virulencia para homeotermos y poiquilotermos. Sin embargo, no se conoce prácticamente nada acerca de las condiciones ambientales que regulan la expresión de los factores de virulencia en esta especie. En este estudio demostramos que la expresión de los genes de las tres hemolisinas se reduce significativamente cuando las células se cultivan en valores de salinidad similares a los del agua de mar, con respecto a la expresión obtenida en valores de salinidad próximos a los del medio interno de un hospedador. La salinidad, por tanto, podría actuar como una señal ambiental que limita la producción de las toxinas cuando la bacteria se encuentra en vida libre en el océano. Curiosamente, también encontramos esta misma regulación en la expresión del operón que codifica las subunidades de la enzima ureasa, actividad enzimática que se encuentra en varios genomas de *Vibrio*. Mediante el análisis de los proyectos genoma en curso en nuestro laboratorio, identificamos un homólogo de *oscR* en *P. damselae* subsp. *damselae*. OscR es una proteína reguladora dependiente de la osmolaridad en *Vibrio cholerae*. Cuando analizamos la expresión de los genes de virulencia de *P. damselae* en un mutante *oscR* con el fin de investigar su papel en la regulación mediada por salinidad, encontramos que *oscR* no está implicado en dicha regulación. Por tanto, debe existir otro regulador, por el momento desconocido, que juegue en *P. damselae* el papel que OscR juega en *V. cholerae*. En estos momentos estamos llevando a cabo análisis genéticos con transposones y genes *reporter*, destinados a la búsqueda de nuevas proteínas reguladoras candidatas.

# Brote infeccioso en anguila Europea silvestre causado por *Shewanella putrefaciens*

**Esteve C**[1], Bandín I[2], Alcaide E[1]
[1]Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València, Burjassot (Valencia); [2]Unidad de Ictiopatología -Patología Viral-, Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela

Durante la campaña de pesca 2014 los pescadores de l'Albufera (Valencia) observaron ejemplares muertos o en mal estado entre las anguilas capturadas. Ante esta situación, se realizaron dos muestreos en los meses de febrero y marzo de 2014, recogiéndose un total de 27 ejemplares vivos de anguila con y sin signos patológicos, a los que se les efectuó análisis microbiológico, virológico, y parasitológico. Los signos patológicos observados fueron: i) lesiones degenerativas en ojos y/o mandíbula; ii) úlceras en la base de la aleta anal; iii) olor a putrefacción. De todos los peces que mostraban dichos síntomas se aisló la bacteria *Shewanella putrefaciens*, bien a partir de lesiones externas, bien de éstas y además a partir de hígado y/o riñón. La prevalencia de Shewanellosis en las anguilas del lago, estimada a partir de los ejemplares analizados, fue del 32%. No se diagnosticaron virosis en dichos ejemplares pues tan sólo el 4% de los mismos, fue positivo para IPNV. La prevalencia de *Anguillicola crassus* en la muestra analizada fue del 76%. Desde 2003 hasta 2009, hemos estudiado el estado sanitario de las anguilas de L'Albufera, (253 peces analizados), y en este tiempo la prevalencia de bacteremias fue siempre inferior al 15%, y además *Shewanella putrefaciens* sólo se aisló en el 0,8% de los ejemplares como cultivo mixto junto con *Aeromonas* sp. Se discute los posibles cambios ambientales que han podido favorecer la proliferación de este microorganismo y su acción como patógeno de la anguila Europea.

# Eficacia del lagunaje en la eliminación de *Arcobacter* en aguas regeneradas y prevalencia de especies en función del método de cultivo

**Rubio-Arcos S**, Silvera-Simón C, Salas-Massó N,Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ
Unidad de Microbiología, IISPV, URV, Reus

El género *Arcobacter* incluye 18 especies, consideradas algunas de ellas (*Arcobacter butzleri* y *Arcobacter cryaerophilus*) patógenos emergentes, que pueden ser transmitidos al hombre y a los animales a través del agua y los alimentos. El objetivo de éste trabajo, enmarcado en un proyecto nacional (AGL2011-30461-C02-02), es estudiar la prevalencia de *Arcobacter* en aguas residuales sometidas a un proceso de tratamiento terciario por lagunaje para determinar si existe una reducción de estas bacterias. Esto se evaluó con dos métodos de aislamiento, cultivo directo y tras un paso de enriquecimiento en 26 muestras, 13 del agua de entrada y 13 de salida del lagunaje. Tras concentrar por filtración (0.45µm) la muestrase realizó una siembra directa en agar sangre (30ºC, 48h) y lo mismo tras un enriquecimiento (30ºC, 48h) en caldo Arcobacter-CAT. El recuento se realizó por el NMP y los asilados se identificaronen paralelo por m-PCR y 16S rRNA-RFLP. En 24 muestras (92.3%) se aisló y detectó *Arcobacter* y el recuento medio en el agua de entrada fuede $6{,}17x10^{6}$ NMP/100ml mientras que en la salida fue de $6{,}38x10^{3}$ NMP/100ml. Esto indica que el tratamiento terciario por lagunaje produce una reducción del 99,94%.Se obtuvieron503 aislados, 74.3% se identificaron como *A. butzleri*, 25.4% como *A. cryaerophilus* y un aislado (0.2%) como *Arcobacter ellisii*. El 65% de los aislados de *A. butzleri* fueron recuperados tras el cultivo enriquecido, ocurriendo lo contrario para*A. cryaerophilus* que dominó en el cultivo directo (71,7% de los aislados). En conclusión se demostró que el lagunaje fue altamente efectivo en la reducción de *Arcobacter* y que el paso de enriquecimiento desvirtúa la incidencia real de las especies. Esto podría explicar la mayor prevalencia de *A. butzleri* en los estudios que utilizan enriquecimiento.

# Estudio comparativo de la respuesta inmune innata de salmón del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), frente al patógeno *Streptococcus phocae*

Soraya Salazar[1], Alejandro J. Yáñez[2,3], **Avendaño-Herrera R**[1,2,3]
[1]Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile; [2]Instituto de Bioquímica y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Chile; [3]Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Concepción, Chile

*Streptococcus phocae* es una bacteria Gram-positiva que en Chile afecta sólo al salmón del Atlántico, aun cuando comparten el área de cultivo con trucha arcoíris. Dicha susceptibilidad podría estar determinada por componentes de la respuesta inmune innata del pez y cómo éste responde cuando está en presencia de la bacteria. En este estudio se analizó la respuesta de los principales componentes del sistema inmune innato a 2 cepas de *S. phocae* aisladas de salmón (LM-08-Sp y LM-13-Sp) y otras 2 de foca (ATCC 51973$^T$ y P23). Al evaluar el efecto de mucus y suero de ambas especies, se observó que sólo aquellos provenientes de trucha arcoíris ejercen un efecto inhibitorio sobre *S. phocae*. Precisamente, la actividad de la lisozima en mucus y suero de trucha arcoíris es mayor comparado con salmón del Atlántico ($P<0,05$). A pesar que la capacidad fagocítica de macrófagos estimulados con ATCC 51973$^T$ y P23 no mostraron diferencias, con LM-08-Sp y LM-13-Sp se detectó una capacidad 4 veces mayor en trucha arcoíris. Finalmente, la actividad bactericida de los macrófagos se ve incrementada al doble y la producción de especies reactivas de oxígeno hasta 3 veces mayor en macrófagos de trucha arcoíris, independiente del origen de *S. phocae* (salmón o foca). En conclusión, las barreras humorales y celulares inespecíficas en salmón del Atlántico no son barreras inmunológicas efectivas contra la infección de *S. phocae*, ya que mucus, suero y macrófagos no poseen la capacidad de inhibir el crecimiento ni destruir a la bacteria, facilitando la infección por estreptococosis.

# Monitorización de la presencia del herpesvirus de la ostra (OsHV-1) en coquinas de la costa de Galicia

Olveira JG[1], Martínez-Patiño D[2], Bandín I[1], Dopazo CP[1], **Barja, JL**[1]
[1]Unidad de Ictiopatología - Dept. Microbiología y Parasitología; Universidad de Santiago de Compostela, Spain; [2]CIMA. Ribadeo. Xunta de Galicia

La infección causada por el herpesvirus de la ostra (OsHV-1 y OsHV1 µVar) está considerada como una de las enfermedades virales más importantes que afecta a moluscos bivalvos en todo mundo. Se ha asociado a este virus con altas mortalidades acontecidas tanto en larvas como en juveniles de diferentes especies de moluscos. La caracterización del virus y la secuenciación de su genoma ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares, basadas en PCR, que han permitido la detección específica en moluscos. El objetivo de este trabajo es determinar la posible presencia de este virus en poblaciones naturales de coquina (*Donax trunculus)* en Galicia. Se han analizado muestras de diferentes orígenes mediante real time PCR utilizando cebadores específicos para la detección de OsHV-1, siguiendo los procedimientos establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Hasta el momento no se ha detectado presencia de OsHV-1 ni OsHV1 µVar en coquinas procedentes de bancos naturales de Galicia.

SESIÓN 2. Patología de especies acuícolas II

# ¿Cómo influye la temperatura en el desarrollo de la lactococosis? Una aproximación transcriptómica e inmunoproteómica

**Reguera-Brito M**[1], Aguado-Urda M[1], Blanco MM[1], Fernández-Garayzábal JF[1], López-Campos GH[2], Gibello A[1]
[1]Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, España; [2]Health and Biomedical Informatics Centre (HABIC). The University of Melbourne, Australia

*Lactococcus garvieae* es el agente etiológico de la lactococosis, una enfermedad importante en el sector de la acuicultura a nivel mundial. Los brotes de lactococosis más agudos se asocian con temperaturas del agua por encima de los 16ºC y con una mala calidad de la misma.
En este estudio, se utilizó un microarray de ADN específico de *L. garvieae* para analizar la influencia de la temperatura en la respuesta transcripcional de la cepa clínica *L. garvieae* 8831 a 13ºC y 18ºC. Además, se realizó el estudio del proteoma a estas temperaturas para analizar las proteínas relacionadas con la respuesta inmunitaria. No se encontraron variaciones significativas en el perfil transcriptómico, ni en el inmunoproteoma de *L. garvieae* a 18ºC que pudieran relacionarse con el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la temperatura no es un factor clave en el desarrollo de la lactococosis desde el punto de vista de la bacteria. Serán necesarios estudios posteriores para determinar si el desarrollo de la lactococcosis podría estar relacionado con la adaptación de *L. garvieae* al entorno del hospedador, o con una disminución de la respuesta inmunitaria de éste debido al estrés ocasionado por el aumento de la temperatura. Estos resultados ayudarán a entender mejor la patogénesis de *L. garvieae* en las infecciones en trucha.

# Caracterización de un sistema de secreción de tipo III codificado en el plásmido pPHDD2 de *Photobacterium damselae*: implicaciones en la virulencia

**Balado M**, Puentes B, Osorio CR, Lemos ML

Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 15782, A Coruña

*Photobacterium damselae* engloba a dos subespecies: subsp. *damselae* (*PhDD*) y subsp. *piscicida* (*PhDP*) que afectan a una amplia variedad de especies de animales marinos, si bien *PhDD* puede producir también infecciones oportunistas en humanos. Aunque la base genética de la virulencia no está completamente dilucidada, estudios recientes de nuestro grupo demostraron que la presencia del plásmido pPHDD1 en *PhDD* y el efecto cooperativo entre las hemolisinas HlyA y Dly desempeñan un papel central. En *PhDP* los factores de virulencia más estudiados son la producción del sideróforo piscibactina y la toxina apoptótica AIP56. Sin embargo existen cepas virulentas de ambas subspecies que carecen de factores de virulencia conocidos. La disponibilidad en la base de datos del genoma de la cepa tipo de *PhDD* ATCC33539 nos ha permitido identificar un nuevo plásmido que hemos denominado pPHDD2 que codificaría un sistema de secreción de tipo III (T3SS) así como un completo conjunto de proteínas efectoras. Tras mutar uno de los genes estructurales (*escV*) de la maquinaria de inyección hemos observado un descenso significativo en la virulencia para peces. Además hemos identificado tres de las proteínas efectoras secretadas por el T3SS: dos que muestran una similitud de aa del 37% con YopH de *Yersinia enterocolitica* y otra que presenta una similitud del 31% con AexU de *Aeromonas hydrophila*. Sorprendentemente, a excepción de la cepa ATCC33539 todas las cepas de *PhDD* ensayadas son negativas para este T3SS. Sin embargo son numerosas las cepas de *PhDP* que lo portan en su genoma. Finalmente hemos constatado que la inactivación del T3SS produce un descenso significativo de la virulencia también en *PhDP*. A la vista de los resultados obtenidos creemos que este T3SS podría constituir uno de los factores de virulencia clave de *PhDP*.

# Regulación por sRNAs en la adaptación de *Vibrio harveyi* a la ausencia de nutrientes en agua de mar

**Ruiz-Larrabeiti O**[1], Montánchez I[1], Kaberdin VR[1,2]
[1]Departmento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Leioa, España; [2]IKERBASQUE, Fundación Vasca para la Ciencia, Bilbao, España

El género *Vibrio* es parte de la flora del ambiente marino y de las instalaciones para la acuicultura, llamados *hatcheries* o viveros. Estudios recientes revelan un aumento en el número de infecciones causadas por varias especies de *Vibrio*, incluyendo la especie patógena *Vibrio harveyi*, que afecta a organismos marinos importantes en la industria alimentaria. La supervivencia de las bacterias del mar depende en gran parte de su capacidad para adaptarse a condiciones cambiantes y adversas, la cual obtienen principalmente por medio de mecanismos de respuesta al estrés, que a menudo implican el control post-transcripcional realizado por pequeñas moléculas de RNA reguladoras, no codificantes y trans-actuantes (sRNA). Algunos sRNAs también juegan un papel importante en el control del *quorum-sensing*, un mecanismo crucial para la adaptación bacteriana y la supervivencia, puesto que controla la formación de *biofilms* y la producción de factores de virulencia. A pesar de que varios sRNAs implicados en el *quorum-sensing* así como algunas de sus dianas moleculares ya han sido identificadas en especies de *Vibrio*, el conocimiento acerca de las funciones reguladoras, dianas moleculares y mecanismos de acción de estos sRNAs es aún muy pobre. Caracterizar estas moléculas reguladoras y sus mecanismos de acción es de vital importancia para la comprensión del comportamiento y patogenicidad de las especies de *Vibrio*, y requiere más investigación. En este trabajo tratamos de profundizar en el estudio de los mecanismos reguladores de *V. harveyi* cuando afronta la ausencia de nutrientes en agua de mar. Para conseguirlo analizamos los cambios en el transcriptoma durante la adaptación de *V. harveyi* en agua de mar, centrándonos en el patrón de expresión de sRNAs identificados y predichos en *V. harveyi*, así como de sus dianas moleculares.

# Estimulación del sistema mediado por Interferón tipo I de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) en respuesta a infecciones por betanodavirus

**Podadera AM**[1], Alvarez-Torres D[1], Souto S[2], Garcia-Rosado E[1], Bandín I[2], Alonso MC[1]
[1]Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología; [2]Universidad de Santiago de Compostela, Instituto de Acuicultura

El Virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV) (género *Betanodavirus*, familia *Nodaviridae*) es un virus patógeno que afecta a muchas especies piscícolas, incluyendo al lenguado senegalés. Los betanodavirus se clasifican en cuatro genotipos, siendo los genotipos *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (SJNNV), *Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus* (RGNNV) y virus recombinantes RGNNV-SJNNV los que causan mortalidad en lenguado. Sin embargo, en condiciones experimentales es el recombinante el que provoca mayor mortalidad. Las diferencias en la tasa de mortalidad pueden indicar variaciones en la interacción entre los distintos genotipos y el sistema inmune de lenguado. El sistema del interferón tipo I (IFN I) es un componente esencial de la respuesta inmune frente a infecciones virales, induciendo la expresión de genes que codifican proteínas antivíricas (ISG), tales como la Mx, la ISG15 y la PKR. El objetivo del presente trabajo ha sido cuantificar la transcripción de *Mx*, *ISG15* y *PKR* en respuesta a infecciones por SJNNV, RGNNV y un recombinante RG-SJ. Los animales (10 g de media) se inyectaron intra-peritonealmente con los tres aislados de VNNV ($10^4$ $TCID_{50}$/pez). Mediante PCR a tiempo real se cuantificó la transcripción de las ISG en riñón cefálico, así como el número de copias de ARN viral en tejido nervioso, a distintos tiempos post-infección (p.i.). Animales inyectados con L15 y poli I:C se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Los tres aislados indujeron la transcripción de las ISG analizadas, excepto *ISG15*, que no se indujo tras la inoculación con RG-SJ, y *Mx*, que no fue inducida por RGNNV. Además, el análisis del número de copias de genoma viral mostró que el aislado RG-SJ replica más eficientemente que RGNNV y SJNNV.

# Presencia y acumulación de microorganismos patógenos en el mejillón cebra de aguas superficiales de Aragón

**Mosteo R**[1], Goñi MP[2], Abadias J[1], Ormad MP[1], Valero P[1]
[1]Dpto. Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Zaragoza; [2]Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Zaragoza

Los moluscos bivalvos son animales que se alimentan filtrando el agua, de donde extraen el alimento, al que se unen diversos contaminantes químicos y biológicos presentes en las aguas. El mejillón cebra es un molusco bivalvo, originario de la región Ponto-cáspica, que se considera especie exótica invasora y que ha proliferado por ejemplo en la cuenca hidrográfica del Ebro. Diversos estudios muestran como los moluscos acumulan contaminantes presentes en la aguas pudiendo ser utilizados como indicadores de la calidad de dichas aguas. En esta investigación se estudia la capacidad de acumulación de microorganismos patógenos y se pretende definir el riesgo que representa el mejillón cebra al actuar como reservorio de microorganismos patógenos. Los ensayos realizados se centran en evaluar la presencia y cantidad de las bacterias, *E. coli, Enterococcus sp., Salmonella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*; protozoos parásitos (*Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis)* y amebas de vida libre, tanto en aguas naturales de Aragón como en los mejillones cebra que habitan en ellas. Se ha detectado la presencia *Cryptosporidium* sp. y amebas de vida libre en el interior del mejillón cebra, así como todas las bacterias estudiadas, confirmando la capacidad que tienen estos organismos bivalvos para retener y concentrar microorganismos patógenos. Los ensayos realizados para evaluar la capacidad de acumulación bacteriana indican que estos organismos son capaces de acumular prácticamente la totalidad de bacterias de *E. coli* y *Enterococcus* sp. en 24 horas, siendo la capacidad acumulativa para *E. coli* mayor que para *Enterococcus* sp.

# *Aeromonas piscicola* una especie descrita en salmónidos enfermos de Galicia y que ahora se aísla en Chile y en Finlandia

**Beaz-Hidalgo R**[1], Silvera C[1], Levican A[2], Poblete M[2], Avendaño R[2], Figueras MJ[1]
[1]Unidad de Microbiología, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, IISPV, URV, Reus; [2]Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar

La especie *Aeromonas piscicola* fue descrita por nuestro grupo en el año 2009 a partir de 4 cepas identificadas fenotípicamente como *Aeromonas hydrophila* aisladas en salmónidos enfermos de piscifactorías de Galicia. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ningún otro aislamiento de esta especie. En un estudio en el que re-identificamos 116 cepas de *Aeromonas,* aisladas en lagos de Finlandia con afloramientos de cianobacterias, secuenciando el gen *rpoD,* 14 de ellas (12%) correspondieron a *A. piscicola*. Así mismo otra cepa de *A. piscicola* se aíslo a partir de un salmón del Atlántico enfermo en un muestreo realizado en una piscifactoría de agua dulce en Chile. En este estudio se comparan genética y fenotípicamente estas 15 cepas con las 5 de la descripción original y se investiga la presencia de genes de virulencia. El gen *rpoD* parece estar muy conservado en de *A. piscicola* ya que varias cepas comparten la misma secuencia a pesar de mostrar distintos patrones de ERIC-PCR. Los genes de virulencia que codifican para la aerolisina, *aer* (89.5%); enterotoxina citotóxica, *act* (89.5%); las enterotoxinas citotónicas *alt* (94.7%) y *ast* (36.8%) y el sistema de secreción tipo3 (SST3) genes *ascV* y *ascF-G* (75%) fueron los más detectados. Todas las cepas (6/6) aisladas de peces enfermos y el 64% (9/14) de las de agua poseen los genes del SST3 lo que confirma su potencial virulento. La secuenciación del gen *rpoD* ha permitido reconocer nuevas cepas de *A. piscicola* que puede ser confundida no solo fenotípicamente con *A. hydrophila* sino también por secuenciación del gen 16S rRNA con otras especies patógenas de peces como *A. bestiarum* y/o *A. salmonicida* ya que las secuencias de este gen en estas 3 especies son idénticas o difieren en un único nucleótido.

# Identificación y caracterización de bacterias asociadas a mortalidad de juveniles de congrio colorado (*Genypterus chilensis*) cultivado en Chile

**Levican A**[1,2], Avendaño-Herrera R[1,2,3]
[1]Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile; [2]Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), O'Higgins 1695, Concepción, Chile; [3]Centro de Investigación Marina de Quintay (CIMARQ), Valparaíso, Chile

El congrio colorado (*Genypterus chilensis*, Guichenot 1881) es una especie bentónica que habita en el Océano Pacífico Sureste (6°S - 54°S, 82°O - 70°O). Esta especie tiene una alta demanda gastronómica en Chile; sin embargo, en los últimos años ha sufrido una sobreexplotación, generando la necesidad de desarrollar tecnologías para su cultivo. En este sentido, un aspecto clave para la producción intensiva es la prevención y control de enfermedades en las etapas tempranas de su desarrollo. Por esta razón, es imprescindible conocer la composición de su microbiota asociada. En el presente estudio se identifican los microorganismos asociados a mortalidades masivas de juveniles de congrio colorado ocurridas en verano del 2010-2011. A partir de peces moribundos se realizó el cultivo microbiológico en los medios TSA suplementado con 1% NaCl y TCBS. Se aisló un total de 23 bacterias predominantes, las que fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas clásicas y secuenciación del gen ARNr 16S. Además, su potencial patogénico fue caracterizado asociando la producción de distintas enzimas, así como evaluando la sensibilidad a antibióticos por el método de difusión en agar. Los resultados muestran un predominio de *Vibrio* spp., pero también se aisló bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudoalteromonas, Psychrobacter, Alteromomas, Marinobacter, Pseudomonas* y *Planococcus*. Algunos de los aislados presentaron potencial patógeno, el cual debe ser demostrado en futuros estudios. Este trabajo aporta información valiosa sobre la microbiota asociada a mortalidad de *G. chilensis* en estadíos tempranos de desarrollo, la cual será comparada con aquella presente en condiciones normales.

CONICYT/FONDECYT Postdoctorado Nº 3140296 Proyecto CONICYT/FONDAP Nº 15110027

# Caracterización *in vitro* e *in vivo* de un mutante de *Yersinia ruckeri* en el gen *acrR* con mayor expresión a 18ºC que a 28ºC

**Cascales D**, Méndez J, García-Torrico AI, Guijarro JA
Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina. IUBA. Universidad de Oviedo

*Yersinia ruckeri* es el agente etiológico de la yersiniosis o enfermedad entérica de la boca roja, patología que afecta principalmente a salmónidos. Algunos de los factores de virulencia estudiados hasta ahora en *Y. ruckeri* se expresan más a 18ºC, temperatura entorno la cual ocurren los brotes de la infección, que a 28ºC, temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Por ello en nuestro grupo de investigación se ha diseñado y construido un transposón basado en el mini-Tn5-Km2, al cual se le han introducido los operones *luxCDABE (lux)* y *lacZ (lac)*. Con él se ha construido una genoteca de mutantes por transposición, produciéndose en muchos casos fusiones transcripcionales entre el promotor del gen interrumpido y los operones *lux* y *lac*. A partir de esta genoteca se han seleccionado en un medio con lactosa aquellos clones que presentaban una mayor actividad β-galactosidasa a 18ºC que a 28ºC. Algunos de estos clones ya han sido secuenciados, habiéndose identificado el gen interrumpido por el transposón en cada caso. Para la validación tanto del sistema de selección como del análisis *in vivo* mediante la tecnología de IVIS Lúmina, entre los mutantes seleccionados se eligió uno que presentaba la interrupción del gen *acrR*. Su producto es un represor del operón *acrAB* implicado en la expulsión de distintos compuestos tóxicos. El análisis inicial de este mutante indica que presenta diferencias respecto a la cepa parental en el nivel de resistencia a antimicrobianos y solventes orgánicos. Se está estudiando también la regulación del represor *acrR* mediante cuantificación de la actividad β-galactosidasa, así como la distribución del mutante en el pez, vía detección de la luminiscencia emitida por la bacteria.

# Determinación de órganos diana para la multiplicación y persistencia del virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV) en dorada (*Sparus aurata*, L.)

**Valverde EJ**[1], Ortiz-Delgado JB[2], Sarasquete C[2], Leiva, R[1], Borrego JJ[1], Castro D[1]
[1]Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología; [2]Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN, CSIC)

La enfermedad de linfocistis es la única patología de etiología viral descrita en dorada cultivada. En la cuenca mediterránea, la prevalencia es cercana al 100%, ocasionando graves pérdidas económicas debido a la imposibilidad de comercializar los peces afectados. En el presente trabajo se ha abordado el estudio de la patogénesis del virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV) en dorada, además se han establecido los órganos implicados en la multiplicación vírica. Para ello, se ha diseñado un protocolo de hibridación *in situ* empleando sondas RNA marcadas con digoxigenina dirigidas contra el gen que codifica la proteína principal de la cápside (MCP) viral, y se ha evaluado en poblaciones de dorada. En paralelo, se ha procedido a la cuantificación del número de copias de genoma viral por PCR a tiempo real y cuantificación relativa de la transcripción del gen que codifica la MCP viral mediante qRT-PCR. Los resultados obtenidos indican que el LCDV establece una infección sistémica en alevines de dorada, pudiendo detectarse señal de hibridación tanto en órganos internos (hígado, bazo, riñón) como en músculo y aleta. También se han observado diversos daños histopatológicos en animales enfermos, mientras que en animales recuperados de la enfermedad estos daños parecen revertir, aunque en estos animales la infección persiste, si bien sólo a niveles detectables mediante PCR a tiempo real.

Este estudio ha sido financiado por los proyectos AGL2010-17880, P09-RNM-4898-R y P12-RNM-2261.

# Relevancia del esfuerzo en secuenciación masiva para la caracterización de la "biosfera rara" del océano profundo

**Sánchez P**[1], Kostadinov I[1], Logares-Haurié R[1], Salazar G[1], Cornejo-Castillo FM[1], Duarte CM[2], Gasol JM[1], Acinas SG[1]
[1]Departament de Biologia Marina i Oceanografia. Institut de Ciències del Mar, CSIC, Barcelona; [2]Departamento de Investigación del Cambio Global. Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados, CSIC, Esporles

A pesar que la secuenciación masiva es cada vez más barata y los estudios metagenómicos a gran escala son factibles, todavía existe una gran limitación en el área computacional. Debido a la necesidad de controlar el coste en secuenciación y computación, y a la vez de dar respuesta a las cuestiones biológicas, la profundidad de secuenciación al diseñar un estudio es un aspecto fundamental. Con el objetivo de analizar cómo la profundidad de secuenciación afecta a los resultados de composición taxonómica y funcional en metagenomas marinos, se analizó una misma muestra de la Expedición Malaspina 2010 (Océano Índico, 4000 m de profundidad y dos fracciones de tamaño: 0.2-0.8 µm y 0.8-3.0 µm) mediante dos esfuerzos de secuenciación masiva contrastados: entre 2.75 y 3.22 Gbp y entre 25.3 y 43.5 Gbp para las fracciones de 0.2 y 0.8 µm respectivamente. Un aumento en el esfuerzo de secuenciación de ca. 10 veces incrementó el tamaño de los ensamblajes entre 17 y 38 veces para cada una de las fracciones (0.2 y 0.8 µm). El número y el tamaño de los contigs aumentó en un orden de magnitud en ambas. Así mismo, las muestras analizadas con mayor profundidad de secuenciación revelaron funciones que no se detectaron en las otras: cerca de 2000 *clusters* de genes ortólogos y 5000-9000 dominios PFAM más, CRISPRs y un orden de magnitud más de OTUs. Un aumento de 10x en el esfuerzo de secuenciación de una muestra oceánica proporciona un incremento considerable de la información extraída sobre su composición taxonómica y funcional, especialmente de la biosfera rara. Un esfuerzo moderado de secuenciación, de 5Gbp por muestra, puede ser suficiente para obtener resultados relevantes de los taxones más abundantes y a la vez mantener bajo control los costes económicos asociados.

# Microbiota autóctona de manantiales mineromedicinales clorurado sódicos

**Rodríguez C**, Pintado C, Mosso A, de la Rosa C
Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid

Las propiedades físico-químicas específicas de los distintos tipos de aguas termales mineromedicinales, determinan la biodiversidad característica de estos ecosistemas acuáticos, favoreciendo el desarrollo de determinadas especies. Se ha estudiado la microbiota autóctona de cinco manantiales mineromedicinales clorurado sódicos, dos hipotermales (Villa de Olmedo, Puente Viesgo) y tres hipertermales (Archena, Fortuna, La Toja), pertenecientes a cinco balnearios españoles. Ninguno de los manantiales contenía indicadores fecales ni bacterias patógenas en 100 mL, por lo que cumplen la normativa española de aguas de consumo. Se han observado diferencias en el número y tipos de microorganismos entre los manantiales hipo- e hipertermales, lo que confirma la gran influencia de la temperatura de emergencia en la biodiversidad de estos manantiales. El número por mL de microorganismos totales, determinado por epifluorescencia, y el de bacterias viables cultivadas a 22º C y 37º C tanto heterótrofas como oligotrofas, ha sido menor en los manantiales hipotermales. Sin embargo, los manantiales hipertermales presentan un mayor número de bacterias viables a 37º C que a 22º C. En los manantiales hipotermales predominan los bacilos Gram negativos del Phylum *Proteobacteria*, el género *Pseudomonas* y las especies *P. alcaligenes* y *P. stutzeri*, así como especies con pigmentos. En cambio en los hipertermales son más frecuentes los bacilos y cocos Gram positivos del Phylum *Firmicutes*, el género *Bacillus* y la especie *B. licheniformis.* Los principales grupos metábolicos aislados en estos balnearios corresponden a bacterias amonificantes, proteolíticas y amilolíticas, por lo que pueden intervenir en la autodepuración de las aguas del manantial. También se han detectado bacterias halófilas moderadas en pequeño número pero no son halófilas estrictas, como podría esperarse por su contenido salino.

# *Neptunomonas atlantica* sp. nov., una nueva especie bacteriana aislada de vieira (*Pecten maximus*)

**Diéguez, AL**[1], Pichon, P[2], Magnesen, T[3], Romalde, JL[1]
[1]Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS. Universidad de Santiago de Compostela; [2]School of Biological Sciences of Portsmouth University (UK); [3]Departament of Biology. University of Bergen. Bergen, Noruega

El género *Neptunomonas* fue descrito por Hedlund en 1999 con *Neptunomonas naphthovorans* como especie tipo. Esta es una bacteria marina degradadora de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) aislada de sedimentos contaminados con creosota en el estrecho de Puget (Washington, USA). Hoy en día, este género está compuesto por 5 especies, todas ellas aisladas de ambientes marinos. Durante un estudio de la microbiota asociada a la vieira (*Pecten maximus*) y de su sistema de producción, realizado en una planta de cultivo en Noruega, se aislaron 5 cepas procedentes de la gónada de reproductores. Estos aislados son aerobios, Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos y con metabolismo oxidativo. En agar marino forman colonias menores de 1mm de color blanco. Los análisis filogenéticos basados en las secuencias del gen 16S rRNA revelaron una similitud entre el 97.78% y el 98.06% con *Neptunomonas naphthovorans*, la especie más cercana. Los ácidos grasos predominantes fueron C18:1ω7c/C18:1ω6c, C16:1ω7c/C16:1ω6c, C16:0 y C10:0 3OH. El contenido G+C de los nuevos aislados es de 48.85 ± 1 mol%, acorde con el rango descrito para Neptunomonas. Basándonos en las características fenotípicas, filogenéticas y quimiotaxonómicas, los cinco aislados pueden representar una nueva especie dentro del género *Neptunomonas* para la que se propone el nombre de *Neptunomonas* atlantica sp. nov., con la cepa 3CM2.5$^T$ como cepa tipo.

# Una posible nueva especie de *Vibrio*, cercana a *V. ichthyoenteri* y *V. scophthalmi*, aislada de doradas cultivadas

Eva Tarazona[1], David R. Arahal[1,2], Teresa Lucena[2], M. Carmen Macián[2], María A. Ruvira[2,] **María J. Pujalte** [1,2]
[1]Departamento de Microbiología y Ecología; [2]Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universitat de València

Durante un estudio del clado Scophthalmi del género *Vibrio*, abordado mediante la técnica MLSA (Multilocus Sequence Analysis) se puso de manifiesto que dos de las cepas originalmente identificadas como posibles *V. ichthyoenteri*, DCR 1-4-2 (CECT 8603) y DCR 1-4-12 (CECT 8604) mantenían una posición aislada respecto a las especies del clado en todos los árboles filogenéticos obtenidos, tanto con los genes individuales como con el concatenado de los cinco (*gyrB, recA, ftsZ, mreB,* y *rpoD)*. Las similitudes entre sus secuencias y las de los grupos de *V. ichthyoenteri* (6 cepas) y *V. scophthalmi* (40 cepas) son inferiores al 92% con cuatro de los cinco genes, lo que sugiere que podrían constituir una nueva especie, en un clado que contiene a *V. ichtyoenteri*, *V. scophthalmi* y *V. ponticus* [1]. Las cepas proceden de dorada cultivada en piscifactorías del área mediterránea [2]. Poseen las características del género: bacilos Gram-negativos y móviles, que fermentan la glucosa sin producción de gas, reducen nitratos a nitritos, son oxidasa y catalasa positivas y requieren $Na^+$ para crecer. Son negativas para: arginina dihidrolasa (ADH, métodos de Thornley y Moeller), lisina y ornitina descarboxilasas, indol, Voges-Proskauer e hidrólisis de caseína, gelatina, almidón y alginato. Su perfil de ácidos grasos celulares es muy parecido al de las especies vecinas, con C16:1ω7c/C16:1ω6c (42-45%) y C16:0 (20-26%) como componentes mayoritarios. Se encuentra en curso el proceso de secuenciación genómica de ambas cepas, para determinar los índices de semejanza genómica (ANIb, ANIm, GG-DC) y confirmar que se trata de una nueva especie.

[1] Sawabe et al. (2013). Frontiers in Microbiology 4, 414
[2] Pujalte et al., (2004). Dis. Aquat. Org. 54, 119-126

Estudio financiado por los proyectos CGL2010-18123/BOS (Min. Economía y Competitividad) y PROMETEO2012-040 (Generalitat Valenciana).

# Algas unicelulares pertencientes a la clase Prymnesiophyceae revelan la diversificación evolutiva de la cianobacteria simbionte UCYN-A

**Cornejo-Castillo FM**[1], Cabello AM[1], Salazar G[1], Massana R[1], Lima-Mendez G[2], Hingamp P[3], Raes J[2], Gasol JM[1], Acinas SG[1]
[1]Dpt. Biología Marina y Oceanografía, ICM-CSIC, Barcelona, Spain; [2]Department of Structural Biology, VIB, Brussels, Belgium; [3]Laboratoire Information Génomique & Structurale, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France

La cianobacteria unicelular UCYN-A establece una relación simbiótica con células eucariotas pertenecientes a la clase Prymnesiophyceae en ambientes marinos. La primnesiofícea obtiene nitrógeno fijado de UCYN-A y, a cambio, la cianobacteria recibe carbono fijado, ya que esta ha perdido la capacidad de hacer una fotosíntesis completa. Sin embargo, no sabemos casi nada acerca de la diversidad genómica de esta cianobacteria, ni siquiera si existen diferentes ecotipos adaptados a diferentes hospedadores. La finalidad de este estudio es adentrarnos en las implicaciones que pueda tener esta relación simbiótica sobre la evolución de UCYN-A. En primer lugar, y basándonos en el análisis metagenómico de muestras superficiales del Atlántico sur, gracias a la expedición oceanográfica TARA Oceans, identificamos dos especies genómicas diferentes de UCYN-A. En segundo lugar, empleamos la técnica de CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition Fluorescence *In Situ* Hybridization) para verificar microscópicamente su presencia en estas muestras. Para ello hicimos una doble hibridación combinando dos sondas que diseñamos específicamente para dos clados taxonómicos de primnesiofíceas que actúan como hospedadoras, con dos sondas específicas para dos clados taxonómicos de UCYN-A. Esto nos permitió detectar dos clases de tamaño de primnesiofíceas asociadas a diferentes grupos de UCYN-A. Asímismo, detectamos que, tanto la posición como el número de simbiontes que porta la primnesiofícea es específico del grupo taxonómico. En definitiva, nuestros resultados demuestran que diferentes filotipos de primnesiofíceas actúan como “islas” en la diversificación evolutiva de UCYN-A, siendo este un modelo de co-evolución muy interesante que nos puede ayudar a entender otras relaciones simbióticas en ambientes marinos.

# Evaluación de la composición bacteriana de los fangos activados mediante FISH y *16S amplicon sequencing*

Garaizabal I[1], Orruño M[2], Bravo Z[1], Parada C[1], **Arana I**[1]
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. [1]Facultad de Ciencia y Tecnología; [2]Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

El tratamiento de aguas residuales, tanto domésticas como industriales, es uno de los procesos biotecnológicos de mayor importancia y más extendidos a nivel mundial, especialmente el tratamiento mediante fangos activados. Los flóculos, la unidad clave de este proceso, están formados por una comunidad microbiológica única dentro de la cual las bacterias juegan un papel esencial. En este trabajo se analizó la comunidad bacteriana de los fangos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales de Crispijana (Vitoria/Gasteiz), utilizando 2 técnicas moleculares: FISH y 16S *amplicon sequencing*. La primera de ellas nos permitió detectar mediante sondas específicas la presencia de bacterias de interés por su relación con dos procesos de especial relevancia en el tratamiento: la eliminación del nitrógeno y del fósforo. Los principales géneros nitrificantes identificados en la planta fueron *Nitrosomonas* (nitrosificante) y *Nitrospira* (oxidante de nitrito), mientras que la desnitrificación, necesaria para completar el proceso de eliminación del nitrógeno, la llevaron a cabo bacterias de los géneros *Curvibacter*, *Thauera*, *Azoarcus* o *Zoogloea*. La eliminación del fósforo parece estar asociada a la presencia de bacterias del género *Tetrasphaera*. Por otra parte, la metodología 16S *amplicon sequencing* aportó una visión más global de la amplia variedad de bacterias presentes en los flóculos. Sin embargo, un análisis conjunto pone de manifiesto discrepancias en los resultados obtenidos por ambos métodos, como demuestra el hecho de que algunos de los géneros detectados por FISH no se identificaron mediante 16S *amplicon sequencing.* Debemos destacar, por tanto, que estos métodos no son intercambiables entre sí, pero aportan información complementaria para el estudio de la comunidad bacteriana que compone los fangos activados u otros sistemas biológicos similares.

# Controversias taxonómicas dentro de la especie *Edwardsiella tarda*

**Buján N**, E. Toranzo A, Magariños B
Departamento de Microbiología y Parasitología, Fac. de Biología/CIBUS, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela

El género *Edwarsiella* fue establecido en la década de los sesenta por Ewing y MacWhorter, siendo la primera especie descrita *E. tarda*. Actualmente el género comprende dos especies más, *E. ictaluri* y *E. hoshinae*. *E. tarda* es un patógeno con una gran variedad de nichos ecológicos y hospedadores, tanto terrestres como acuáticos. Esta bacteria es muy estable en multitud de pruebas fenotípicas pudiendo identificarse mediante pruebas bioquímicas. Con el avance de las técnicas moleculares se ha ido demostrando la variabilidad genética de *E. tarda*. Numerosos estudios se han centrado en la caracterización genética intraespecífica mediante multitud de técnicas diferentes (RAPD, REP-PCR, ERIC, AFLP, secuenciación completa,…) obteniéndose evidencias claras de la existencia de diferentes grupos genéticos dentro de la especie. Recientemente se ha descrito una nueva especie dentro del género *Edwardsiella*, *E. piscicida*, mediante la reclasificación de cepas de *E. tarda*, basándose exclusivamente en datos filogenéticos. La hibridación DNA-DNA sigue siendo la técnica estándar para la determinación de nuevas especies, por ello hemos analizado un grupo de aislados identificados como *E. tarda* entre los que se incluyen la cepa tipo, la cepa de referencia para peces, *E. ictaluri* y la reciente *E. piscicida*, con el objetivo de esclarecer la relaciones filogenéticas dentro del género *Edwardsiella*.

# La metagenómica de alto rendimiento revela un papel clave de las actinobacterias en la ecología de los medios acuáticos de agua dulce

**Rohit Ghai**[1], Carolina Megumi Mizuno[1], Antonio Picazo[2], Antonio Camacho[2], Francisco Rodriguez-Valera[1]
[1]Evolutionary Genomics Group, Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, 03550, Alicante, Spain; [2]Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology – University of Valencia E-46100 Burjassot, Spain.

Los ecosistemas de agua dulce son hábitats frágiles que afectan directamente a la sociedad y su bienestar. Sin embargo, nuestra comprensión de las comunidades microbianas de agua dulce sigue siendo muy rudimentaria por nuestra incapacidad de rescatar gran parte de sus procariotas en cultivos axénicos, El problema se extiende incluso a los componentes más abundantes, que siguen siendo en gran parte desconocidos, como el caso de las actinobacterias. Con la aplicación de la metagenómica a la comunidad microbiana de un pantano, hemos sido capaces de reconstruir el metabolismo funcional de siete genomas distintos de estas Actinobacterias. Describimos los primeros genomas de dos clados conocidos anteriormente solamente por secuencias de 16 rRNA: Luna2 (Micrococcineae), y otro relacionados con acTH1 (Actinomicetales). Además, se ha recuperado un conjunto de contigs que pertenece a una nueva rama de Acidimicrobiales. Estos genomas representan tres nuevos grupos de bacterias foto heterotróficas y planctónicas. Todos tienen genomas pequeños (~ 1,2 Mb) y su contenido GC es variado (40-61%). Uno de los genomas de Micrococcineae contiene un proteorodopsina encontrada por la primera vez en Actinobacteria. El notable potencial de estos genomas para transformar material recalcitrante, particularmente compuestos derivados de lignina, demuestra los estrechos vínculos entre los ecosistemas terrestres y acuáticos. Por otra parte, la abundancia de Actinobacteria se correlaciona inversamente con la de cianobacterias que son responsables de daños prolongados y con frecuencia irreparables a ecosistemas de agua dulce. Esto sugiere que podrían servir como centinelas de catástrofes ecológicas inminentes.

SESIÓN IV. Innovación tecnológica

# Desarrollo y validación de diversos reactivos para la detección genética de patógenos mediante qPCR en el marco de AQUAVALENS

**Navarro A**[1], Bru G[1], Martinez-Murcia AJ[1,2]
[1]Genetic PCR Solutions™, Parque Científico Empresarial; [2]Unidad de Microbiología, Universidad Miguel Hernández

El proyecto de investigación europeo Aquavalens (2013-18) tiene como objetivo prevenir de la contaminación microbiana en el agua potable y la utilizada en el procesado de alimentos a través de la mejora en sus analíticas. Los participantes pretenden desarrollar técnicas moleculares para la detección de patógenos en plataformas que garanticen un suministro público de agua más seguro. Nuestro laboratorio, con la marca Genetic PCR Solutions™ (GPS™), lidera el grupo de empresas de este consorcio compuesto por 39 socios de 13 países. Una de las aportaciones tecnológicas de GPS™ es el desarrollo y validación de reactivos de qPCR para la detección de los patógenos bacterianos seleccionados en el proyecto: *Arcobacter butzleri, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Typhi, *Escherichia coli* (O157:H7), *Legionella pneumophila, Listeria monocytogenes*, y *Helicobacter pylori*. La validación de estos kits sigue las directrices estándares de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025), en criterios de especificidad (inclusividad/exclusividad), sensibilidad (límites de detección y cuantificación), robustez, y fiabilidad (repetibilidad y reproducibilidad). El régimen térmico de las qPCR se ha armonizado para una posible multiplex. GPS™ ha desarrollado un formato denominado MONODOSE, todos los reactivos dispensados en tubos individuales y deshidratados listos para su uso lo cual minimiza el deterioro y el riesgo de contaminación cruzada. Además, para el dopaje de muestras con DNA de cepas de referencia, se ha desarrollado un estándar cuyo número de copias genómicas se ha calibrado con precisión mediante dos métodos independientes y usando los datos de secuenciación de los genomas completos.

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme ([FP7/2007-2013] [FP7/2007-2011]) under Grant agreement no: 311846.

# Desarrollo de un chip de DNA para la detección de dianas génicas bacterianas de interés en el campo de la acuicultura

**Labella A**[1], Trento I[2], Ghidini V[2], Gennari M[2], Castro D[1], Borrego JJ[1], Lleò MM[2]
[1]Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología; [2]Università degli Studi di Verona, Dipartimento di Microbiologia e Diagnostica, Sezione Microbiologia.

La adquisición bacteriana de multiresistencias frente a antimicrobianos es un fenómeno cada vez más preocupante, con gran repercusión para la salud pública, pero también con impacto en sectores de la producción animal, como es el caso particular de la acuicultura. Entre los años 2010-2012, como objetivo de un Proyecto de Investigación Italiano (Progetti d'interesse Nazionale, PRIN), se realizaron diferentes campañas de muestreo a lo largo de la costa del mar Adriático, en centros dedicados a la acuicultura y áreas costeras, estudiando la incidencia de bacterias multiresistentes, así como de los elementos genéticos móviles responsables de su adquisición, desarrollando además una herramienta biotecnológica que agiliza este tipo de estudios permitiendo detectar 164 dianas génicas en un único soporte. Se obtuvo una colección de 1274 aislados bacterianos, a partir de muestras de agua, sedimento y biofilm, resistentes a las distintas combinaciones de antibióticos utilizados según la legislación italiana. Del total, 105 (8,25%) aislados resultaron ser multiresistentes, detectándose en el 13,59% el integrón de clase I, en el 14,56% el plásmido pAb5s9, en el 5,82% el elemento SXT/R391, y en el 15,52% diferentes combinaciones de estos elementos genéticos. Basándonos en estos resultados, se ha desarrollado y validado un chip de DNA que permite detectar en un mismo soporte, genes que codifican para determinantes de resistencia a antimicrobianos, elementos genéticos móviles (MGE), genes para la detección de especies bacterianas patógenas con repercusión en acuicultura y para la salud del hombre, e indicadores de contaminación fecal.

# Selección de un vector estable de clonación en la bacteria marina *Marinomonas mediterranea*

**Guerrero-Rubio MA**, Sánchez-Amat A
Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España

*Marinomonas mediterranea* es una *gammaproteobacteria* marina que forma parte de la microbiota de *Posidonia oceanica* y en la que se han descrito varias enzimas de interés biotecnológico. En concreto, se trata de dos polifenol oxidasas (PPOs) y dos L-aminoácido oxidasas (LAOs). Entre las primeras se encuentra PpoA, una lacasa, y PpoB, una tirosinasa implicada en la síntesis de melaninas. En cuanto a las LAOs que sintetiza *M. mediterranea,* encontramos una Llisina-ε-oxidasa (LodA) y una glicina-oxidasa (GoxA) que confieren propiedades antimicrobianas debido a que catalizan reacciones que liberan, entre otros productos, peróxido de hidrógeno. Se han puesto a punto diferentes técnicas moleculares para *M. mediterranea*. La introducción de genes en este microorganismo se ha realizado hasta el momento mediante su clonación en transposones de la serie Tn*10.* Estos transposones estaban en plásmidos suicidas que se introducían por conjugación. No obstante, este proceso es laborioso y por ello el objetivo de este trabajo es la búsqueda de plásmidos estables que faciliten la clonación génica en *M. mediterranea*. Para ello se han ensayado diversos vectores con diferentes orígenes de replicación. Se ha observado que los plásmidos con origen de replicación R6K, pES213 (ambos en pVSV104) y IncP (pPHIJ1) no son estables en *M. mediterranea* mientras que los plásmidos con origen de replicación p15A (pKT230 y pEVS126) y RK2 (pRK293) si lo son. De entre estos plásmidos se ha seleccionado para estudios posteriores pEVS126 por su pequeño tamaño (2,5 Kb). Se ha construido un vector derivado de pEVS126 con un sitio de clonación múltiple para dotarlo de mayor versatilidad. Este vector puede ser de interés para la manipulación genética de *M. mediterranea* y otras bacterias.

# Modelo matemático para la cinética de depuración de virus entéricos en moluscos

Polo D[1], Feal X[2], Varela MF[1], **Romalde JL**[1]
[1]Dpto. de Microbiología y Parasitología. [2]Dpto. de Física de Partículas e IGFAE. Universidad de Santiago de Compostela

El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo matemático para caracterizar la cinética de eliminación viral durante el proceso de depuración, basándonos en datos previos de depuración de HAV y MNV-1 (como sustituto del NoV humano) en almeja (*Venerupis phillipinarum*) y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) en un sistema experimental. La dinámica de depuración observada en todas las experiencias consistió en dos fases, una reducción inicial rápida de los virus durante los primeros 2-3 días (atribuible a la evacuación de material desde el intestino), y una velocidad de depuración más lenta en los días restantes, tal vez debido a la fracción de la carga viral no disponible para la eliminación directa a través de la defecación o la digestión. Como explicación de la dinámica de depuración y la existencia de una carga viral residual al final del proceso, se propone un modelo matemático en base a los siguientes supuestos: (1) que la carga viral, una vez que la bioacumulación alcanza el equilibrio, podría descomponerse en la carga viral diluida (susceptible de ser depurado por mecanismos físicos) y la no diluida (secuestrada en zonas fuera del tracto digestivo y por lo tanto no disponible para eliminar por depuración física) y, (2) el mecanismo físico de la depuración puede ser idealizado en una bomba que evacúa un flujo de agua a una tasa dependiente de la especie. El modelo produjo una ecuación general que puede predecir la concentración de la carga viral en cualquier momento de la depuración lo que podría ser de gran valor para el establecimiento de futuros valores virales críticos en moluscos depurados, así como en la evaluación cuantitativa del riesgo viral durante este proceso.

# Comparación de los niveles de colífagos somáticos y enterovirus en nuevos procesos de higienización de biosólidos

**Martín-Díaz, J**[1,2], Casas-Mangas, R[1,2], García-Aljaro, C[1,2], Blanch, AR[1,2], Lucena, F[1,2]
[1]Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona; [2]Institut de Recerca de l'Aigua, Universitat de Barcelona

La utilización de lodos de depuradora o biosólidos en agricultura es un hecho habitual en la gestión de estos residuos. La presencia de patógenos en los lodos implica la necesidad de una higienización para evitar la dispersión de los mismos. La directiva europea 86/278/EEC que, junto con el "Working Document on Sludge, 3rd Official Draft" regula el uso de biosólidos en agricultura, propone la valoración de los tratamientos mediante el control de *E. coli* y *Salmonella* spp., aunque la viabilidad y fiabilidad de este método está sometida a un amplio debate. Los enterovirus forman parte del conjunto de microorganismos patógenos habitualmente presentes en los biosólidos. Los colifagos somáticos se utilizan como indicadores del comportamiento y supervivencia de los virus patógenos. En la presente investigación, enmarcada en el proyecto europeo Routes, se ha estudiado la reducción de los niveles de colifagos somáticos y enterovirus en muestras procedentes de la validación de nuevos tratamientos de higienización de lodos de depuradora. Los resultados obtenidos muestran cómo los niveles de enterovirus infecciosos en biosólidos higienizados son bajos o están por debajo del límite de detección (<0.01 PFU/g dw), lo que dificulta su monitorización. En cambio, se han detectado genomas en todos los puntos del proceso de higienización a niveles superiores que los infecciosos, aunque resulta difícil establecer una relación entre ambos. Se ha comprobado la adecuación de la utilización de los colifagos somáticos en la validación de los tratamientos de higienización intensivos estudiados, así como la viabilidad y robustez de su análisis. Finalmente, se han podido establecer relaciones entre colifagos somáticos y enterovirus infecciosos, hecho que permitiría ampliar y complementar la propuesta de calidad microbiológica de los biosólidos con el fin de disminuir el riesgo sanitario.

# Análisis de la diversidad de *Pseudomonas*-like en tratamiento de aguas con osmosis inversa mediante distintos métodos de identificación

**Sala-Comorera L**[1], Vilaró C[2], García-Aljaro C[1], Galofré B[2], Blanch AR[1]
[1]Grupo MARS, Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Barcelona; [2]Aigües de Barcelona EMGCIA, Barcelona

La filtración por membrana de Osmosis Inversa (OI) se ha implantado en el campo del tratamiento de agua, tanto en estaciones desalinizadoras como en estaciones de tratamiento de aguas potables (ETAP). La formación de biofilms en la superficie de las membranas requiere un control debido a los efectos adversos que puede generar desde el punto de vista operativo (disminución del caudal de filtración, aumento de la presión de filtración, aumento del paso de sales, etc.). La capacidad metabólica adaptativa del género *Pseudomonas* explica su ubiquidad en distintos ambientes, y es utilizado como un indicador de recrecimiento bacteriano. En este estudio se caracterizan cepas de *Pseudomonas* antes y después del paso del agua por la OI de una ETAP, mediante diferentes técnicas, y se valora la diversidad poblacional. Se realizaron 4 muestreos durante un año teniendo en cuenta diferencias estacionales. Se realizó un primer aislamiento de cepas en GSP agar; obteniéndose cultivos puros en BHI agar. Se valoraron 4 metodologías para la caracterización de las poblaciones bacterianas: fenotipado bioquímico mediante el sistema Phene-Plate utilizando las placas Php-48 (Bactus Ab), la secuenciación del gen del 16S rRNA, la galería API 20NE (BioMérieux) y MALDI-TOF (Bruker). Se calcularon los índices de diversidad de Simpson y similitud poblacional, Sp. La diversidad resultó alta en los dos puntos analizados y para todos los muestreos. Existen diferencias significativas entre las poblaciones de *Pseudomonas spp.* del agua antes y después de la membrana de OI, indicando una correcta filtración a nivel de OI y una posterior recolonización de la membrana por cepas de *Pseudomonas spp* diferentes de las del agua de entrada. La tecnología MALDI-TOF resultó ser suficientemente sólida cuando se compara con los resultados de las agrupaciones realizadas a partir del método fenotípico y con la secuenciación del gen del 16S rRNA. No obstante, sí se observaron diferencias respecto la identificación con API.

# Selección de modelos de qPCR para el análisis de la expresión en *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

**Rivera L**, Cabirta A, Nieto TP, Farto R
Laboratorio de Microbiología Marina, Universidad de Vigo

Pese a que el conocimiento con respecto a los factores de virulencia en *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (ASS) es cada vez mayor, es necesario establecer el modelo más adecuado para cuantificar la expresión relativa de los mismos mediante qPCR. Para realizar la cuantificación de la expresión se requiere el uso de genes de referencia para la normalización de los datos, por ello se evaluó la estabilidad de cinco genes candidatos (*proC*, *fabD*, *rpoC*, *rpoD* y *gyrB*), empleando para ello los algoritmos geNorm, NormFinder y BestKeeper. Se estimaron también los valores de la eficiencia específica de reacción de cada gen empleando métodos alternativos (Real-time PCR Miner o LinReg PCR) a la curva estándar. El software RefFinder se utilizó con fines comparativos. Se emplearon asimismo distintos métodos de cuantificación relativa, que incluyen el uso de uno o varios de referencia, asumiendo un 100% de eficiencia o empleando la eficiencia gen específica. Nuestros resultados indican que los genes de referencia *gyrB*, *proC* y *rpoC* fueron los más estables bajo nuestras condiciones experimentales. El empleo combinado de los tres algoritmos y el uso de los programas Real-time PCR Miner o LinReg PCR para determinar la eficiencia de la reacción de amplificación fueron herramientas adecuadas para la selección de genes de referencia en ASS. La evaluación de distintos modelos de cuantificación permite determinar aquel que proporcionará unos resultados de cuantificación de la expresión más precisos.

# Verificación de la infectividad de virus entéricos mediante técnicas moleculares

**Fuster N**, Guix S, Fuentes C, Pintó RM, Bosch A
Laboratorio de Virus Entéricos, Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona. Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad Alimentaria (INSA-UB), Universidad de Barcelona

Los virus que mayormente están asociados a enfermedades de transmisión hídrica son los norovirus (NoV), causantes de gastroenteritis aguda, y el virus de la hepatitis A (HAV), considerado el agente etiológico de hepatitis más común a nivel mundial. Nuestro laboratorio ha contribuido activamente en el desarrollo de un método estándar para la detección de NoV y HAV en muestras de agua y en alimentos, tarea que fue llevada a cabo dentro del grupo de trabajo del Comité Europeo de Estandarización (CEN) y que ha finalizado con la publicación de dos normas ISO para el análisis virológico cualitativo y cuantitativo, respectivamente, mediante técnicas de RT-PCR a tiempo real (RT-qPCR). No obstante, puesto que la detección del genoma vírico no necesariamente implica que los virus detectados sean infecciosos, nuestro objetivo es adecuar dichas técnicas moleculares para que permitan predecir mejor la infectividad de las muestras. En este trabajo, se optimizó un método basado en el tratamiento de las muestras con monoazida de propidio (PMA) previo a la amplificación por RT-qPCR para detectar y cuantificar partículas potencialmente infecciosas del HAV cuyas cápsides fueran estancas, cohesivas y no dañadas. Los parámetros estudiados incluyeron distintas concentraciones de PMA, la combinación del PMA con pre- y post-tratamientos con RNAsa, y el tiempo y las condiciones de exposición a la luz para inducir modificaciones covalentes en el genoma vírico. La capacidad de predicción de infectividad del protocolo optimizado se validó sobre muestras de agua contaminadas experimentalmente con HAV e inactivadas con cloro, el cual induce daños principalmente sobre la cápside. El pretratamiento con sólo PMA resultó ser el más efectivo y las reducciones en la concentración de genomas del HAV tras una inactivación de 15 minutos con 12 mg/l de cloro, se consiguieron incrementar desde 2.6 hasta 3.6 $\log_{10}$, más acorde con la caída de infectividad. En conclusión, el pretratamiento con PMA es útil para verificar el grado de infectividad de muestras de agua inactivada con cloro.

# Nuevas placas preparadas de medio deshidratado DryPlates® de MICROKIT en microbiología de aguas

**Sanchís Solera, J**
Laboratorios MICROKIT, S.L., Madrid

Las DryPlates® son placas preparadas con un disco de medio deshidratado estéril, diseñadas y patentadas en España por Laboratorios MICROKIT, con importantes mejoras sobre otros métodos similares muy conocidos de USA y Japón. Ahorran la necesidad y el punto crítico de fundir agares para siembra en masa (ej: recuento total de aerobios) y gracias a su hidragar, absorben directamente 1 ml de la muestra a temperatura ambiente, sin necesidad de aplicadores que homogeneícen la mezcla. También ahorran la necesidad de usar placas preparadas hidratadas de escasa caducidad e insuficiente volumen de absorción, ya que al ser un medio deshidratado, su caducidad es como mínimo de 1 año. Las colonias son idénticas a las obtenidas en medios clásicos, sin artefactos ni formas extrañas. También pueden emplearse para recuentos por filtración de membrana de mayores volúmenes de muestra, por ejemplo 100-250 ml, simplemente hidratando previamente el disco nutritivo con 1 ml de agua y depositando después encima la membrana por la que se ha filtrado la muestra. Ya hay 14 medios disponibles: todos los de aguas de consumo (Aerobios totales, *E.coli* y demás coliformes, Enterococos fecales, *Clostridium perfringens*) y de bebida envasadas (además *Pseudomonas aeruginosa*), las de aguas de baño (además *Staphylococcus aureus*), las de aguas farmacéuticas-cosméticas (además *Burkholderia cepacia)*; asimismo están disponibles con medios para otros microorganismos típicos de alimentos y cosméticos: hongos (levaduras y mohos), Enterobacterias, *Bacillus cereus, Candida albicans, Salmonella spp*. Mediante esta innovación, Laboratorios MICROKIT logra su objetivo de convertir la siembra microbiológica en algo tan simple y tan rápido que se puede decir “de la muestra a la estufa en 10 segundos”. Un valor añadido que nos hemos encontrado, es la sorprendente rapidez en la obtención de resultados, por ejemplo los aerobios, los Enterococos y las Pseudomonas/Burkholderia, que nos tienen acostumbrados a 2-3 días de incubación, ya se pueden leer en sólo 24h.Estamos en la fase 2 de validación de este práctico formato, mediante intercolaboración.

# Abundancia y distribución global de las comunidades de virus marinas en el océano

**Lara, E**[1], Elisabet L. Sa[1], Ana Sotomayor[1], Aida Peiró[1], Yaiza Castillo[1], Julia A. Boras[1], Jesús M. Arrieta[2], Marta Estrada[1], Ana Gomes[1], Josep M. Gasol[1], Susana Agustí[2,4], Carlos M. Duarte[2,3], Dolors Vaqué[1]
[1]Instituto de Ciencias del Mar (ICM-CSIC) Departamento de Biología Marina y Oceanografía, Barcelona; [2]Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (CSIC-UIB). Departamento de Cambio Global, Palma de Mallorca; [3]The UWA Oceans Institute, University of Western Australia, Australia; [4]The UWA Oceans Institute and School of Plant Biology, University of Western Australia, Australia

Los virus marinos son las entidades biológicas más abundantes en los océanos y juegan un papel crítico en la biología, la diversidad y la evolución microbiana. La mayoría de los estudios sobre la abundancia y distribución de los virus marinos en los sistemas pelágicos marinos se han llevado a cabo en ambientes costeros o bien en las zonas epi-y mesopelágicas y sólo unos pocos estudios han presentado datos a profundidades inferiores a 1.000 metros. El océano profundo es el mayor ecosistema de la biosfera y también el más inexplorado. En este estudio, presentamos la abundancia y distribución global de los virus marinos en el epi-, meso- y batipelágico en muestras de la expedición Malaspina-2010 (Atlántico, Índico y Pacífico). Gracias al carácter multidisciplinario de esta expedición, pudimos determinar qué parámetros biológicos y físico-químicos explican las diferencias en las abundancias y distribuciones en las comunidades de virus marinos a lo largo de los diferentes océanos Para ello, tuvimos en cuenta la abundancia bacteriana, la producción bacteriana, la concentración de Chl *a* y la abundancia de flagelados heterotróficos así como la temperatura, la salinidad y la concentración de oxígeno en el agua.

# Patrones de diversidad globales de procariotas y picoeucariotas en el océano fótico y afótico

**Guillem Salazar**[1], Ramiro Logares[1], Francisco M. Cornejo-Castillo[1], Shinichi Sunagawa[2], Peer Bork[2], Josep M. Gasol[1], Silvia G. Acinas[1]
[1]Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ciències del Mar-CMIMA, CSIC; [2]EMBL- European Molecular Biology Laboratory, Structural and Computational Biology Unit

La biología, estructura genómica y versatilidad metabólica de los procariotas marinos y los pequeños eucariotas de tamaños comparables (picoeucariotas) difieren significativamente, aunque comparten rasgos como un gran tamaño poblacional, un número limitado de operones ribosomales y su potencial para una dispersión ilimitada. Una cuestión todavía no resuelta es si ambos dominios de la vida presentan patrones de diversidad similares y si los mismo procesos ecológicos gobiernan su distribución. Es más, existe una carencia sistemática de muestras comparables entre ambientes fóticos y afóticos para los principales océanos del planeta. En el presente trabajo se presenta el primer estudio a nivel global comparando picoeucariotas y procariotas mediante el uso de secuencias de ADN ribosomal obtenidas de metagenomes (miTags) que cubren dos fracciones de tamaño (0.2-1.6 µm y 0.2-3 µm) y que incluye 1.3 x107 16S/18S miTags extraídos de más de 60 muestras de de la *Expedición Tara-Oceans* cubriendo las principales aguas fóticas y mesopelágicas. La riqueza de especies de ambos dominios no alcanzó una saturación, aunque los procariotas mostraron mayor riqueza por esfuerzo de secuenciación en la mayoría de las muestras. En general, la diversidad y estructura de las comunidades en ambos dominios covarió a escala global, sugiriendo que son procesos comunes los responsables de su biogeografía. Comparaciones inter-dominio de especialistas y generalistas (definidos en base a su amplitud de nicho) indicaron que la similitud en la estructura de las comunidades entre dominios es atribuible a los especialistas. Finalmente, el océano fótico y afótico aparecieron como dos hábitats aislados ecológicamente con excepciones en pocas localizaciones donde la composición de las comunidades sugiere una exportación masiva de microorganismos desde la superficie al océano profundo.

# Microdiversidad de genomas individuales no cultivados de Bacteroidetes marinos

**Royo-Llonch M**, Ferrera I, Cornejo-Castillo FM, Salazar G, Acinas SG
Departamento de Biología Marina y Oceanografía, Institut de Ciències del Mar ICM-CSIC, Barcelona

Los Bacteroidetes marinos representan el tercer grupo de bacterioplancton después de las Proteobacterias y Cianobacterias. Su abundancia en ambientes marinos varia del 2% en profundidad al 10% en la capa fótica hasta llegar al 53% en sistemas de afloramiento o proliferaciones de fitoplancton. Este grupo tiene un papel ecológico relevante entre otros aspectos por su capacidad de consumir polímeros de elevado peso molecular y la habilidad de algunos miembros de obtener energía adicional de la luz usando proteorodopsina. Aunque conocemos parte de su diversidad a nivel de comunidad, su descripción a nivel de especie está limitada a los aislados en cultivo, que en la mayoría de casos no representan a los genomas realmente abundantes en el medio marino. Una potente herramienta para solventar este sesgo es el análisis de Genomas Individuales no cultivados (*Single Cell Genomics*). En este trabajo hemos aplicado esta técnica para el estudio de la microdiversidad de Bacteroidetes en una muestra del Océano Índico recolectada durante la expedición Tara Oceans claramente dominada por un taxón de Bacteroidetes. De los 117 genomas amplificados, el 83% fueron identificados como Bacteroidetes filogenéticamente cercanos a *Kordia algicida* OT-1, cuyo genoma ha sido secuenciado y al que nos referimos como modelo. La disposición de 98 genomas aparentemente de la misma especie nos ha permitido estudiar su microdiversidad mediante *Multi Locus Sequencing Analysis* (MLSA) de marcadores filogenéticos conservados (genes 16S rRNA, 23S rRNA y secuencia espaciadora ITS) y metabólicos (genes proteorodopsina, *rpoB* y *recA*). Los resultados de los marcadores filogenéticos conservados revelan que se podría tratar de una población clonal, aunque los marcadores funcionales indican que hay cierta variabilidad en la población. Nuestros resultados muestran el gran potencial del SCG para estudiar la microdiversidad de la inmensa mayoría de microorganismos que no han sido cultivados.

# Evaluación de diferentes condiciones y medios de cultivo para la recuperación de *Aeromonas* en aguas regeneradas y mariscos

**Latif-Eugenín F**, Beaz-Hidalgo R, Silvera-Simón C, Figueras MJ
Unidad de Microbiología, IISPV, URV, Reus

En un proyecto nacional (AGL2011-30461-C02-02) que pretende determinar la prevalencia y diversidad de especies de *Aeromonas* aisladas a partir de aguas regeneradas y alimentos, uno de los objetivos específicos fue evaluar qué condiciones y que medios de cultivos eran los más óptimos para la recuperación de estos microorganismos. Se analizaron 12 muestras de agua regenerada y 11 de mariscos, las que fueron sembradas (sin concentrar) en tres medios de cultivos (30ºC, 24 h): Agar Dextrina Ampicilina (ADA), Agar Almidón Ampicilina (SAA) y Bilis Irgasán Verde Brillante-modificado (BIBG-m) de forma directa y tras su enriquecimiento (30ºC, 24 h) en APA suplementada con ampicilina (10 mg/L). Tras el recuento (ufc/100ml) se seleccionaron 8 colonias típicas de cada medio, identificadas a nivel de género mediante GCAT-PCR, genotipadas mediante ERIC-PCR e identificadas a nivel de especie mediante la secuenciación del gen *rpoD*. Se obtuvieron un total de 917 aislados y 829 (90,4%) se confirmaron como *Aeromonas* que al ser genotipados correspondieron a 505 cepas (348, 64,4% de aguas y 157, 54,3% de mariscos). Las 348 cepas de aguas correspondieron a 11 especies, siendo las más frecuentes: *Aeromonas media* (40,8%), *Aeromonas caviae* (21,8%) y *Aeromonas salmonicida* (15,5%). En los mariscos se identificaron 10 especies y las más prevalentes fueron: *A. salmonicida* (37,6%), *A. media* (26,1%), *A. caviae* (18,5%) y *A. allosaccharophila* (6,4%). El enriquecimiento favoreció la recuperación, tanto en agua como en mariscos, de *A. allosaccharophila* (67,9% y 70%) y *A. caviae* (59,2% y 75,9%) y también de *A. salmonicida* (69,5%) en mariscos. El ADA favoreció la recuperación de *A. allosaccharophila* (60,7%) y *A. popoffii* (77,8%) en las muestras de agua, la que sólo se aisló de este origen mediante cultivo directo. Los recuentos (ufc/100 ml) en aguas variaron entre $9{,}36 \times 10^4$ en ADA y $6{,}06 \times 10^4$ en BIBG-m y en los mariscos fluctuó entre $7{,}48 \times 10^2$ con el SAA y $6{,}4 \times 10^2$ con el ADA. El ADA (98,6%) y el BIBG-m (90,5%) fueron los medios más específicos en agua y mariscos respectivamente.

# Calidad de las aguas de baño en playas turísticas del sur de Gran Canaria. Influencia de factores climáticos: tormentas de lluvias, oleajes y corrientes superficiales marinas. Un estudio a largo plazo

**O' Shanahan-Roca L**[1], Álvarez-Pastrana S[1], Betancor-Rodríguez JR[2]
[1]Laboratorio de Bacteriología, Sección de Medio Litoral, Instituto Canario de Ciencias Marinas, Gobierno de Canarias. [2]División de Agua, Instituto Tecnológico de Canarias, Gobierno de Canarias

La Directiva europea 2006/7/CE de gestión de la calidad de las aguas de baño define los criterios para clasificar las playas con arreglo a su Calidad, obtenida a partir del percentil 95 de las concentraciones de *Escherichia coli* y enterococos intestinales de una *serie de muestras*, tomadas en cada punto de baño siguiendo un *calendario de control* dentro de la *temporada de baños*, que en Canarias tiene un año natural de duración. Durante un largo tiempo (1996-2008) se tomaron muestras de cuatro importantes playas del sur de Gran Canaria cada quince días y se elaboró un informe anual, basado en los preceptos de la legislación vigente en esos años, Directiva 76/160/CEE. Al aplicar los criterios de calidad de la nueva Directiva observamos que las playas consideradas no habrían alcanzado la Calidad Excelente en todos los años de estudio. De hecho, las playas de Maspalomas y de El Inglés incumplirían la normativa la mitad de los años. Los resultados de los análisis bacteriológicos mostraron un comportamiento que se repetía a lo largo de los años. Durante los meses de primavera-verano, se obtenían bajas concentraciones de indicadores bacterianos de contaminación, mientras que en otoño-invierno, coincidiendo con las borrascas de Sur-Suroeste, se alcanzaban valores bacterianos de $10^2$ y $10^3$ /100 ml, suficientes para elevar el percentil 95 por encima de los límites de calidad. El principal factor de contaminación son las aguas de escorrentía que desembocan en las playas de baño mezcladas con las aguas residuales procedentes de la red sanitaria en la que se producen inundaciones y desbordamientos causados por el enorme caudal de pluviales. Se plantea así un problema de difícil solución.

# Citotoxidad ejercida por el herbicida paraquat sobre la microalga de agua dulce *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard

**Esperanza, M**; Seoane, M; Cid, A; Herrero, C; Rioboo, C
Laboratorio Microbiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña. Campus da Zapateira s/n. 15071 A Coruña, España

Pesticidas y otros microcontaminantes alcanzan los sistemas acuáticos naturales, donde ejercen su toxicidad sobre especies diferentes a la diana original. Los microorganismos fototróficos, especialmente microalgas eucariotas y cianobacterias, se encuentran en la base de la cadena trófica de los sistemas acuáticos y cualquier agente que los perturbe puede ocasionar un desequilibrio en los niveles superiores. La finalidad de este estudio es profundizar en el conocimiento del potencial daño en las células de *C. reinhardtii* después de 24 h de exposición al herbicida paraquat. Para ello mediante citometría de flujo (CMF) se cuantificó el efecto del paraquat sobre crecimiento, viabilidad celular, actividad esterasa inespecífica como medida de la actividad metabólica de la célula, niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) como medida de estrés oxidativo y potencial de membrana mitocondrial. También como una primera aproximación a potenciales alteraciones a nivel del ADN se estudiaron las diferentes fases del ciclo celular por CMF, con especial atención a la subpoblación de células con núcleos subG1, y se llevaron a cabo tinciones nucleares para estudiar cambios en la morfología del núcleo. Los resultados reflejan que el paraquat provoca daños en la célula de *C. reinhardtii* a todos los niveles analizados. Se observó: descenso en la tasa de crecimiento, descenso en la viabilidad celular, descenso de la actividad metabólica, incremento de la producción de ROS y despolarización de la membrana mitocondrial. También se observó un aumento de la subpoblación de células con núcleos subG1, junto con un incremento en el porcentaje de núcleos donde se describen fenómenos de condensación de la cromatina en las células expuestas al herbicida, resultados que sugieren la activación de mecanismos relacionados con fenómenos de muerte celular programada.

# Alteración de parámetros fotosintéticos en la microalga marina *Tetraselmis suecica* en presencia de tres antibióticos utilizados en acuicultura

**Seoane M**, Esperanza M, Rioboo C, Cid Á
Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña. Campus de A Zapateira s/n 15071 A Coruña

Un factor limitante en el desarrollo de la acuicultura lo constituyen las enfermedades infecciosas, por lo que para el control y erradicación de bacterias patógenas, se utilizan diversos antibióticos. En los últimos años, los antibióticos han sido reconocidos como microcontaminantes emergentes en los ambientes acuáticos. La presencia de estos compuestos en el medio natural, podría tener efectos perjudiciales sobre organismos acuáticos no diana como las microalgas, las cuales constituyen la base de dichos ecosistemas. El objetivo de este estudio ha sido evaluar el potencial efecto tóxico del cloranfenicol (CLO), florfenicol (FLO) y oxitetraciclina (OTC), tres antibióticos utilizados en acuicultura, sobre parámetros relacionados con la fotosíntesis en la microalga marina *Tetraselmis suecica*, especie de uso generalizado también en dicho sector. Debido a que las microalgas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica en los ambientes acuáticos, se llevó a cabo un análisis de la autofluorescencia de la clorofila *a* mediante citometría de flujo y una determinación espectrofotométrica del contenido celular de clorofila *a*. Después de sólo 24 horas de exposición a los antibióticos, se produce un aumento significativo de la autofluorescencia, mientras que el contenido celular de clorofila *a* se reduce significativamente a medida que aumenta la concentración del fármaco en el medio. Este efecto podría explicarse por una alteración del flujo de electrones en la fotosíntesis, afectando negativamente a la tasa fotosintética, lo que repercutiría en el correcto funcionamiento de los ecosistemas acuáticos. La toxicidad observada para los tres antibióticos ensayados podría deberse al origen bacteriano de los cloroplastos, lo que los convierte en una potencial diana para estos compuestos.

# Sensibilidad a la temperatura de la actividad enzimática extracelular en agua superficial del océano global.

**Abad N**, Uranga A, Baña Z, Artolozaga I, Azua I, Unanue M, Ayo B, Iriberri J
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco, UPV/EHU

La actividad enzimática extracelular es un proceso microbiano relevante dado que puede limitar el crecimiento procariota a partir de materia orgánica en el océano. En este estudio se aborda, en un contexto de calentamiento global, la sensibilidad a la temperatura de enzimas que actúan hidrolizando material carbohidrato, proteico y orgánico fosforado. Durante la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*, se determinaron las energías de activación ($E_a$) y coeficientes $Q_{10}$ de las actividades β-glucosidasa (βG), leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (AP) en 31 estaciones de muestreo en los océanos Atlántico, Pacífico e Indico. Los $Q_{10}$ obtenidos para cada actividad fueron diferentes, lo que indica que un calentamiento de la superficie oceánica causaría cambios heterogéneos en la velocidad de hidrólisis de la materia orgánica. Frente a incrementos semejantes de temperatura, la respuesta de la actividad βG fue 2,5 veces superior a la actividad LAP, y esta a su vez, 2 veces superior a la actividad AP. Así, como consecuencia del calentamiento global, se puede prever un mayor incremento en la hidrólisis de carbohidratos frente a la de material proteico y orgánico fosforado, un aumento en las relaciones C:N y C:P de los productos, y consecuentemente un empobrecimiento de la calidad nutricional del material accesible a la comunidad procariota. Además, se observó una estrecha relación entre la localización latitudinal de las estaciones y la sensibilidad a la temperatura de las tres familias de enzimas, manifestándose una mayor respuesta al calentamiento y cambios más acusados en aguas de altas latitudes con respecto a la zona ecuatorial.

# Variación estacional de la composición y función de la comunidad bacteriana en el Cantábrico Oriental.

**Uranga A**[1], Abad N[1], Baña Z[1], Artolozaga I[1], Azua I[1], Unanue M[1], Arrieta JM[2], Ayo B[1], Iriberri J[1]
[1]Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco, UPV/EHU. [2]Departamento de Investigación del Cambio Global, Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados, IMEDEA, UIB, CSIC

La diversidad y la función de las comunidades bacterianas del medio marino están a menudo relacionadas, por lo que cualquier variación en su estructura, en un contexto estacional, puede generar cambios relevantes en la regulación de los procesos biogeoquímicos que llevan a cabo. En este trabajo se aborda la relación entre la diversidad de la comunidad bacteriana y su función en una estación costera del Cantábrico Oriental, a partir del seguimiento desde Febrero 2011 a Diciembre 2012 de la composición de la comunidad bacteriana, su abundancia, producción de biomasa y respiración. El análisis mediante CARD-FISH reveló un patrón recurrente de alternancia de tres tipos de comunidades asociadas a comportamientos fisiológicos concretos. Entre octubre y marzo, la comunidad estuvo dominada por Alfaproteobacterias y mostró niveles bajos de productividad. Entre mayo y agosto, estuvo dominada por Bacteroidetes y presentó elevados valores de productividad. Ambas comunidades se caracterizaron por mostrar eficiencias de crecimiento relativamente elevados (29% y 35%, valores medios, respectivamente). En los períodos de transición entre estas dos situaciones, se observaron comunidades sin predominancia de taxones concretos y con eficiencias de crecimiento notablemente inferiores (16%, valor medio), lo que se interpreta como inestabilidad y peor adaptación a esta situación de cambio medioambiental. El análisis mediante ARISA y DGGE de estas tres comunidades puso de manifiesto una sucesión de miembros relevantes de las comunidades bacterianas.

Conferencia de Clausura

# Métodos rápidos para el control microbiológico de la calidad del agua potable

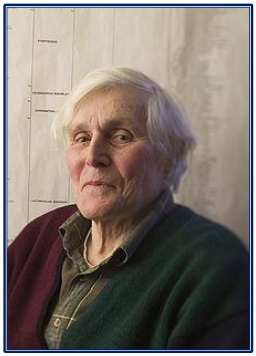
**Catalán V**, Yañez A, Soria E, Murtula R
LABAQUA S.A., Alicante

Garantizar la calidad microbiológica del agua de consumo es un problema mundial creciente. El agua debe ser tratada y controlada de forma continua siguiendo las legislaciones vigentes y en cada fase del ciclo integral del agua, con el fin de garantizar un suministro continuo de agua de calidad. Dado que la contaminación del agua puede provenir de muchas fuentes diferentes, se necesitan una serie de medidas de prevención y control de la contaminación. Los métodos habituales utilizados para la detección de microorganismos patógenos en el agua son laboriosos y el tiempo necesario para obtener resultados es generalmente largo. Por lo tanto, hay una necesidad de nuevos sistemas analíticos que permitan la detección específica, rápida y en línea de patógenos en el agua de consumo, de modo que sea posible la toma de decisiones rápidas y de ese modo impedir o minimizar el efecto sobre la salud pública de una posible contaminación de un sistema.
La implementación de sistemas de alerta temprana (EWS) podría ser una herramienta importante para prevenir o mitigar los impactos de una contaminación intencionada en un sistema de agua potable, y deberían estar centrados en la detección de tanto de microorganismos y compuestos químicos. Los sistemas EWS son buenos candidatos para formar parte de los programas de aseguramiento de la calidad del agua potable, aunque por el momento todavía existen algunas limitaciones técnicas y legislativas. Un hecho esencial a tener en cuenta es que la detección de contaminantes, como parte de los sistemas EWS, no puede basarse en los métodos convencionales aplicados usualmente en los laboratorios. Debido a esto, las instalaciones y los laboratorios de diagnóstico se enfrentan a un nuevo reto que obliga a la transición a los sistemas de control in situ, con la implementación de sistemas automatizados, análisis in-situ e incluso la implementación de sistemas de medición on-line. En este sentido, la industria ha respondido ofreciendo sistemas automatizados para el laboratorio que mejoran la

eficiencia y la robustez de las mediciones, y que en paralelo reducen el tiempo para la obtención de resultados. La tendencia es disponer de procesos automatizados para todas las fases de la actividad analítica, pre-analítica, analítica y post-analítica, de modo que se puedan satisfacer las necesidades del mercado. En microbiología, algunos procesos como la preparación de medios de cultivo, el recuento de colonias o la concentración de la muestra se han automatizado para reducir el tiempo de obtención de resultados y para mejorar, los métodos basado en el cultivo que son los actualmente considerados como métodos de referencia. Se han desarrollado también nuevas tecnologías alternativas a los métodos convencionales para la detección rápida de microorganismos, tales como métodos moleculares basados en qPCR, detección de ATP, métodos de microscopía avanzada, citometría de flujo, inmunoensayos, etc. La mayoría de ellos ya se han implementado como métodos de laboratorio y/o métodos "in-situ". Sobre la base de todas estas tecnologías, se han desarrollado diferentes equipos con el fin de conseguir una detección "on-line". Sin embargo, en este momento este tipo de metodologías se encuentra en una fase muy temprana y requieren de una validación intensiva y detallada con el fin de ser candidatos viables para su implementación como una metodología de rutina en la red de distribución de agua potable. Hay un grupo de tecnologías emergentes que podrían ser buenas candidatas para cumplir con los requisitos para convertirse en EWS para la detección de patógenos: microarrays de ADN, “molecular imprinted polymers”, sistemas micro-cantilever, biochips fotoluminiscentes, resonancia de plasmones superficiales,etc. Por último, una cuestión crítica en la detección de las bacterias en el medio ambiente es el límite de detección ya que habitualmente es necesario poder detectar pequeñas cantidades de células y en este sentido, las tecnologías de detección que son parte de EWS se deben combinar con los sistemas de concentración de la muestra. Sin duda, las nuevas tecnologías van a mejorar la eficacia y la robustez de los métodos vigentes aplicados al control de la calidad del agua potable, así como reducir considerablemente el tiempo de respuesta, permitiendo una rápida toma de decisiones que preserven la salud pública. Sin embargo, para una implementación con éxito, es obligatorio que estos nuevos métodos rápidos estén en consonancia con los requerimientos legislativos y que su coste pueda ser asumido por los usuarios finales.

| | |
|---|---|
| Naiara Abad Trueba | naiara.abad@ehu.es |
| Mónica Aguado Urda | maguadou@ucm.es |
| Daniel Alvarez Torres | dani-alto@uma.es |
| María Inés Arana Basabe | ines.arana@ehu.es |
| Ruben Avendaño Herrera | ravendano@unab.cl |
| Miguel Balado Dacosta | miguel.balado@usc.es |
| Natalia Ballesteros Benavides | nataliabal@cib.csic.es |
| Juan L.Barja Pérez | juanluis.barja@usc.es |
| Roxana Beaz-Hidalgo | roxana.beaz@urv.cat |
| Anicet Blanch Gisbert | ablanch@ub.edu |
| Juan José Borrego García | jjborrego@uma.es |
| Albert Bosch Navarro | abosch@ub.edu |
| Gema Bru Amoraga | laboratory@geneticpcr.com |
| Noemí Buján Gómez | noemi.bujan@usc.es |
| Ana Dorinda Cabirta Falque | ana.cabirta@hotmail.es |
| Antonio Camacho González | Antonio.Camacho@uv.es |
| Desirée Cascales Freire | desi.cascales@gmail.com |
| Dolores Castro López | dcastro@uma.es |
| Vicente Catalán Cuenca | vicente.catalan@labaqua.com |
| Francisco Miguel Cornejo Castillo | fmcornejo@icm.csic.es |
| Marta Esperanza Llera | m.esperanzallera@gmail.com |
| Consuelo Esteve Sánchez | estevem@uv.es |
| Alicia Estévez Toranzo | alicia.estevez.toranzo@usc.es |
| María José Figueras Salvat | mariajose.figueras@urv.cat |
| Noemí Fuster Rabat | nfuster@ub.edu |
| Rohit Ghai | rghai@umh.es |
| Silvia González Acinas | sacinas@icm.csic.es |
| Alicia Gonzálvez Moya | quality@geneticpcr.com |
| María Alejandra Guerrero Rubio | mariaalejandra.guerrero@um.es |
| Jose Agustín Guijarro Atienza | jaga@uniovi.es |
| Juan Iriberri Ramalle | juan.iriberri@ehu.es |
| Sara Isabel Pérez Prieto | saraip@cib.csic.es |
| Estefania Jimenez Valverde | ejv@uma.es |
| Lyudmyla Korenyuk | l.korenyuk@geneticpcr.com |

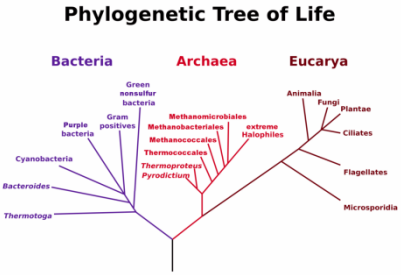
| | |
|---|---|
| Alejandro Labella Vera | amlabella@uma.es |
| Elena Lara de la Casa | elara@icm.csic.es |
| Fadua Latif Eugenín | fadualeila.latif@urv.cat |
| Manuel Lemos Ramos | manuel.lemos@usc.es |
| Arturo Levican Asenjo | aalevican@gmail.com |
| Ana Belén López Diéguez | anabelen.lopez.dieguez@usc.es |
| Jesús Ángel López Romalde | Jesus.romalde@usc.es |
| Francisco Lucena Gutiérrez | flucena@ub.edu |
| Mª Carmen Macián Rovira | macianro@cect.org |
| Julia Martín Díaz | juliamadi@hotmail.com |
| Antonio Martinez Murcia | ammurcia@geneticpcr.com |
| Rosa Mosteo Abad | mosteo@unizar.es |
| Aaron Navarro García | research@geneticpcr.com |
| Leopoldo O'Shanahan Roca | leopoldo.oshanahan@gmail.com |
| Teresa Pérez Nieto | mtperez@uvigo.es |
| Rosa María Pintó Solé | rpinto@ub.edu |
| Ana María Podadera González | apodareda@uma.es |
| María-Jesús Pujalte Domarco | maria.j.pujalte@uv.es |
| Mercedes Reguera Brito | mregue01@ucm.es |
| Leticia Rivera Fernández | leticia.rivera@uvigo.es |
| Carmina Rodríguez Fernández | carmina@ucm.es |
| Francisco Rodriguez Valera | frvalera@umh.es |
| Marta Royo Llonch | royo@icm.csic.es |
| Sara Rubio Arcos | sara.rubio@urv.cat |
| Olatz Ruiz Larrabeiti | olatz.ruiz@ehu.es |
| Laura Sala Comorera | laurasala@ub.edu |
| Guillem Salazar Guiral | salazar@icm.csic.es |
| Pablo Sánchez Fernández | pablosanchez@icm.csic.es |
| Antonio Sánchez Amat | antonio@um.es |
| Jorge Sanchís Solera | jorge@microkit.es |
| Marta Seoane Méndez | marta.seoane@udc.es |
| Inmaculada Solis Andrés | isolis@iproma.com |
| Ainhoa Uranga Larralde | ainhoa.uranga@ehu.es |
| Ana Vences Lorenzo | ana.vences@usc.es |



**Carl Richard Woese** nació en Siracusa, Nueva York, el 15 de julio de 1928. Su principal legado ha sido la creación de la hipótesis del "mundo de RNA" en el año 1967 y, en consecuencia, la aparición de la nueva taxonomía molecular basada en la comparación de secuencias de los rRNA 16S y 18S que, compartido por todos los seres vivos del planeta, apenas ha sufrido cambios desde la aparición en la Tierra de las primeras formas de vida.

Sus análisis filogenéticos en 1977 lo llevaron al descubrimiento de un nuevo dominio, Archaea (las "arqueobacterias") y a la propuesta revolucionaria de los tres dominios, Bacteria, Archaea, y Eukarya, basada en lo que hoy día se conoce como "árbol de la vida". La aceptación de la validez de Archaea, que son procariotas pero no bacterias, fue un proceso lento. No fue hasta finales de la década de los 80 cuando la creciente cantidad de datos llevó a la comunidad científica a la aceptación del nuevo dominio.

Woese ingresó en la Academia Nacional de Ciencias en 1988, recibió la Medalla Leeuwenhoek (el más alto honor en microbiología) en 1992, el Premio en Microbiología Selman A. Waksman en 1995 de la Academia Nacional de Ciencias, y en 2000 la Medalla Nacional de la Ciencia. En 2003, fue galardonado con el Premio Crafoord de la Real Academia Sueca de las Ciencias "por su descubrimiento de un tercer dominio de la vida". En 2006, fue nombrado miembro extranjero de la Royal Society.




Especies como *Pyrococcus woesei*, *Methanobrevibacter woesei*, y *Conexibacter woesei*, han sido nombradas en su honor.

Carl Richard Woese falleció el 30 de diciembre de 2012 en Urbana, a los 84 años de edad. Dedicamos esta humilde mención en su memoria.