

IX CONGRESO DE MICROBIOLOGÍA DEL MEDIO ACUÁTICO

Del 13 al 15 de septiembre de 2012

Institut d'Estudis Catalans, Barcelona

Programa y resúmenes de las comunicaciones

Con el patrocinio de:



COMITÉ ORGANIZADOR / COMITÉ CIENTÍFICO / SECRETARÍA TÉCNICA

COMITÉ ORGANIZADOR

Dr. Albert Bosch Navarro, Universidad de Barcelona
Dr. Francisco Lucena Gutiérrez, Universidad de Barcelona
Dr. Anicet Blanch Gisbert, Universidad de Barcelona
Dra. Rosa M. Pintó Solé, Universidad de Barcelona

COMITÉ CIENTÍFICO

Presidente: Dr. Juan José Borrego García, Universidad de Málaga

Dra. Elena Alcaide Moreno, Universidad de Valencia
Dr. Juan Luis Barja Pérez, Universidad de Santiago de Compostela
Dra. Alicia Estevez Toranzo, Universidad de Santiago de Compostela
Dra. M^a José Figueras Salvat, Universidad Rovira i Virgili
Dra. Dolores Furones Nozal, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària
Dr Jesús García Gil, Universidad de Girona
Dr. José Agustín Guijarro Atienza, Universidad de Oviedo
Dr. Juan Iriberry Ramalle, Universidad del País Vasco
Dr. Antonio Martínez Murcia, Universidad Miguel Hernández
Dra. Sara Isabel Pérez Prieto, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC
Dra. Carmen de la Rosa Jorge, Universidad Complutense de Madrid
Dr. Antonio Ventosa Uceró, Universidad de Sevilla

SECRETARÍA TÉCNICA

Maite Sánchez i Riera
Mariàngels Gallego i Ribó



Societat Catalana de Biologia – Institut d'Estudis Catalans
C. del Carme 47
08001 Barcelona
Tel. +34 933 248 584
e-mail: scb@iec.cat
Web: scb.iec.cat

	Jueves 13	Viernes 14	Sábado 15
8.30			
8.45	Inscripción		
9.30	Acto inaugural	Patología de las especies acuícolas II	Avances metodológicos I
10.00	Conferencia inaugural		
10.45	 Pausa-café		
11.00			
11.15			
11.30	Contaminación microbiana	Ecología y Fisiología	Avances metodológicos II
12.30			
12.30			Conferencia de clausura
13.00			Acto de clausura y entrega del I Premio Microkit
14.00	 Tiempo libre para el almuerzo	 Tiempo libre para el almuerzo	
15.30	Patología de las especies acuícolas I	Biodiversidad microbiana	
18.30			
18.45	Asamblea de grupo		
19.00		 Visita al acuario	
19.30	Recepción de bienvenida		
21.30		  Cena del congreso	

JUEVES 13 DE SEPTIEMBRE

- 8.45 Inscripción
- 9.30 Acto inaugural presidido por la Dra. Sílvia Atrian, Vicerectora de Innovación y Transferencia del Conocimiento de la Universidad de Barcelona
- 10.00 Conferencia inaugural
Health risks associated with very small drinking water supplies
Paul R. Hunter, The Norwich School of Medicine, University of East Anglia, Norwich, UK
- 10.45  Pausa-café

CONTAMINACIÓN MICROBIANA

Moderadores:

Dra. Rosa Araujo Boira, Universidad de Barcelona
Dra. M^a José Figueras Salvat, Universidad Rovira i Virgili

- 11.15 **Detección de cepas de *Escherichia coli* de los clones o25b:h4-b2-st131 y o25b:h4-d-st69 en aguas residuales urbanas y de río en Barcelona**
Marta Colomer Lluch, UB
- 11.30 **El agua de pozo como una posible fuente de infección para *Waddlia chondrophila***
Gemma Agustí, UPC
- 11.45 **Indicadores bacterianos utilizados como herramientas para medir la calidad bacteriológica de un tramo de playa de Varadero**
Yamiris Gómez, CIMAB
- 12.00 **Determinación del origen de la contaminación fecal en un sistema de canales del delta del Ebro**
Arnau Casanovas i Massana, UB
- 12.15 **MST en aguas superficiales de cinco áreas geográficas diferentes, utilizando virus humanos y animales**
Marta Rusiñol Arantegui, UB
- 12.30 **Detección y cuantificación de parvovirus de pollo/pavo como herramienta para trazar el origen de la contaminación por aves de corral**
Sílvia Bofill-Mas, UB
- 12.45 **Tratamiento de aguas residuales mediante fangos activados: importancia de los mecanismos de reducción de enterobacterias**
Idoia Garaizabal Ruiz, EHU
- 13.00 **Desinfección de un efluente secundario mediante luz solar concentrada, H₂O₂, TiO₂ y foto-fenton solar**
Míriam Agulló Barceló, UB
- 13.15 **Evolución de la biocenosis en un proceso MBR (*Membrane Bioreactor*)**
Carmen Moreno, LABAQUA
- 13.30 **Eliminación de virus entéricos en agua mediante sistemas foto-fenton**
David Polo Montero, USC
- 13.45 **Efecto de la luz solar y la temperatura sobre la estabilidad de los adenovirus humanos como contaminantes en el medio acuático**
Anna Carratalá, UB
- 14.00  Almuerzo

JUEVES 13 DE SEPTIEMBRE

PATOLOGÍA DE LAS ESPECIES ACUÍCOLAS I

Moderadores:

Dr. Juan José Borrego García, Universidad de Málaga
Dra. Alicia Estevez Toranzo, Universidad de Santiago de Compostela

- 15.30 **Desarrollo de un sistema experimental para el estudio de la inducción de la expresión de la proteína MX de lenguado senegalés**
Daniel Álvarez Torres, UMA
- 15.45 **La toxina Martx de *Vibrio vulnificus* pv. *piscis* es un factor de virulencia y supervivencia**
Carmen Amaro González, UV
- 16.00 **Búsqueda de genes implicados en la virulencia de *Edwardsiella tarda* para peces**
Núria Castro Iglesias, USC
- 16.15 **Adherencia e invasión de *Lactococcus garvieae* en células no fagocíticas de trucha**
Maria del Mar Blanco Gutiérrez, UCM
- 16.30 **Construcción de un vector basado en el operón Lux para el análisis del proceso infeccioso de *Lactococcus garvieae***
Desirée Cascales Freire, IUBA
- 16.45 **Respuesta transcripcional de truchas susceptibles y resistentes a *Flavobacterium psychrophilum***
Maria del Mar Blanco Gutiérrez, UCM
- 17.00 **Análisis transcriptómico por Microarray de respuesta a la proteína VP2 del IPNV en trucha arco-iris y de expresión de genes de inmunidad**
Natalia Ballesteros Benavides, CIB-CSIC
- 17.15 **Estudio *in vitro* de la coexistencia de los genotipos SJNNV y RGNNV de betanodavirus**
Carlos Carballo Pérez, UMA
- 17.30 ***Artemia* sp. como reservorio del virus de la enfermedad de linfocistis (ICDV)**
Estefanía Jiménez Valverde, UMA
- 17.45 **Susceptibilidad de juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*) a diferentes aislados del virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV)**
Benjamín López Jimena, IFAPA
- 18.00 **Detección de virus patógenos piscícolas en bancos pesqueros naturales del sur de la Península Ibérica**
Patricia Moreno García, UMA
- 18.15 **Poliploidía en birnavirus acuáticos: una nueva estrategia para modular la virulencia**
Maria del Carmen Lago Lorenzo, USC
- 18.30 **Estructura genética de la población de *Flavobacterium psychrophilum* en salmonidos cultivados en Chile**
Ruben Avendaño-Herrera, Universidad Andrés Bello, Chile

VIERNES 14 DE SEPTIEMBRE

PATOLOGÍA DE LAS ESPECIES ACUÍCOLAS II

Moderadores:

Dr. José Agustín Guijarro Atienza, Universidad de Oviedo
Dra. Sara Isabel Pérez Prieto, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

- 8.30 **Expresión in vitro de genes de quorum sensing en *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* mediante PCR a tiempo real**
Rosa Farto Seguí, UVigo
- 8.45 **Análisis fenotípico de un mutante en un gen involucrado en la biosíntesis y/o transporte de polisacáridos en *Flavobacterium psychrophilum***
Esther Gómez López, IUBA
- 9.00 **Implicación del gen ACRA en la resistencia a compuestos tóxicos en *Yersinia ruckeri***
Maria Jéssica Méndez Sotorrió, UNIOVI
- 9.15 **La ausencia en *Yersinia ruckeri* de la alquil sulfatasa YRAS origina un fenotipo semejante al definido en cepas carentes del factor sensible al calor (HSF)**
Roberto Navais Barranco, IUBA
- 9.30 **Papel de los sistemas de captación de hierro en la virulencia y la supervivencia de *Vibrio vulnificus* pv. *piscis***
David pajuelo Gámez, UV
- 9.45 **Identificación mediante proteómica y secuenciación de un grupo de genes involucrados en la biosíntesis y transporte de un sideróforo en *Photobacterium damsela* subsp. *damsela***
Beatriz Puentes Corral, USC
- 10.00 **Síntesis de sideróforos en *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: producción diferencial de acinetobactina y amonabactina**
Ana Vences Lorenzo, USC
- 10.15 **Case History: Infection with *Pseudomonas anguilliseptica* and *Delftia acidovorans* in the European Eel (*Anguilla anguilla*)**
Karl Andree, IRTA
- 10.30 **Respuesta inmune de reproductores de rodaballo (*Psetta maxima*)**
Paula García González, USC
- 10.45 **Selección de bacterias con capacidad probiótica en acuicultura**
Maria Teresa Pérez Nieto, UVigo
- 11.00  Pausa-café

Moderadores:

Dr. Juan Iriberry Ramalle, Universidad del País Vasco
Dra. Maria Jesús Pujalte Domarco, Universidad de Valencia

- 11.30 **Estudio de la susceptibilidad del lenguado (*Solea senegalensis*) a la infección con betanodavirus recombinantes a diferentes temperaturas**
Sandra Souto Pereira, USC
- 11.45 **Respuesta proteómica a la exposición al Cu^{2+} en la bacteria marina *Pantoea* sp.**
Álex González, ULagos
- 12.00 **Proteómica de expresión diferencial entre una cepa de *Edwardsiella tarda* virulenta para el rodaballo y otra avirulenta**
Noemí Bujan Gómez, USC
- 12.15 **Nuevas especies bacterianas marinas con actividad *quorum quenching***
Manuel Romero Bernárdez, USC
- 12.30 **Estudios preliminares del mecanismo de *quorum sensing* y del sistema de secreción tipo VI en *Vibrio tapetis***
Sabea Balboa Méndez, USC
- 12.45 **Divergencia y dinámica evolutiva de *Yersinia ruckeri***
Asmine Victoria Bastardo Espinoza, USC
- 13.00 **Comparación de la microbiota cultivable presente en dos sistemas de producción de vieira (*Pecten maximus*) en Noruega**
Ana Diéguez, USC
- 13.15 **Abundancia, diversidad y papel ecológico de las bacterias fotoheterotróficas marinas**
Isabel Ferrera, ICM-CSIC
- 13.30 **Estudio de *Legionella* y otros microorganismos en las diferentes fases de la estación de tratamiento de aguas potables de Sant Joan Despí y su afectación en la red de abastecimiento**
Carles Vilaró Juanuix, AGBAR
- 13.45 **Estabilidad y dinámica funcional en tapetes microbianos: el ejemplo de las poblaciones de espiroquetas**
Mercedes Berlanga Herranz, UB
- 14.00  Almuerzo

Moderadores:

Dr. Antonio Martínez Murcia, GPS
Dra. Maria Teresa Pérez Nieto, Universidad de Vigo

- 15.30 **Biogeografía y diversidad de procariotas diazotróficos marinos mediante técnicas moleculares y genómicas**
Francisco Miguel Cornejo Castillo, ICM-CSIC
- 15.45 **Calidad microbiológica del río Henares**
Inmaculada Fernández Monistrol, UAH
- 16.00 **Análisis epidemiológico de calicivirus en brotes de gastroenteritis transmitidos por agua y por consumo de marisco en Cataluña**
Susana Guix Arnau, UB
- 16.15 **Detección y genotipado de norovirus detectados en muestras clínicas y de moluscos. Implicaciones epidemiológicas**
Carmen Manso, USC
- 16.30 **Virus nuevos, emergentes y clásicos detectados en agua, empleando un procedimiento de concentración de bajo costo, ensayos de PCR y secuenciación en masa**
Byron Calgua de León, UB
- 16.45 **Diversidad de especies de *Arcobacter* en muestras de aguas residuales procedentes de plantas de tratamiento americanas**
Arturo Levican, URV
- 17.00 **Diversidad de *Aeromonas* en afloramientos de cianobacterias en Finlandia**
Roxana Beaz Hidalgo, URV
- 17.15 **Efecto de la inmuoestimulación nutricional sobre la microbiota intestinal de la lubina (*Dicentrarchus labrax*)**
Miguel Carda Diéguez, UV
- 17.30 **Caracterización polifásica de aislados de *Shewanella* spp. asociados a microbiota de almeja**
Aide Lasa González, USC
- 17.45 **The symbiotic mycobiota of aquatic insects: eluded group of fresh-water inhabitants?**
Laia Guardia Valle, UAB
- 18.00 **Caracterización y trazabilidad de las poblaciones bacterianas aeróbicas heterotróficas de aguas minerales naturales embotelladas**
Laura Sala Comorera, UB
- 18.15 **Aplicación de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente para el estudio de la diversidad microbiológica de una planta piloto de eliminación de nitrógeno**
Tarik Abzazou Souissa, UB
- 18.30  Visita al acuario
- 21.00  Cena

SÁBADO 15 DE SEPTIEMBRE

AVANCES METODOLÓGICOS I

Moderadores:

Dr. Jesús López Romalde
Dra. Maite Muniesa Pérez, Universidad de Barcelona

- 8.30 **Desarrollo de filtros ceramicos para la eliminación de virus del agua de bebida en el contexto de Haití**
Rosina Gironés Llop, UB
- 8.45 **Efecto de la radiación ultravioleta sobre Legionella y protozoos**
Silvia Cervero Aragón, UB
- 9.00 **Validación del método de cuantificación de *Legionella spp* y *Legionella pneumophila* mediante *real time* PCR según AFNOR NF T90-471 en el marco de la ISO 17025**
Gemma Saucedo Pagès, AGBAR
- 9.15 **Efectos de la agregación inducida por cultivo en bio-pellets y su uso como inóculo en la verificación de técnicas de detección de *Legionella pneumophila***
Immaculada Solís, IPROMA
- 9.30 **Nuevo método para la detección molecular directa de *Aeromonas spp.* en muestras de agua**
Fadua Latif Eugenin, URV
- 9.45 **Defensa del método P/A con los kits de microkit® para análisis microbiológicos oficiales de aguas, mediante datos intercomparativos**
Jorge Sanchis Solera, Microkit
- 10.00 **Detección de *bifidobacteriaceae* específicas de huésped apropiadas para *microbial source tracking* mediante QPCR molecular en tiempo real**
Marta Gómez Doñate, UB
- 10.15 **Desarrollo de una one-step RT-PCR cuantitativa cuádruplex para la detección y cuantificación simultánea del virus de la hepatitis A, norovirus GI y GII y mengovirus**
Cristina Fuentes, UB
- 10.30 **PCR diagnóstica para la detección de patógenos marinos**
Paula García González, USC
- 10.45 **Comparación de los metodos de medida de concentracion del ARNBC para la QPCR del aquabirnavirus IPNV**
Diego Vázquez Rodríguez, USC

SÁBADO 15 DE SEPTIEMBRE

AVANCES METODOLÓGICOS II

Moderadores:

Dr. Jesús López Romalde

Dra. Maite Muniesa Pérez, Universidad de Barcelona

- 11.30 **Desarrollo de un nuevo ensayo T-RFLP para el estudio de la diversidad de las comunidades de virus que infectan microalgas**
Anna Carratalá, UB
- 11.45 **Purificación y caracterización parcial del componente C3 del complemento de rodaballo (*Psetta maxima*)**
Samuel González González, USC
- 12.00 **Análisis por MALDI-TOF MS de cepas de la familia *Vibrionaceae* depositadas en la CECT**
M^a Desamparados Ruvira Garrigues, CECT
- 12.15 **Análisis multilócico del clado 'mediterranei' del género *Vibrio*, basado en secuencias parciales de los genes 16s RRNA, GYRB, RPOD, MREB y PYRH**
Eva Tarazona, CECT

CONFERENCIA DE CLAUSURA

- 12.30 Conferencia de clausura
Herramientas genómicas para la descripción de la microbiota de medios acuáticos
Francisco Rodríguez Varela, UMH

ACTO DE CLAUSURA Y PREMIO MICROKIT

- 13.00 Acto de clausura y entrega del I Premio Microkit

13 de septiembre de 2012

Cocktail de bienvenida en el Institut d'Estudis Catalans

**14 de septiembre de 2012**

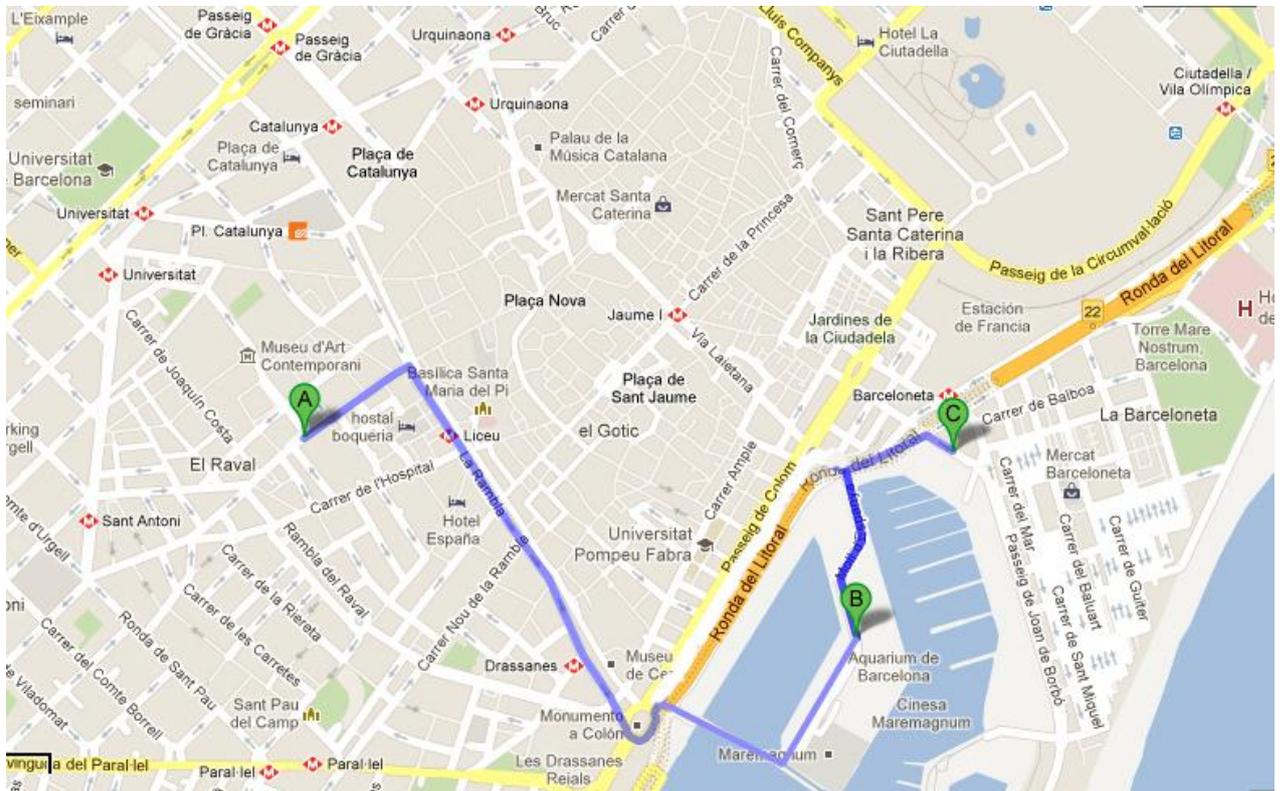
Visita al Aquarium de Barcelona



Cena del Congreso en el Restaurant 1881

Musueu d'Història de Catalunya





A	INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS Carrer del Carme, 47 08001 Barcelona
----------	--

B	AQUARIUM DE BARCELONA Moll d'Espanya, 7 08039 Barcelona
----------	---

C	RESTAURANT 1881 Museu d'Història de Catalunya Plaça de Pau Vila, 3 08003 Barcelona
----------	---

CONVOCATORIA DEL PRIMER PREMIO MICROKIT A LA MEJOR PONENCIA EN MICROBIOLOGIA DEL MEDIO ACUATICO

concedido POR LABORATORIOS MICROKIT, S.L. y el GRUPO DE MICROBIOLOGIA DEL MEDIO ACUATICO DE SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGIA a la mejor ponencia de la especialidad presentada en el

IX CONGRESO SEM MICROBIOLOGÍA DEL MEDIO ACUÁTICO

Bases:

- Los candidatos/as deberán ser socios de la SEM y miembros del Grupo de Microbiología del Medio Acuático.
- El premio estará dotado con 300 euros y un diploma acreditativo.
- Las presentaciones serán evaluados por una comisión compuesta por microbiólogos de reconocido prestigio coordinados por el presidente del Grupo.

ÍNDICE

TÍTULO	PÁGINA
CONFERENCIA INAUGURAL	
-Health risks associated with very small drinking water supplies	18
CONTAMINACIÓN MICROBIANA	
-Detección de cepas de <i>Escherichia coli</i> de los clones o25b:h4-b2-st131 y o25b:h4-d-st69 en aguas residuales urbanas y de río en Barcelona	19
-El agua de pozo como una posible fuente de infección para <i>Waddlia chondrophila</i>	20
-Indicadores bacterianos utilizados como herramientas para medir la calidad bacteriológica de un tramo de playa de Varadero	21
-Determinación del origen de la contaminación fecal en un sistema de canales del delta del Ebro	22
-MST en aguas superficiales de cinco áreas geográficas diferentes, utilizando virus humanos y animales	23
-Detección y cuantificación de parvovirus de pollo/pavo como herramienta para trazar el origen de la contaminación por aves de corral	24
-Tratamiento de aguas residuales mediante fangos activados: importancia de los mecanismos de reducción de enterobacterias	25
-Desinfección de un efluente secundario mediante luz solar concentrada, H ₂ O ₂ , TiO ₂ y foto fenton solar	26
-Evolución de la biocenosis en un proceso MBR (<i>Membrane Bioreactor</i>)	27
-Eliminación de virus entéricos en agua mediante sistemas foto-fenton	28
-Efecto de la luz solar y la temperatura sobre la estabilidad de los adenovirus humanos como contaminantes en el medio acuático	29
PATOLOGÍA DE LAS ESPECIES ACUÍCOLAS I	
-Desarrollo de un sistema experimental para el estudio de la inducción de la expresión de la proteína MX de lenguado senegalés	30
-La toxina Martx de <i>Vibrio vulnificus</i> pv. <i>piscis</i> es un factor de virulencia y supervivencia	31
-Búsqueda de genes implicados en la virulencia de <i>Edwardsiella tarda</i> para peces	32

-Adherencia e invasión de <i>Lactococcus garvieae</i> en células no fagocíticas de trucha	33
-Construcción de un vector basado en el operón Lux para el análisis del proceso infeccioso de <i>Lactococcus garvieae</i>	34
-Respuesta transcripcional de truchas susceptibles y resistentes a <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	35
-Análisis transcriptómico por Microarray de respuesta a la proteína VP2 del IPNV en trucha arco iris y de expresión de genes de inmunidad	36
-Estudio <i>in vitro</i> de la coexistencia de los genotipos SJNNV y RGNNV de betanodavirus	37
- <i>Artemia</i> sp. como reservorio del virus de la enfermedad de linfocistis (ICDV)	38
-Susceptibilidad de juveniles de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>) a diferentes aislados del virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV)	39
-Detección de virus patógenos piscícolas en bancos pesqueros naturales del sur de la Península Ibérica	40
-Poliploidía en birnavirus acuáticos: una nueva estrategia para modular la virulencia	41
-Estructura genética de la población de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> en salmonidos cultivados en Chile	42
PATOLOGÍA DE LAS ESPECIES ACUÍCOLAS II	43-52
-Expresión <i>in vitro</i> de genes de quorum sensing en <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> mediante PCR a tiempo real	43
-Análisis fenotípico de un mutante en un gen involucrado en la biosíntesis y/o transporte de polisacáridos en <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	44
-Implicación del gen ACRA en la resistencia a compuestos tóxicos en <i>Yersinia ruckeri</i>	45
-La ausencia en <i>Yersinia ruckeri</i> de la alquil sulfatasa YRAS origina un fenotipo semejante al definido en cepas carentes del factor sensible al calor (HSF)	46
-Papel de los sistemas de captación de hierro en la virulencia y la supervivencia de <i>Vibrio vulnificus</i> pv. <i>piscis</i>	47
-Identificación mediante proteómica y secuenciación de un grupo de genes involucrados en la biosíntesis y transporte de un sideróforo en <i>Photobacterium damselae</i> subsp. <i>Damselae</i>	48

-Síntesis de sideróforos en <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> : producción diferencial de acinetobactina y amonabactina	49
-Case History: Infection with <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> and <i>Delftia acidovorans</i> in the European Eel (<i>Anguilla anguilla</i>)	50
-Respuesta inmune de reproductores de rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	51
-Selección de bacterias con capacidad probiótica en acuicultura	52
ECOLOGÍA Y FISIOLOGÍA	53-62
-Estudio de la susceptibilidad del lenguado (<i>Solea senegalensis</i>) a la infección con betanodavirus recombinantes a diferentes temperaturas	53
-Respuesta proteómica a la exposición al Cu+2 en la bacteria marina <i>Pantoea</i> sp.	54
-Proteómica de expresión diferencial entre una cepa de <i>Edwardsiella tarda</i> virulenta para el rodaballo y otra avirulenta	55
-Nuevas especies bacterianas marinas con actividad <i>quorum quenching</i>	56
-Estudios preliminares del mecanismo de <i>quorum sensing</i> y del sistema de secreción tipo VI en <i>Vibrio tapetis</i>	57
-Divergencia y dinámica evolutiva de <i>Yersinia ruckeri</i>	58
-Comparación de la microbiota cultivable presente en dos sistemas de producción de vieira (<i>Pecten maximus</i>) en Noruega	59
-Abundancia, diversidad y papel ecológico de las bacterias fotoheterotróficas marinas	60
-Estudio de Legionella y otros microorganismos en las diferentes fases de la estación de tratamiento de aguas potables de Sant Joan Despí y su afectación en la red de abastecimiento	61
-Estabilidad y dinámica funcional en tapetes microbianos: el ejemplo de las poblaciones de espiroquetas	62
BIODIVERSIDAD MICROBIANA	63-74
-Biogeografía y diversidad de procariontes diazotróficos marinos mediante técnicas moleculares y genómicas	63
-Calidad microbiológica del río Henares	64
-Análisis epidemiológico de calicivirus en brotes de gastroenteritis transmitidos por agua y por consumo de marisco en Cataluña	65

-Detección y genotipado de norovirus detectados en muestras clínicas y de moluscos. Implicaciones epidemiológicas	66
-Virus nuevos, emergentes y clásicos detectados en agua, empleando un procedimiento de concentración de bajo coste, ensayos de PCR y secuenciación en masa	67
-Diversidad de especies de <i>Arcobacter</i> en muestras de aguas residuales procedentes de plantas de Tratamiento americanas	68
-Diversidad de <i>Aeromonas</i> en afloramientos de cianobacterias en Finlandia	69
-Efecto de la inmunoestimulación nutricional sobre la microbiota intestinal de la lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	70
-Caracterización polifásica de aislados de <i>Shewanella</i> spp. asociados a microbiota de almeja	71
-The symbiotic mycobiota of aquatic insects: eluded group of fresh-water habitants?	72
-Caracterización y trazabilidad de las poblaciones bacterianas aeróbicas heterotróficas de aguas Minerales naturales embotelladas	73
-Aplicación de la técnica de hibridación <i>in situ</i> fluorescente para el estudio de la diversidad microbiológica de una planta piloto de eliminación de nitrógeno	74
AVANCES METODOLÓGICOS I	75-86
-Desarrollo de filtros ceramicos para la eliminación de virus del agua de bebida en el contexto de Haití	75
-Efecto de la radiación ultravioleta sobre <i>Legionella</i> y protozoos	76
-Validación del método de cuantificación de <i>Legionella</i> spp y <i>Legionella pneumophila</i> mediante <i>real time</i> PCR según AFNOR NF T90-471 en el marco de la ISO 17025	77
-Efectos de la agregación inducida por cultivo en bio-pellets y su uso como inóculo en la verificación de técnicas de detección de <i>Legionella pneumophila</i>	78
-Nuevo método para la detección molecular directa de <i>Aeromonas</i> spp. en muestras de agua	79
-Defensa del método P/A con los kits de microkit® para análisis microbiológicos oficiales de aguas, Mediante datos intercomparativos	80
-Detección de <i>bifidobacteriaceae</i> específicas de huésped apropiadas para <i>microbial source trackin</i> Mediante QPCR molecular en tiempo real	83

-Desarrollo de una one-step RT-PCR cuantitativa cuádruplex para la detección y cuantificación simultánea del virus de la hepatitis A, norovirus GI y GII y mengovirus	84
-PCR diagnóstica para la detección de patógenos marinos	85
-Comparación de los metodos de medida de concentracion del ARNBC para la QPCR de aquabirnavirus IPNV	86
AVANCES METODOLÓGICOS II	87-90
-Desarrollo de un nuevo ensayo T-RFLP para el estudio de la diversidad de las comunidades de virus que infectan microalgas	87
-Purificación y caracterización parcial del componente C3 del complemento de rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	88
-Análisis por MALDI-TOF MS de cepas de la familia <i>Vibrionaceae</i> depositadas en la CECT	89
-Análisis multilócico del clado 'mediterranei' del género <i>Vibrio</i> , basado en secuencias parciales de los genes 16s RRNA, GYRB, RPOD, MREB y PYRH	90
CONFERENCIA DE CLAUSURA	
-Herramientas genómicas para la descripción de la microbiota de medios acuáticos	91

Conferencia inaugural

HEALTH RISKS ASSOCIATED WITH VERY SMALL DRINKING WATER SUPPLIES

Paul R. Hunter¹

¹The Norwich School of Medicine, University of East Anglia, Norwich, UK

Most residents of the European Union are able to enjoy a level of safety with their drinking water unparalleled in history. Although outbreaks of infection associated with public water supplies do still occur they are relatively infrequent. However, an estimated 10% of the European population are served by small and very small water supplies. Most of these supplies provide water to less than 50 people and are usually managed by the consumers themselves. It is well recognized that people reliant on such supplies are at increased risk of being involved in an outbreak of disease. It is also known that such supplies are highly likely to be prone to faecal pollution as indicated by high rates of contamination by *E. coli*. This presentation will focus on estimating the disease risk faced by people reliant on such small supplies for their drinking water.

This presentation will consider work from QMRA analyses and also epidemiological studies. Recent work on quantitative risk assessment will be reviewed especially as it applies to the risks from *Cryptosporidium*, and *Giardia*.

A recently completed cohort study of self-reported diarrhoea in people living in homes taking their water from very small water supplies will also be discussed.

Finally we shall consider how the risks from these supplies may change as a result of climate change.

JUEVES 13 DE SEPTIEMBRE

CONTAMINACIÓN MICROBIANA

DETECCIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* DE LOS CLONES O25b:H4-B2-ST131 Y O25b:H4-D-ST69 EN AGUAS RESIDUALES URBANAS Y DE RÍO EN BARCELONA

Marta Colomer Lluch^{1*}, Azucena Mora², Cecilia López², Rosalia Mamani², Ghizlane Dahbi², Maite Muniesa¹ y Jorge Blanco²

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona. ² Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo

Recientemente ha emergido el clon intercontinental de *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131, que representa un importante problema de salud pública. Las cepas de este clon pertenecen al serotipo O25b:H4, al grupo filogenético B2 y a la secuencia tipo ST131. Muchas de las cepas presentan resistencia a las quinolonas y algunas producen betalactamasas de espectro extendido (BLEE), especialmente el enzima CTX-M-15. Además, las cepas de este clon poseen numerosos genes de virulencia, lo que implica un riesgo elevado para la población humana. En este estudio se ha evaluado la prevalencia del clon O25b:H4-B2-ST131 en aguas residuales urbanas y aguas de río en Barcelona entre otoño del 2009 y primavera del 2010, y se han estudiado los genes de patogenicidad de las cepas aisladas para determinar su potencial virulencia.

La detección del clon O25b:H4-B2-ST131 de las muestras ambientales se realizó por aislamiento en Chromocult agar conteniendo ampicilina (32 µg/ml) a partir de las muestras de agua amplificando el gen *rfbO25b*. En las colonias aisladas, el tipo de BLEE producido se determinó por PCR y secuenciación. También por PCR se determinaron el grupo filogenético y los genes de virulencia. El tipado molecular se realizó por la técnica de PFGE y MLST para establecer la secuencia tipo.

La prevalencia de cepas O25b fue de 12,3% de las colonias amp^R aisladas por ml de agua residual y 9,9 % en agua de río. De las colonias aisladas 2/3 partes correspondieron al clon O25b:H4-B2-ST131, con patotipos y pulsotipos similares a los de las cepas causantes de infecciones urinarias y septicemias en seres humanos, lo que indica una significativa prevalencia en las aguas residuales urbanas y de río en la ciudad de Barcelona. El resto de colonias O25b detectadas en las muestras de agua correspondieron a cepas O25b:H4-D-ST69, aunque presentaron patotipos y pulsotipos distintos a los de las cepas ST69 del grupo clonal A, causantes de infecciones en seres humanos.

EL AGUA DE POZO COMO UNA POSIBLE FUENTE DE INFECCIÓN PARA *WADDLIA CHONDROPHILA*Francesc Codony¹, Mariana Fittipaldi¹, Jordi Morató¹ y Gemma Agustí^{1*}

¹Laboratorio de Microbiología Sanitaria y Medioambiental (MSMLab-Aguasost)-Catedra UNESCO de Sostenibilidad, UPC, Edificio Gaia, 08222, Terrassa, Barcelona.

Waddliachondrophila es una bacteria intracelular obligada que pertenece a la familia *Waddliaceae* y al orden *Chlamydiales*. Esta bacteria está considerada un patógeno emergente causante de abortos en bovinos y enfermedades respiratorias en los seres humanos, y durante los últimos años se la ha relacionado como causa directa de abortos idiopáticos en mujeres embarazadas en el primer trimestre. A pesar de estos hechos, la fuente de infección y la vía de transmisión no han sido identificadas. Además poco se sabe de su distribución ambiental y de su prevalencia. La evidencia del crecimiento de *W. chondrophila* en agua sugiere el agua como una posible fuente de infección ambiental. La presencia de *W. chondrophila* se determinó en muestras de agua potable y de agua de pozo (n = 70) mediante PCR cuantitativa y posterior confirmación de la presencia de la bacteria, en las muestras positivas, mediante secuenciación. Se obtuvieron resultados positivos en 10 (25%) de las 40 muestras de agua de pozo analizadas. No se obtuvieron resultados positivos en ninguna de las muestras de agua potable estudiadas. Los resultados obtenidos muestran el agua de pozo como un potencial reservorio y una posible fuente de infección para *W. chondrophila* en animales y humanos. En este estudio también se determinó el método de PCR cuantitativa como una herramienta útil para la detección de *W. chondrophila* en muestras provenientes de fuentes ambientales.

INDICADORES BACTERIANOS UTILIZADOS COMO HERRAMIENTAS PARA MEDIR LA CALIDAD BACTERIOLÓGICA DE UN TRAMO DE PLAYA DE VARADERO

MSc. Gómez D'Angelo Yamiris* T., Lic. López Pérez Lisse, MSc. Regadera Prats Reynaldo. Téc. Álvarez Valiente Reynaldo.

Centro de Ingeniería y Manejo Ambiental de Bahías y Costas (CiMAB)

Email: yamiris@cimab.transnet.cu, microbiologia@cimab.transnet.cu

La enumeración de los indicadores bacterianos en los ecosistemas marinos tiene relevancia porque permite estimar la calidad bacteriológica y el potencial de riesgo para la salud pública por el uso de las aguas. En el presente trabajo se evaluó la calidad bacteriológica de un tramo de playa de 17 km en Varadero, estableciendo once puntos de muestreos, durante los meses de marzo, julio, octubre y diciembre del 2010, para lo cual se llevó a cabo la determinación de coliformes termotolerantes y estreptococos fecales utilizando la Técnica de Fermentación de Tubos Múltiples y enterococos (octubre y diciembre) por la técnica de Filtración de Membrana. Así como se determinó la concentración de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas con el objetivo de caracterizar de manera presuntiva el estado trófico de sus aguas. Las concentraciones de los indicadores de contaminación fecal demuestran que la calidad bacteriológica de estas playas en el periodo de tiempo evaluado es satisfactoria, ya que en todos los casos los niveles detectados de cada uno de ellos son inferiores a los máximos valores reportados en la Norma Cubana y en las Normas Internacionales utilizadas, según sea el caso. La comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos empleados demostró que la Técnica de Filtración de Membrana es aconsejable utilizarla en ambientes poco contaminados, debido a su mayor sensibilidad. Las concentraciones de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas detectadas en cada una de las estaciones predicen que en estas aguas predominan las condiciones oligotróficas con tendencias mesotróficas.

DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL EN UN SISTEMA DE CANALES DEL DELTA DEL EBRO

Arnau Casanovas-Massana*, Marta Gómez-Doñate, Maite Muniesa y Anicet R. Blanch

Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Barcelona

La contaminación fecal, tanto de origen humano como animal, es una de las causas principales del deterioro de la calidad del agua. La identificación del origen de este tipo de contaminación en el agua es esencial para poder tomar las medidas preventivas y correctoras necesarias. En este estudio se propuso determinar el origen de la contaminación fecal en un sistema de canales de riego en el delta del Ebro, cercano a dos pequeños núcleos de población.

Para ello se tomaron muestras en ocho puntos del sistema y se enumeraron las poblaciones de *E. coli* y enterococos. Se cuantificaron también los bacteriófagos somáticos y los bacteriófagos de *Bacteroides* específicos de origen (Gómez-Doñate et al., 2011). Finalmente, se procedió a examinar la presencia de marcadores moleculares mitocondriales específicos de animales (Kortbaoui et al. 2009). Adicionalmente, se realizaron todas las pruebas anteriores en dos matrices de agua con niveles de contaminación fecal más elevado (agua residual humana y de mataderos, y agua de río).

Los resultados indicaban que los niveles de contaminación fecal eran muy bajos en todo el sistema, y, por lo tanto, algunos de los indicadores utilizados se encontraban muy cerca de sus propios límites de detección. Se observó que un punto del sistema presentaba una contaminación puntual de origen humano. En los demás puntos la contaminación era mucho más difusa, y era debida a una combinación de diferentes orígenes, aunque en bajas concentraciones. La contaminación fecal de las aves autóctonas del área de estudio parecía ser uno de los principales focos de esta contaminación difusa.

En conclusión, la combinación de métodos utilizados (dependientes de cultivo y moleculares) permitió discriminar adecuadamente el origen de la contaminación fecal en un sistema natural con concentraciones bajas de material fecal.

MST EN AGUAS SUPERFICIALES DE CINCO AREAS GEOGRAFICAS DIFERENTES, UTILIZANDO VIRUS HUMANOS Y ANIMALES

Marta Rusiñol¹, Xavier Fernandez-Cassi¹, Ayalkibet Hundesa¹, Carmen Baur², Anita Kern³, Irene Erikson⁴, Panos Ziros⁵, Marize Miagostovich², Marta Vargha³, Annika Allard⁴, Apostolos Vantarakis⁵, David Kay⁶, Peter Wyn-Jones⁶, Sílvia Bofill-Mas¹ and Rosina Girones¹.

¹ University of Barcelona (Spain), ²Instituto Oswaldo Cruz (Brasil), ³ National Institute of Environmental Health (Hungria), ⁴ University of Umeå (Suecia), ⁵ University of Patras (Grecia), ⁶ Aberystwyth University (Inglaterra)

La identificación de las fuentes de contaminación fecal en el ambiente (MST) juega un papel clave en la gestión del riesgo así como en la definición de técnicas de remediación. Tras 18 meses de muestreo llevado a cabo en el proyecto VIROCLIME se han analizado 4 marcadores virales específicos (adenovirus humanos (HAdV), poliomavirus JC (JCPyV), adenovirus porcinos (PAdV) y poliomavirus bovinos (BPpV)) en cinco escenarios seleccionados en diferentes zonas climáticas: río Negro (Brasil), río Glafkos (Grecia), río Tisza (Hungria), río Llobregat (España) y río Umeälven (Suecia).

Los marcadores humanos presentan una alta prevalencia durante todo el año en la mayoría de los sitios de muestreo. En áreas donde no existe saneamiento, las aguas residuales se vierten directamente al medio dando lugar a un agua de río con concentraciones medias de hasta 10^5 HAdV/L o 10^4 JCPyV/L. En general, las muestras de río recolectadas aguas arriba de la ciudad presentan cargas virales más bajas que las recogidas en los puntos de muestreo aguas abajo, las concentraciones medias aumentan con el tamaño de la población y se diluyen en los ríos más caudalosos. Este efecto se observa sobretodo en el área Mediterránea durante la primavera-otoño y después de cada evento de lluvia. Sin embargo, durante la estación seca el caudal de agua de los ríos disminuye dramáticamente y es entonces cuando los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales representan el grueso de la descarga fluvial.

Los marcadores virales animales se detectan a concentraciones de 10^3 copias genómicas/L, en las zonas con ganadería intensiva, mataderos o actividades agrícolas. Durante la primavera y el verano, cuando el ganado está al aire libre, la contaminación difusa se incrementa y la escorrentía de aguas superficiales afecta directamente al medio acuático. Los resultados presentados en el estudio demuestran el potencial de estos marcadores en la protección y monitoreo de la calidad del agua. Los datos generados se aplicaran en el desarrollo de modelos de diseminación de virus en agua integrados en modelos de cambio climático en desarrollo en VIROCLIME.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PARVOVIRUS DE POLLO/PAVO COMO HERRAMIENTA PARA TRAZAR EL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN POR AVES DE CORRAL

Anna Carratalà¹, Marta Rusiñol¹, Ayalkibet Hundesa¹, Mar Biarnes², Jesús Rodríguez-Manzano¹, Ester Suñen³, Rosina Girones¹, Sílvia Bofill-Mas^{1*}

¹ Department de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona.

² Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó, Ctra. Castellvell, s/n, 43206 Reus, Tarragona.

³ Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco, Paseo de la Universidad, 7. 01006 Vitoria-Gasteiz.

La avicultura produce un gran volumen de diferentes subproductos que pueden introducir patógenos bacterianos en el medio ambiente circundante y en la cadena alimentaria y en ocasiones se utilizan como abono para fertilizar los cultivos. El origen de la contaminación fecal debe ser identificado para procurar una adecuada calidad del agua, evaluar los posibles riesgos para la salud y establecer mejores estrategias de remediación. El recuento de bacterias fecales indicadoras no informa sobre el origen de contaminación fecal. Los virus han surgido como una herramienta prometedora para implementar las regulaciones referentes a la calidad del agua así como para trazar el origen de la contaminación debido a su alta especificidad, su estabilidad en el ambiente y su prevalencia en distintas áreas geográficas.

En el presente estudio, se han desarrollado métodos basados en PCR anidada y cuantitativa para detectar y cuantificar de manera específica parvovirus de pollo/pavo en muestras ambientales.

Los parvovirus de pollo/pavo han sido detectados en el 73% de pools de material fecal recogidos en granjas de pollos de 3 países distintos con un valor medio de concentración de 9.07×10^8 copias genómicas/g. Un 100% de muestras de agua residual sin tratar de matadero de pollos y el 80% de las tratadas fueron positivas para estos virus con títulos medios de 4.63×10^5 copias genómicas/ml. Los parvovirus de pollo/pavo fueron detectados en agua residual urbana de una estación depuradora situada aguas abajo del matadero y no fueron detectados en muestras de agua residual de una planta depuradora situada en una zona libre de efluentes procedentes de la industria avícola. Los análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas revelan poca variabilidad entre ellas y ausencia de correlación con la procedencia geográfica o el tipo de muestra.

Los ensayos diseñados han demostrado ser útiles como herramientas para trazar el origen de la contaminación fecal ocasionada por aves de corral.

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE FANGOS ACTIVADOS: IMPORTANCIA DE LOS MECANISMOS DE REDUCCIÓN DE ENTEROBACTERIAS

Idoia Garaizabal*, Maite Orruño, Zaloa Bravo, Claudia Parada, Inés Arana e Isabel Barcina

Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Vizcaya.

El tratamiento de las aguas residuales mediante fangos activados está orientado a reducir la fracción orgánica asimilable y el número de microorganismos en los efluentes. La reducción de la fracción microbiana se atribuye a eliminación por depredación, concentración en los fangos y vertido en los efluentes.

En este trabajo se ha comprobado la evolución de dos Enterobacterias (*Escherichia coli* y *Serratia marcescens*) a las que se ha insertado el gen *gfp*. Ambas cepas, que expresan la proteína fluorescente GFP, pueden distinguirse en el conjunto de la población del agua residual y no difieren en su comportamiento respecto a las cepas parentales. Las experiencias se realizaron en microcosmos de agua residual y en una planta de tratamiento miniaturizada.

Los resultados obtenidos en planta han mostrado que, una vez alcanzado el equilibrio, *E. coli* permanece mayoritariamente (60-70%) en la fracción sólida tanto en el reactor biológico (flóculos) como en el clarificador secundario (fango). La eliminación atribuible a depredación afecta al 30-40% de las células introducidas mientras que en los efluentes apenas se recoge el 0,12%. Sin embargo, *Serratia* se distribuye de forma equitativa entre las fracciones líquidas y sólidas (12-15% en cada fracción considerada). Las células vertidas en los efluentes suponen el 1,5-2% de la población del influente. Para este microorganismo, podemos considerar la depredación como el principal factor implicado en su eliminación (70% aprox.).

Estos resultados ponen de manifiesto que si bien los mecanismos de eliminación de bacterias introducidas en el sistema son los mismos, la importancia de cada uno de ellos en el proceso global difiere con la bacteria estudiada.

DESINFECCIÓN DE UN EFLUENTE SECUNDARIO MEDIANTE LUZ SOLAR CONCENTRADA, H₂O₂, TiO₂ Y FOTO-FENTON SOLAR

Míriam Agulló-Barceló¹, Inmaculada Polo-López², Joan Jofre¹, Pilar Fernández-Ibáñez²

¹ Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona.

² Plataforma Solar de Almería – CIEMAT. Carretera de Senés Km 4,5 04200 Tabernas, Almería.

El tratamiento de las aguas residuales ha sido un factor clave en cuanto a la prevención de enfermedades de transmisión fecal-oral. Sin embargo, es necesario estudiar nuevos procesos de tratamiento ya que el sistema de tratamiento actual debería incluir algunas mejoras como (1) disminuir el uso de desinfectantes cuyos subproductos tienen efectos adversos para la salud y en el ambiente, y (2) la eficiencia en la eliminación de microcontaminantes (productos farmacéuticos, hormonas). Los procesos de oxidación avanzada (POA) han resultado ser muy eficaces en éste último punto, un ejemplo de ello lo son la radiación UV, el H₂O₂, el TiO₂ o el foto-Fenton (Fe + H₂O₂). Aun así, actualmente no hay datos sobre el efecto de estos POA en aguas reales. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue el estudio de: (a) luz solar concentrada (SUN); (b) SUN + H₂O₂; (c) SUN + TiO₂ y (d) foto-Fenton solar, para la desinfección de un efluente secundario de una planta depuradora. Para ello, se analizaron las concentraciones de distintos indicadores microbianos (*E. coli*, esporas de clostridios reductores del sulfito (SRC), colifagos somáticos (SOMCPH) y fagos FRNA F-específicos (FRNAPH) antes, durante y al final de los tratamientos.

Los resultados indican que la eficiencia en la inactivación de los microorganismos depende del tratamiento así como del propio indicador. *E. coli* fue el indicador inactivado más rápidamente en todos los tratamientos, seguido de los FRNAPH, los SOMCPH y las esporas de SRC. Para la inactivación de *E. coli*, el foto-Fenton solar fue el tratamiento más efectivo seguido de SUN + H₂O₂ (20 ppm), SUN + H₂O₂ (50 ppm), SUN + TiO₂ y finalmente SUN. Los FRNAPH fueron eliminados muy rápidamente con el foto-Fenton solar seguido de SUN + TiO₂ > SUN + H₂O₂ (20 ppm) ≥ SUN + H₂O₂ (50 ppm) > SUN. Los SOMCPH se mostraron resistentes a la acción luz solar (SUN) y a la adición de H₂O₂ pero fueron inactivados más rápidamente en el resto de los tratamientos: Foto-Fenton solar > SUN + TiO₂ >> SUN + H₂O₂ (20 ppm) ≥ SUN ≥ SUN + H₂O₂ (50 ppm). Finalmente, para las esporas de SRC, la eficiencia del tratamiento fue: SUN + H₂O₂ (50 ppm) ≥ SUN + H₂O₂ (20 ppm) > SUN + Foto-Fenton > SUN + TiO₂ ≥ SUN.

Los resultados han permitido estimar que, con unos niveles de 10⁶ *E. coli* /100 mL en un efluente secundario, el foto-Fenton solar sería lo bastante efectivo como para llegar a una concentración de < 100 *E. coli* /100 mL en 7,2 minutos; el tratamiento SUN + H₂O₂ (20 ppm) lo haría en 1,95 h y el tratamiento SUN + TiO₂ lo haría en 4,94 h. Por lo tanto, con estos POA se podría conseguir agua regenerada de una calidad adecuada para el riego de zonas agrícolas en un tiempo razonable.

EVOLUCIÓN DE LA BIOCENOSIS EN UN PROCESO MBR (membrane bioreactor)

Carmen Moreno^{1*}, Elena Soria¹, Pablo Cartagena², Marouane El Kaddouri², Arturo Trapote²

¹ LABAQUA, S.A. c/Dracma 16-18, 03114-Alicante

¹ Instituto Universitario del Agua (Universidad de Alicante).

La tecnología MBR (Membrane Bioreactor) se establece como una variante del proceso convencional de lodos activos en el que se sustituye el sedimentador de separación de biomasa por un sistema de filtración por membranas, presentando esta tecnología numerosas ventajas, tales como una excelente calidad del efluente, baja producción de lodos, ocupación de menor espacio y flexibilidad para futuras expansiones, reducción del tamaño del floculo y menor resistencia a la difusión del sustrato. Sin embargo el principal inconveniente de un MBR es que la capacidad de filtración de las membranas condiciona su rendimiento, que depende del grado de colmatación de las mismas durante el proceso.

Teniendo en cuenta que la permeabilidad de las membranas de estos sistemas MBR está fuertemente influenciada por las características de la biomasa, se ha llevado a cabo un estudio de la biocenosis en una planta piloto a escala con tecnología MBR de fibra hueca y configuración externa sumergida, que trabaja con agua residual doméstica real suministrada por la estación depuradora de aguas residuales de Rincón de León (Alicante). El agua residual es bombeada desde el decantador primario de la EDAR hasta el biorreactor piloto y la línea de tratamiento está formada por tres tanques, uno anóxico, otro aerobio y otro de membranas, estando compuesto este último por 4 módulos de filtración. En el estudio se correlacionó la edad del lodo con el ensuciamiento de las membranas, el tamaño de partícula obtenido y el caudal de aireación. La edad del fango estimada fue de 10 días, con 2 muestreos semanales a lo largo de 30 días, determinándose parámetros como la temperatura, DQO, MLSS, pH y conductividad en todas las muestras así como estudios del tamaño, forma, estructura, cobertura y textura del floculo, identificación y recuento de morfotipos filamentosos, e identificación y recuento de protozoos y metazoos. La carga másica fue de 0.25 d^{-1} , la carga volumétrica de $1.55 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, y la DQO de entrada de 2.000 mg/L , obteniéndose unos rendimientos en la eliminación de DQO y SS superior al 97%, y de N del 80%.

ELIMINACIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS EN AGUA MEDIANTE SISTEMAS FOTO-FENTONDavid Polo^{1*}, Irene García-Fernández², Pilar Fernández-Ibáñez² y Jesús L. Romalde¹

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela, España y ² Plataforma Solar de Almería (CIEMAT), Carretera Senés, Km 4, 04200 Tabernas (Almería), España.

La reacción de fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \bullet\text{OH}$) en agua produce radicales oxihidrilos ($\bullet\text{OH}$) y peroxi ($\text{HO}^{\bullet}_2/\text{O}^{\bullet}_2$) ($\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{OH}^{\bullet}_2 + \text{H}^+$). Estos radicales, especialmente los $\bullet\text{OH}$ son capaces de atacar casi cualquier compuesto orgánico. Los sistemas foto-fenton ($\text{Fe}(\text{OH})^{2+} + h\nu \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \bullet\text{OH} + \text{H}^+$), añaden a estas reacciones el efecto de la irradiación solar, que resulta en la formación de Fe^{2+} por foto-reducción del complejo agua- Fe^{3+} y la producción de radicales $\bullet\text{OH}$ adicionales. Estudios recientes han demostrado la capacidad de los procesos foto-fenton para acelerar la foto-inactivación solar de patógenos como *E. coli* y degradar materia orgánica. El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia de los sistemas solares foto-fenton como estrategia para la eliminación de los virus de la hepatitis A (HAV) y norovirus murino (MNV-1) en agua. Los ensayos se llevaron a cabo mediante la exposición solar de volúmenes de agua destilada (200 ml) contenida en botellas de cristal con tres concentraciones diferentes de Fe^{+2} y H_2O_2 : (a) 2,5 ppm Fe^{+2} + 5 ppm H_2O_2 ; (b) 5 ppm Fe^{+2} + 10 ppm H_2O_2 ; (c) 10 ppm Fe^{+2} + 20 ppm H_2O_2 , previamente contaminados con HAV y MNV-1 (10^5 partículas víricas/ml). La toma de muestras se llevo a cabo cada 60 minutos (por triplicado) durante un tiempo total de exposición solar de 6 horas. El RNA viral fue extraído mediante un kit comercial y cuantificado mediante real time RT-PCR (rRT-PCR) con sondas Taqman. Los resultados obtenidos muestran un aumento en la eficacia de eliminación viral respecto a la desinfección solar convencional, llegando a tasas de eliminación del 90 % respecto a la carga viral inicial. HAV mostró una mayor resistencia que MNV-1 a las condiciones ensayadas.

EFFECTO DE LA LUZ SOLAR Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ESTABILIDAD DE LOS ADENOVIRUS HUMANOS COMO CONTAMINANTES EN EL MEDIO ACUÁTICO

Carratala A*, Rusiñol M, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Girones R.

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

La estabilidad de los virus en condiciones ambientales es un parámetro esencial para su transmisión a través del agua. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la temperatura, la luz solar y la presencia de agua residual en la estabilidad de los adenovirus humanos en distintos ambientes acuáticos. Estos virus, además de patógenos, han sido anteriormente propuestos como indicadores de contaminación fecal. El trabajo se desarrolló en distintos microcosmos (PBS, agua mineral, agua residual, agua residual diluida 1/1000 en agua mineral y agua de mar) analizando la infectividad de HAdV a lo largo de 24h a distintas temperaturas de interés (7, 20 y 30°C) en condiciones de oscuridad y bajo un simulador solar. Los resultados obtenidos indican que la luz solar es un factor muy importante para la estabilidad de HAdV en PBS y en agua mineral en todas las temperaturas estudiadas. Por el contrario, a 37°C en agua residual, agua residual diluida y agua de mar, fue la temperatura el factor más relevante en la inactivación de HAdV. Con los datos obtenidos hemos calculado las dosis de UV o radiación total necesarias para la inactivación de HAdV desde 1 a 4 log. Los datos producidos en este estudio son necesarios para la modelización, en desarrollo en el proyecto VIROCLIME, de la diseminación de virus en agua considerando los posibles efe

DESARROLLO DE UN SISTEMA EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Mx DE LENGUADO SENEGALÉS

Daniel Álvarez-Torres^{1,2*}, María del Carmen Alonso¹, Esther García-Rosado¹, Juan José Borrego¹ y Julia Béjar²

¹Depto. Microbiología y ²Depto. Biología celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071, Málaga.

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) es una especie de gran importancia en la acuicultura española. Sin embargo, como consecuencia de su cultivo intensivo, han aparecido diversas enfermedades de origen vírico que pueden causar graves pérdidas en su producción. Para afrontar este problema resulta primordial conocer en detalle los mecanismos de defensa antivíricos de esta especie, lo que permitiría diseñar estrategias de prevención y/o tratamiento.

La proteína Mx es un elemento clave del sistema inmune innato mediado por interferón tipo I (IFN I) de vertebrados, que presenta actividad antiviral. Nuestro grupo de investigación ha clonado el gen que codifica esta proteína en lenguado (SsMx) y ha demostrado su actividad antiviral frente a diversos virus patógenos de especies piscícolas. La siguiente etapa en la caracterización funcional de esta proteína es el estudio de sus mecanismos de regulación transcripcional. Por ello, el objetivo del presente trabajo es desarrollar un sistema experimental *in vitro* que permita determinar de forma cuantitativa la inducción de la expresión de SsMx en respuesta a distintas condiciones.

En una primera etapa se ha clonado, secuenciado y caracterizado el promotor de la región SsMx. Dicho promotor contiene dos secuencias de respuesta a IFN I y varios motivos adicionales que, probablemente, modulen la expresión del gen SsMx frente a diversos estímulos. Este promotor se ha clonado en el vector de expresión de la luciferasa "pGL-4puro", y se ha transfectado en células RTG-2. Posteriormente se han seleccionado las células que mantienen el plásmido de forma estable, obteniéndose, así, un sistema experimental *in vitro*, que hará posible el estudio de la inducción de la expresión de SsMx en respuesta a distintos estímulos, entre los que destacan las infecciones víricas.

LA TOXINA MARTX DE *Vibrio vulnificus* pv. *piscis* ES UN FACTOR DE VIRULENCIA Y SUPERVIVENCIA

Carmen Amaro^{1*}, David Pajuelo¹, Agnès Callol¹, Rubén Casatejada¹, Celia Murciano¹ y José Manuel Leiro²

¹ Dpto. de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, 46100 Valencia, y ² Dpto. de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela.

V. vulnificus pv. *piscis* (anteriormente biotipo 2) es un patógeno zoonótico cuya capacidad para infectar peces reside, en parte, en un plásmido de virulencia de 69Kb. El plásmido contiene un gen, el gen *rtxA1*, que está duplicado en el cromosoma II y que codifica para una toxina de la familia de las MARTX (Multifunctional, Autoprocessing Repeats-in-Toxin). Esta toxina presenta una organización en dominios funcionales que es única dentro de la especie. Un gen idéntico está presente en todas las cepas de la patovariedad, independientemente de su origen clonal. El objetivo de este trabajo ha sido averiguar si el gen *rtxA1* podría tener un papel en la virulencia y en la supervivencia de esta bacteria en el ambiente de las piscifactorías. Para ello hemos obtenido mutantes simples y dobles y los hemos utilizado en una serie de ensayos con animales (peces y ratones), líneas celulares (epiteliocitos y fagocitos de peces y ratones) y amebas, aisladas de las branquias de peces cultivados. Los resultados globales revelan que la toxina está involucrada en virulencia tanto para peces como para mamíferos así como en destrucción de un amplio rango de células eucarióticas desde células de mamífero hasta células de peces y amebas. El amplio rango de actuación de esta toxina y, en especial, su papel protector frente a la predación por amebas podrían explicar el éxito de esta patovariedad en el ambiente de las piscifactorías.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos AGL2008-03977, AGL 2011-29639 (cofinanciado con fondos FEDER) y por el Programa Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00006

BUSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA VIRULENCIA DE *Edwardsiella tarda* PARA PECES

Nuria Castro*, Carlos R. Osorio, Alicia E. Toranzo y Beatriz Magariños

Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología/CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 – Santiago de Compostela

Edwardsiella tarda es un patógeno bacteriano perteneciente a la familia de las enterobacterias, capaz de causar infecciones en un amplio rango de organismos: aves, reptiles, anfibios, peces y mamíferos (incluido el hombre). La edwardsielosis en peces es una grave enfermedad que produce importantes pérdidas económicas en la industria acuícola afectando a especies de elevado valor comercial como el pez gato, anguila, platija, tilapia, lubina y rodaballo, entre otras. Estudios previos han demostrado el elevado potencial patógeno de esta especie, pudiendo incluso representar un potencial riesgo de salud pública. Sin embargo, y hasta la actualidad, es escasa la información disponible sobre la evolución del proceso infectivo en peces.

Diferentes autores han vinculado distintos factores como la capacidad de invasión y adhesión a las células epiteliales, la resistencia a la actividad bactericida del suero o la producción de sideróforos, condroitinasas, hemolisinas o colagenasas a la virulencia de la especie. Sin embargo, el papel exacto que cada uno de ellos jugaría en la patogénesis de la enfermedad permanece aún por determinar.

Teniendo en cuenta diferentes factores de virulencia conocidos de la patogénesis bacteriana, en este trabajo nos hemos propuesto la búsqueda e identificación dentro de una colección de cepas de *E. tarda* procedentes de diferentes orígenes, de determinados genes candidatos que pudieran estar implicados en la virulencia de la especie, comprobando la correlación genotipo-virulencia mediante la realización de ensayos “in vivo”. Los resultados obtenidos vierten una aproximación a la patogenicidad de la especie para peces y demuestran que determinados factores como la producción de enzimas de degradación de tejidos podrían jugar un papel importante en su virulencia.

ADHERENCIA E INVASIÓN DE *Lactococcus garvieae* EN CÉLULAS NO FAGOCÍTICAS DE TRUCHA

Mónica Aguado-Urda¹, Alicia Gibello Prieto¹, Judit Vega², Félix Acosta², Daniel Padilla² y M^a del Mar Blanco^{1*}

¹ Dpto. de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, 28040 Madrid, y ² Instituto de Sanidad Animal IUSA, ULPGC 35416 Arucas, Las Palmas.

Lactococcus garvieae es el agente causal de la lactococosis, una de las enfermedades infecciosas más importantes en el sector piscícola, que afecta principalmente a la industria de la trucha arcoíris. *L. garvieae* también causa infecciones en otras especies acuáticas de vida libre, mamíferos terrestres y en el hombre, siendo considerado un patógeno de posible carácter zoonótico.

La adherencia de las bacterias a las células del hospedador constituye a menudo un paso esencial en el desarrollo de la infección, ya que permite que las bacterias se unan a receptores en los diferentes tejidos del hospedador. Los mecanismos de adhesión de *L. garvieae* aún no han sido estudiados en profundidad, aunque se han identificado varios genes que codifican adhesinas en los genomas de diferentes cepas de *L. garvieae* secuenciadas.

El presente trabajo se llevó a cabo mediante un estudio de inmunofluorescencia indirecta y observación por microscopía confocal, y muestra la capacidad de adhesión e internalización de dos cepas patógenas de *L. garvieae* de distinto origen (trucha y humano) en células de trucha de estirpe no fagocítica (RTG-2). Los resultados que se presentan podrían contribuir al mejor conocimiento de las fases iniciales de la infección por *L. garvieae* en los tejidos del hospedador.

CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR BASADO EN EL OPERÓN LUX PARA EL ANÁLISIS DEL PROCESO INFECCIOSO DE LACTOCOCCUSGARVIEAE

Desirée Cascales, Pilar Reimundo y Jose A. Guijarro.

Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina. IUBA. Universidad de Oviedo. C/Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo.

La lactococosis es una infección causada por la bacteria *L. garvieae*, cuya incidencia en la producción intensiva de salmónidos causa importantes pérdidas económicas. A pesar de esto, los conocimientos existentes acerca de este microorganismo y sus mecanismos de patogenicidad son aún limitados. En este ámbito, el estudio de las interacciones patógeno-hospedador puede, sin duda, contribuir a determinar aspectos relevantes del proceso infeccioso. Para ello, se ha construido el vector denominado pGKV210bla-lux, basado en el operón *lux ABCDE* de *Photorhabdus luminescens*, con el fin de ser utilizado en *L. garvieae* como emisor de bioluminiscencia. Con ello, será posible seguir el proceso infeccioso en trucha arcoíris a través la detección de la luz en los tejidos del pez, mediante el sistema Ivis lumina. De igual modo el vector puede ser utilizado para la cuantificación de la actividad promotora tanto *in vivo* como *in vitro*, mediante la cuantificación de la bioluminiscencia emitida.

RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE TRUCHAS SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A *Flavobacterium psychrophilum*

M^a del Mar Blanco^{1*}, Christelle Langevin², Samuel A.M. Martin³, Luc Jouneau², Jean-François Bernardet², Armel Houel², Aurélie Lunazzi², Eric Duchaud², Christian Michel², Edwige Quillet⁴ and Pierre Boudinot²

¹ Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, 28040 Madrid, ² INRA, Virologie et Immunologie Moléculaires, 78350 Jouy-en-Josas, Francia, ³ Institute of Biological and Environmental Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, AB24 2TZ, UK, ⁴ INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78350 Jouy-en-Josas, Francia.

Flavobacterium psychrophilum es un patógeno bacteriano de distribución mundial, que afecta a diferentes especies piscícolas. En Europa, la principal patología causada por *F. psychrophilum* es el llamado “síndrome del alevín”, que aparece en alevines y juveniles de trucha y en presencia de otros factores coadyuvantes, como la temperatura del agua.

El objetivo de este estudio ha sido aportar conocimientos sobre las bases genéticas de la resistencia natural a *F. psychrophilum*. Para ello se ha comparado la respuesta transcripcional a esta bacteria a partir de muestras de riñón anterior de clones homocigotos de trucha de dos estirpes: sensibles y resistentes a la enfermedad. El estudio se ha llevado a cabo mediante el empleo de un microarray de trucha, y el análisis por PCR cuantitativa de algunos de los genes relevantes de la respuesta inmunitaria. Los resultados muestran que la infección por *F. psychrophilum* indujo evidentes modificaciones en el transcriptoma del riñón anterior de las truchas de ambas estirpes (sensibles y resistentes), con respecto a los grupos control sin inocular. Sin embargo, únicamente una pequeña fracción de los genes expresados diferencialmente mostraron respuestas específicas de cada estirpe. Estos resultados proporcionan información de interés para la identificación de las bases genéticas implicadas en la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad.

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO POR MICROARRAY DE RESPUESTA A LA PROTEÍNA VP2 DEL IPNV EN TRUCHA ARCO-IRIS Y DE EXPRESIÓN DE GENES DE INMUNIDAD

Natalia Ballesteros¹, Sara I Perez-Prieto¹, Julio Coll², Sylvia Rodríguez Saint-Jean¹.

¹ Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Dpto. de Microbiología Molecular. C/Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. ² Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Dpto de Biotecnología. Crta de La Coruña Km 7.5 28040 Madrid.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es un virus RNA que codifica 5 proteínas; de ellas la VP2 presenta epítomos neutralizantes. Se ha estudiado la expresión de genes inducidos por una vacuna DNA-VP2 en trucha arco-iris con un microarray de 60mer y 15K enriquecido en genes inmunes. Tras el análisis global se seleccionaron 13 genes en distintos órganos, comparando tanto la expresión inducida por el virus como por la VP2 mediante RT-qPCR. Se confirma el protagonismo de la VP2 en la inducción de la respuesta del hospedador frente al virus o vacuna, tanto en órganos internos y de mucosa, corroborando que la protección lograda de la vacuna (82%) procede de una respuesta inmune innata y específica similar al patrón de la infección.

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA COEXISTENCIA DE LOS GENOTIPOS SJNNV Y RGNNV DE BETANODAVIRUS

Benjamín López-Jimena¹, María del Carmen Alonso², Carlos Carballo^{2*}, Carlos Infante¹, Dolores Castro², Juan José Borrego² y Esther García-Rosado²

¹ IFAPA Centro *El Toruño*, Camino de Tiro de Pichón, s/n, 11500, El Puerto de Santa María, Cádiz, y ² Depto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071, Málaga

El Virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV), incluido en el género *Betanodavirus* (Familia *Nodaviridae*), es el agente etiológico de la necrosis nerviosa viral (NNV). Este virus se ha clasificado en 4 genotipos, de los cuales sólo los genotipos "Striped Jack Nervous Necrosis Virus" (SJNNV) y "Red Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus" (RGNNV) se han detectado en la Península Ibérica hasta la fecha, habiéndose descrito un alto porcentaje de peces salvajes (corvinas, *Argyrosomus regius*) que portan ambos genotipos simultáneamente. El efecto de la coexistencia de estos dos genotipos sobre la multiplicación de cada uno de ellos se ha evaluado *in vitro* en la línea celular E-11 mediante PCR a tiempo real y titulación vírica a distintos tiempos post-inoculación (p.i.). Se han considerado los siguientes grupos experimentales: (i) coinfección; (ii) superinfección con RGNNV, y (iii) superinfección con SJNNV, además de los grupos control, en los que se realiza la inoculación única de los genotipos RGNNV o SJNNV. La superinfección se realizó 24 h tras la inoculación del primer virus. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de mínimas diferencias significativas (LSD) de Fisher ($p < 0,01$). Se ha observado que la coexistencia de los genotipos SJNNV-RGNNV afecta negativamente a la replicación del genotipo SJNNV, mientras que la replicación del genotipo RGNNV se ve favorecida con la presencia del otro genotipo. Sin embargo, estos resultados no se reflejaron en términos de partículas víricas infectivas.

ARTEMIA SP. COMO RESERVORIO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE LINFOCISTIS (LCDV)

Estefanía J. Valverde^{1*}, Irene Cano², Esther García-Rosado¹, María Carmen Alonso¹, Juan José Borrego¹ y Dolores Castro¹.

¹Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, UMA, 29071 Málaga, y ²CEFAS Weymouth, Dorset, UK

La artemia constituye el alimento vivo para larvas de peces marinos cultivados más ampliamente extendido, por lo que su potencial contaminación con patógenos microbianos supone un riesgo muy grave para la acuicultura. Nuestro grupo ha demostrado previamente la existencia de partículas víricas infectivas del virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV) mediante la aparición de efectos citopáticos en cultivos celulares. El objetivo de este trabajo es dilucidar si la artemia, además de como reservorio, actúa como hospedador del virus. Para ello, se inocularon nauplios de artemias por baño con distintos aislados de LCDV y se procedió a recoger muestras a distintos tiempos post-inoculación. A partir de cada una de las muestras, se realizó la extracción de ADN y ARN total para su posterior análisis. Mediante PCR a tiempo real absoluta, se cuantificó el número de copias del virus. Además, la expresión del gen de la proteína principal de la cápside (MCP) se analizó en paralelo mediante RT-PCR relativa a tiempo real. Los resultados obtenidos indican que la carga viral se incrementó durante el período de tiempo evaluado. Además, se detectó RNA mensajero de la MCP vírica en todas las muestras analizadas, observándose su aumento durante el curso de la infección. Estos resultados demuestran que el LCDV infecta a los nauplios de artemia, al menos en condiciones experimentales, multiplicándose activamente en los tejidos del animal, lo que constituiría el primer caso descrito de un virus de peces que infecta también invertebrados.

SUSCEPTIBILIDAD DE JUVENILES DE LUBINA (*Dicentrarchus labrax*) A DIFERENTES AISLADOS DEL VIRUS DE LA NECROSIS NERVIOSA VIRAL (VNNV)

Benjamín López-Jimena^{1*}, Esther García-Rosado², Sandra Souto-Pereira³, Carlos Infante¹, Juan José Borrego² y María del Carmen Alonso²

¹ IFAPA Centro *El Toruño*, Camino de Tiro de Pichón, s/n, 11500, El Puerto de Santa María, Cádiz, ² Depto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071, Málaga y ³Unidad de Ictiopatología-Patología Viral, Depto. de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela

La necrosis nerviosa viral (NNV) es una enfermedad neurológica causada por el betanodavirus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV), cuyo genoma está formado por dos segmentos de ARN monocatenario de polaridad positiva (ARN1 y ARN2). En este estudio se ha evaluado la susceptibilidad de juveniles de lubina (5 g) a la infección (inoculación intramuscular) por los genotipos detectados en la Península Ibérica, RGNNV y SJNNV, y por un aislado recombinante procedente de lenguado senegalés (RGNNV ARN1/SJNNV ARN2). Con este fin se han realizado estudios de mortalidad acumulada, así como de cuantificación de genoma viral (PCR absoluta a tiempo real) y de partículas infectivas (titulación en la línea celular E-11) en el cerebro de peces muertos y supervivientes (30 días post-inoculación, p.i.). Además, se ha determinado la producción de anticuerpos anti-VNNV en el suero de los animales supervivientes mediante ELISA indirecto. Los resultados muestran la susceptibilidad de la lubina a todos los aislados víricos ensayados, aunque sólo se observó sintomatología y mortalidad en los animales inoculados con RGNNV (47% de mortalidad) y el recombinante (33%). Sin embargo, también se detectó replicación de genoma vírico y producción de partículas infectivas en el cerebro de los peces inoculados con el genotipo SJNNV. La susceptibilidad de la lubina a estos aislados se confirmó mediante infección por baño (animales de 2 g).

DETECCIÓN DE VIRUS PATOGENOS PISCÍCOLAS EN BANCOS PESQUEROS NATURALES DEL SUR DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Patricia Moreno^{1*}, Jorge C. Baro², Carlos P. Dopazo³, Juan J. Borrego¹

¹ Depto. De Microbiología, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, ² I.E.O Fuengirola, ³ Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela

En la zona mediterránea existe escasa información relacionada con la transferencia de microorganismos patógenos, en especial virus, entre peces salvajes y cultivados. De hecho, así como se dispone de referencias sobre los virus que afectan a la acuicultura en esta área, hay una importante laguna de conocimiento sobre la presencia de virus entre las poblaciones salvajes, algo que, sin embargo, lleva tiempo estudiándose en otras áreas costeras peninsulares. Por ello, hemos llevado a cabo un estudio de la prevalencia de tres de las principales virosis que afectan a la acuicultura marina mediterránea, como son el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y el virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV) en los bancos de peces naturales más representativos del golfo de Cádiz.

Se han analizado individualmente 220 peces (todos ellos asintomáticos) pertenecientes a 29 especies diferentes, en 3 campañas oceanográficas realizadas en colaboración con el I.E.O durante los años 2010 y 2011. Para la detección se han empleado RT-PCR, nested RT-PCR y dot-blot, con cebadores específicos de cada virus, así como la técnica de aislamiento en cultivo celular. El primer resultado destacable es la no detección de virus en cultivo celular en ninguna de las muestras procesadas. Sin embargo, sí se detectó virus mediante técnicas de PCR, obteniéndose unos valores de detección del 18,75% para IPNV, 44,5% para VHSV y 4,68% para betanodavirus. Estos resultados demuestran que, aunque en carga viral muy baja, estos virus sí están presentes en estas especies salvajes, lo cual, de por sí, debe ser considerado en futuros programas de vigilancia, como potenciales agentes transmisores de las virosis en los esteros e instalaciones acuícolas de la zona.

POLIPLOIDÍA EN BIRNAVIRUS ACUÁTICOS: UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA MODULAR LA VIRULENCIA

María Lago^{1*}, Isabel Bandín¹, José F. Rodríguez² y Carlos P. Dopazo¹

¹ Unidad de Ictiopatología-Instituto de Acuicultura. Dpto. Microbiología y Parasitología, USC, 15706, Santiago de Compostela.

² Dpto. Biología Molecular y Celular, CNB/CSIC, 28049, Madrid

Los birnavirus acuáticos, incluyendo el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), se encuentran dentro de los virus con mayor impacto económico en acuicultura. Para el planteamiento de medidas de prevención, debemos conocer los mecanismos de regulación de virulencia del virus. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han centrado en la relación entre secuencia genómica y virulencia, pero sabemos que hay otros factores que pueden estar implicados, como la recombinación genética.

En base a los resultados de otros autores, que demostraron la existencia de poliploidía en IBDV, otro virus de la familia *Birnaviridae*, decidimos trabajar en la búsqueda de este fenómeno en aquabirnavirus y así comprobar si es una característica de la familia.

Para ello, se trabajó con una cepa tipo WB aislada de bacalao del Flemish Cap (Terranova). El virus se produjo masivamente en células BF2 y se purificó en un gradiente de CsCl, obteniéndose hasta 6 poblaciones virales que resultaron tener igual composición proteica pero distinto tamaño y densidad. El análisis genómico de dichas fracciones reveló que la diferencia de diámetro y densidades se debía al empaquetamiento de un número creciente de segmentos genómicos, lo que confirma la existencia de poliploidía también en este género.

Por último, la evaluación de la capacidad replicativa del virus mediante el método de titulación de virus crudo permitió observar que, al menos *in vitro*, el empaquetamiento de un mayor número de segmentos genómicos conlleva un incremento en la virulencia, siendo las fracciones con mayor número de copias las que alcanzan mayores títulos. Esto indica que este fenómeno puede ser una estrategia para modular la virulencia de estos virus.

ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE *Flavobacterium psychrophilum* EN SALMONIDOS CULTIVADOS EN CHILE

Ruben Avendaño-Herrera¹, Eric Duchaud², Pierre Nicolas², Rute Irgang¹

¹ Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, y ² INRA, Virologie et Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas, France.

Flavobacterium psychrophilum, una bacteria Gram-negativa, de forma filamentosa y movimiento deslizante que siempre está presente en cursos de agua dulce, es uno de los patógenos más devastadores para la industria salmonicultora chilena, no sólo por las mortalidades de peces que provoca, sino también por la morbilidad y los altos costos asociados a su tratamiento terapéutico, así como las consecuencia ambiental de los mismos. Además, no existen vacunas comerciales disponibles contra el patógeno. En Chile, el primer reporte del patógeno se remonta a mortalidades ocurridas en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a comienzos de la década del 90', pero actualmente el patógeno ha sido detectado en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y salmón del Pacífico (*O. kisutch*). La principal causa de la expansión en la distribución de *F. psychrophilum*, podría ser la estrategia aplicada en la salmonicultura chilena de mover los peces de una región a otra para disminuir los costos productivos. Estudios previos empleando distintos métodos de tipificación como RAPD, REP-PCR y más recientemente electroforesis de campo pulsado sugieren que los brotes en las pisciculturas chilenas son dominadas por un clúster de *F. psychrophilum*. Para comprender mejor la estructura de la población de esta bacteria, hemos tipificado por secuencias de multilocus (MLST) 78 aislados chilenos basados en 7 genes esenciales. Un total de 14 diferentes secuencias de tipificación (STs) fueron identificadas, siendo seis STs representados por un único aislado. Aunque seis STs de los aislados chilenos han sido previamente identificados en Europa (Appl. Environ. Microbiol. 74:3702-3709), la mayoría de los aislados chilenos (n = 56) se agruparon en distinto STs. Además, 26 aislados chilenos (33%) fueron compilados en un único ST. Al analizar los resultados de STs considerando el huésped de aislamiento, sólo dos de ellos agruparon mayoritariamente aislados obtenidos a partir de trucha arcoíris y salmón del Atlántico. El presente estudio demuestra que la técnica de MLST permite una buena resolución, reconociendo la existencia de una mayor diversidad genética en la población de *F. psychrophilum* en Chile.

Financiamiento: FONDECYT 1110219 (CONICYT-Chile)

EXPRESIÓN *IN VITRO* DE GENES DE QUORUM SENSING EN *AEROMONAS SALMONICIDA*Leticia Rivera¹, Teresa P. Nieto¹, Rosa Farto^{1*}

¹Area de Microbiología, Depto de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Lagoas-Marcosende, 36310, Vigo

Depto de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Lagoas-Marcosende, 36310, Vigo

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* (ASS) es un patógeno que provoca pérdidas económicas importantes en la acuicultura. Aunque típicamente infecta a salmonídeos, se ha comprobado que también infecta, entre otros, a rodaballo, una especie de gran importancia en la producción acuícola española. Todos los estudios coinciden al afirmar que las causas de patogenicidad de ASS dependen de factores de virulencia diversos y a pesar de ser una especie patógena reconocida desde hace muchos años, aún no se ha logrado entender qué mecanismos regulan su virulencia y su potencial patógeno sobre distintos hospedadores.

El Quorum Sensing (QS) regula la expresión de factores de virulencia de numerosas bacterias patógenas, y hasta ahora se desconoce si podría favorecer la patogenicidad de ASS. Dicha especie, entre otros, presenta el sistema de QS *AsaR*, homólogo al de *Vibrio fischeri*, para el cual tan sólo se ha propuesto un papel en la regulación de la síntesis de serín proteasas. Creemos que es esencial entender su regulación y posteriormente determinar si regula otros factores, así como su interacción con otros sistemas de QS.

La interdependencia de los genes *asal* y *asaR* ha sido demostrada en numerosas ocasiones para varias especies. Nuestros resultados fenotípicos con la cepa salvaje, ACRp 43.1, virulenta para rodaballo, y sus dos cepas mutantes, una para el gen *asal* y otra para el gen *asaR*, también sugieren la existencia de esta interdependencia en ASS. Mediante un ensayo en placa empleando como biosensor *Chromobacterium violaceum* observamos que, mientras la cepa salvaje inducía la producción de violaceína esta capacidad había disminuido para su cepa mutante *mAsaR* y se había anulado para su cepa mutante *mAsal*. El objetivo que nos planteamos fue demostrar la existencia de esta asociación entre ambos genes mediante la cuantificación de su expresión en la cepa salvaje y sus dos cepas mutantes durante su crecimiento *in vitro* aplicando PCR a tiempo real (RT-qPCR).

En la aplicación de la RT-qPCR se ha seleccionado el marcador no específico SYBR Green y se ha realizado una cuantificación relativa (método de delta-delta Ct) empleando el gen de referencia *fabD* (proteína implicada en la biosíntesis de ácidos grasos). Este último es necesario para corregir la variación no específica debida a posibles diferencias en la cantidad y calidad del ARN empleado, que pueden afectar a las eficiencias tanto de la transcripción reversa como de la PCR. Dada la inespecificidad del marcador (detecta todo el ADN de doble cadena producido durante la reacción de amplificación) se diseñaron cebadores altamente específicos para los genes *asal* y *asaR*.

Las cepas se cultivaron en caldo de tripticasa soja (TSB) a 18°C y se extrajo el ARN a las 0h, 16h, 24h, 48h y 72h de dichos cultivos. Para ello, se empleó el reactivo TRIzol y se aplicó el protocolo de la casa comercial, determinándose su pureza, concentración e integridad. Posteriormente se realizó la transcripción reversa y la cuantificación mediante RT-qPCR.

Los resultados han mostrado que la cepa salvaje expresa ambos genes durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento. La cepa mutante *AsaR* expresa en menor proporción el gen *asal* que la salvaje. Al no anularse completamente dicha expresión esto confirma que en la regulación de la expresión de dicho gen está implicado otro sistema. Por otro lado la cepa mutante *Asal* expresa en mayor proporción el gen *asaR* que la cepa salvaje y esto sugeriría que la expresión del gen *asal* podría ejercer una regulación negativa sobre la expresión del *asaR*. Por tanto se confirma la interdependencia de ambos genes.

ANÁLISIS FENOTÍPICO DE UN MUTANTE EN UN gen INVOLUCRADO EN LA BIOSÍNTESIS Y/O TRANSPORTE DE POLISACÁRIDOS EN *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM*

Esther Gómez¹, David Pérez Pascual², Beatriz Álvarez¹, José Agustín Guijarro Atienza¹.

¹ Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina. IUBA. Universidad de Oviedo. C/Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo.

² INRA-Institut Micalis, Equipe Peptides et Communication Bactérienne. Domaine de Vilvert-batiment 526, 78352, Jouy-en-Josas, cedex France.

Flavobacterium psychrophilum es el agente causal de la “enfermedad del agua fría”, que afecta principalmente a salmónidos, y causa grandes pérdidas económicas en acuicultura en todo el mundo. A pesar de su relevancia, los factores de patogenicidad de esta bacteria están poco estudiados debido, probablemente, a las dificultades de cultivo y manipulación genética que presenta.

En este trabajo se ha construido una genoteca de mutantes, utilizando el transposon *Tn4351*, con el fin de identificar genes relacionados con la virulencia de la bacteria y analizar su función. Uno de estos genes mutados, cuyo locus es denominado TH2043, codifica una proteína hipotética transmembrana involucrada en la biosíntesis y/o el transporte de polisacáridos al exterior celular. Su análisis fenotípico mostró que presenta, en relación a la cepa parental, una menor motilidad y producción de compuestos emulsionantes así como una mayor actividad proteolítica extracelular, hidrofobicidad y capacidad de floculación. Destacar, asimismo, la menor virulencia definida en experimentos de DL₅₀. Estas alteraciones fenotípicas desaparecieron al complementar la cepa mutante con dicho gen.

Con el fin de profundizar en el estudio de este mutante y determinar las alteraciones que pueda presentar a nivel estructural, se están llevando a cabo análisis cualitativos y cuantitativos de los exopolisacáridos liberados al exterior celular.

IMPLICACIÓN DEL GEN *ACRA* EN LA RESISTENCIA A COMPUESTOS TÓXICOS EN *YERSINIA RUCKERI*

Jessica Méndez, Pilar Reimundo, Roberto Navais, Jose A. Guijarro
Departamento Biología Funcional, Área de Microbiología. Universidad de Oviedo

La capacidad para captar el colorante rojo congo resulta útil para distinguir entre cepas virulentas y no virulentas de numerosas especies patógenas como *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* y *Shigella flexneri*. La construcción de una genoteca de mutantes con el transposón mini-Tn5 en *Y. ruckeri*, agente etiológico de la enfermedad entérica de la boca roja, permitió identificar un total de siete genes cuya inactivación produce un aumento en la captación de este colorante en relación al fenotipo parental. Los genes seleccionados codifican proteínas implicadas en diversas funciones celulares como la síntesis de ácidos nucleicos, la división celular o la regulación de la expresión génica. Además se mutó el gen *acrA* que codifica una proteína implicada en la expulsión de sustancias tóxicas. La inactivación de este gen confiere a *Y. ruckeri* una mayor sensibilidad a determinados compuestos entre los que se incluyen diferentes antibióticos y detergentes. No obstante, los experimentos de DL₅₀ llevados a cabo por vía intraperitoneal con alevines de trucha arcoíris, indicaron que la proteína AcrA no está implicada en la virulencia de la bacteria.

LA AUSENCIA EN *YERSINIA RUCKERI* DE LA ALQUIL SULFATASA *Yras* ORIGINA UN FENOTIPO SEMEJANTE AL DEFINIDO EN CEPAS CARENTES DEL FACTOR SENSIBLE AL CALOR (HSF)

Roberto Navais, Jessica Méndez, José A. Guijarro

Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina. IUBA. Universidad de Oviedo. C/Julián Clavería nº6, 33006, Oviedo.

Yersinia ruckeri es el agente etiológico de la “enfermedad entérica de la boca roja”, una patología que causa pérdidas económicas importantes en la acuicultura de salmónidos en todo el mundo. A pesar de la existencia de vacunas comerciales eficaces para la prevención de la enfermedad, aún existen zonas endémicas en las que surgen sistemáticamente brotes. Por lo tanto, es importante continuar con el estudio de la bacteria, que además tiene también un interés biológico, puesto que esta especie es la más alejada filogenéticamente de las especies del género patógenas para el hombre. En *Y. ruckeri* se han definido distintos serotipos, siendo el de tipo I el más abundante y virulento. Esta virulencia está estrechamente vinculada con la presencia del denominado factor sensible al calor (HSF), que determina un fenotipo definido por la presencia de un depósito cremoso alrededor de la colonia, en medios de cultivo con dodecil sulfato de sodio (SDS). Con el fin de profundizar en el conocimiento de la relación entre este factor y los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria, se construyó una genoteca de mutantes por transposición, en la que se seleccionaron aquéllos que presentaban el fenotipo HSF (-), es decir, ausencia del depósito cremoso alrededor de la colonia. El análisis de estos mutantes ha revelado que todos ellos tienen interrumpido un gen denominado *yras* que codifica una alquil sulfatasa que hidroliza el SDS.

PAPEL DE LOS SISTEMAS DE CAPTACIÓN DE HIERRO EN LA VIRULENCIA Y LA SUPERVIVENCIA DE *Vibrio vulnificus* pv. *piscis*David Pajuelo^{1*}, Chung-Te Lee², Eva Sanjuán¹, Lien-I Hor² y Carmen Amaro¹¹Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, UV, 46100 Valencia² Institute of Basic Medical Sciences and Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, National Cheng-Kung University, 701 Tainan (Taiwan)

Vibrio vulnificus pv. *piscis* es una bacteria zoonótica que causa una vibriosis en la anguila conocida como vibriosis de aguas cálidas. La virulencia de esta bacteria está correlacionada con la cantidad de hierro libre en los fluidos del hospedador. El objetivo de este trabajo ha sido averiguar el papel de dos genes involucrados en la captación de hierro, en forma de grupo hemo o quelado con transferrina, en la virulencia para humanos y peces así como en la supervivencia de la bacteria en el ambiente acuático. Para ello, hemos obtenido mutantes simples y dobles en los genes que codifican para el receptor de hemo (*hupA*) y el receptor del sideróforo vulnibactina (*vuuA*) (sideróforo que secuestra el hierro a la transferrina férrica), ambos localizados en el cromosoma II. La cepa parental y los mutantes se han utilizado en toda una serie de ensayos *in vivo* e *in vitro*, incluyendo ensayos de virulencia para ratón y anguila, ensayos de colonización de anguilas, ensayos con líneas celulares y eritrocitos de mamíferos y peces y ensayos de formación de biofilm sobre distintos sustratos. Los resultados globales demuestran que aunque ambos genes son genes de virulencia no específicos de hospedador, sólo son absolutamente imprescindibles en el caso de la colonización de los peces a través del agua. La comparación de las secuencias de ambas proteínas de cepas de los distintos clones de la patovariedad y de la especie demuestran que ambas proteínas están muy conservadas, en especial en las zonas que conforman los dominios funcionales, lo que sugiere que son importantes en la supervivencia de la bacteria como especie en su ambiente natural.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos AGL2008-03977, AGL 2011-29639 (cofinanciado con fondos FEDER) y por el Programa Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00006

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PROTEÓMICA Y SECUENCIACIÓN DE UN GRUPO DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS Y TRANSPORTE DE UN SIDERÓFORO EN *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE*

B. Puentes^{1*}, J. Bermúdez-Crespo², A.J. Rivas¹, C.R. Osorio¹, M.L. Lemos¹

¹Depto. de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura

²Depto. de Genética, Facultad de Biología, CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Photobacterium damsela subsp. *damsela* (PDD) es una bacteria marina de la familia *Vibrionaceae*, que afecta a diferentes especies de peces causando una forma de vibriosis con lesiones cutáneas y septicemias hemorrágicas. El hierro juega un papel fundamental en el metabolismo y la virulencia de PDD, aunque se desconocen los detalles de su asimilación. La estrategia habitual para la captación de hierro por las bacterias patógenas es la síntesis de sideróforos, cuyos genes de síntesis y transporte están regulados por la concentración de hierro. Con objeto de analizar la asimilación de hierro mediante sideróforos en PDD, realizamos un estudio comparativo de las proteínas totales sintetizadas en presencia o ausencia de hierro en la cepa RG-9.1, aislada de una epizootia. Las proteínas totales sintetizadas en estas dos condiciones fueron separadas por electroforesis 2-D y los *spots* fueron identificados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Se identificaron 51 *spots* Fe-reprimidos y 26 inducidos por hierro. Una de las proteínas Fe-reprimidas, presentó una identidad del 77% con PvsD de *V. parahaemolyticus*, un enzima implicado en la síntesis del sideróforo vibrioferrina (un polihidroxicarboxilato) y otras dos tenían una identidad del 73% con PvsA y del 79% con PvuA dos receptores de ese sideróforo. Estas proteínas están codificadas por genes que se encuentran localizados en dos operones: *pvsABCDE* (síntesis) y *psuA-pvuABCDE* (transporte). Mediante la comparación de secuencias de PvsD de distintos vibrios y mediante la construcción de una genoteca en cósmidos de PDD, pudimos identificar dos posibles operones de síntesis y transporte de un sideróforo de tipo polihidroxicarboxilato (probablemente vibrioferrina) en PDD. Actualmente estamos llevando a cabo un análisis detallado de estos posibles operones mediante mutagénesis, para el análisis funcional, y mediante RT-PCR para su análisis transcripcional.

SÍNTESIS DE SIDERÓFOROS EN *AEROMONAS SALMONICIDA* SUBSP. *SALMONICIDA*: PRODUCCIÓN DIFERENCIAL DE ACINETOBACTINA Y AMONABACTINA

A. Vences*, M. Balado, A. Rodríguez-Blanco, C.R. Osorio, M.L. Lemos

Depto. de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* es el agente etiológico de la forunculosis en peces tanto de agua dulce como marinos. La síntesis de sideróforos es uno de los principales mecanismos de virulencia de las bacterias patógenas, ya que les permite solventar la limitación de hierro que existe en el hospedador. Estudios previos han demostrado que *A. salmonicida* produce al menos un sideróforo de tipo catecol. En trabajos anteriores identificamos el posible receptor FstB y los genes *asb* (*asbBCDFG*) que participan en la biosíntesis de un sideróforo catecol identificado como acinetobactina. Sin embargo, este grupo de genes no codifica las funciones esenciales para la síntesis de 2,3-DHBA, el grupo funcional de este sideróforo. Con la publicación del genoma de la cepa A449 de *A. salmonicida*, se localizó un segundo cluster de genes (*ASA1838-1851*) homólogos a los que codifican la síntesis y transporte de otro catecol, la amonabactina, en *A. hydrophila*. Cabe destacar que este cluster incluye genes con elevada homología con el operón *entCEBA* de *E. coli*, imprescindible para la síntesis de 2,3-DHBA. En este trabajo se demuestra que los receptores FstB y FstC son responsables del transporte de amonabactina y acinetobactina, respectivamente. Curiosamente, mediante ensayos de alimentación cruzada con una colección de 20 cepas aisladas de brotes de forunculosis, y tras identificar los sideróforos producidos, hemos comprobado que la mayoría de cepas producían únicamente acinetobactina, y solamente una cepa (VT45.1) producía simultáneamente acinetobactina y amonabactina. Mediante mutagénesis, hemos demostrado que en esta cepa el gen *asbD* participa en la biosíntesis de acinetobactina, y que el gen *ASA1843* interviene en la producción de amonabactina. A su vez, la mutación del gen *ASA1840* (homólogo de *entB*) anula la síntesis de ambos sideróforos, lo que indica que los dos sistemas comparten los genes de síntesis del 2,3-DHBA. Nuestro trabajo actual trata de esclarecer la razón de por qué la mayoría de cepas no producen amonabactina a pesar de tener los genes necesarios para ello.

CASE HISTORY: INFECTION WITH PSEUDOMONAS ANGUILLISEPTICA AND DELFTIA ACIDOVORANS IN THE EUROPEAN EEL (ANGUILLA ANGUILLA)K. B. Andree^{1,2}, C. J. Rodgers^{1,2}, D. Furones^{1,2}, E. Gisbert^{1,2}¹IRTA, Crta. Poble Nou , Km 5.5, 43540, Sant Carles de la Rápita, Spain²Xarxa de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aqüicultura, Generalitat de Catalunya**Correspondence** K.B. Andree, IRTA-SCR, Crta. Poble Nou , Km 5.5, 43540 Sant Carles de la Rápita, Tarragona, Spain (e-mail: karl.andree@irta.es)

Inspections by customs agents at the Barcelona airport discovered 420kg of contraband glass eels prepared for shipment to Asia. After confiscation of these animals by police they were transported to our facilities to be maintained until a judicial hearing could decide on the proper disposition of the eels. Upon arrival, they were separated into two groups and held under ambient flow-through conditions in fresh water. During their captivity repeated peaks in mortality occurred and multiple bacterial strains were isolated. Sequencing of 16S rDNA was used to determine specific identity of the isolates. An initial isolation of *Pseudomonas anguilliseptica* was treated with oxytetracycline. A subsequent isolation of *Delftia acidovorans* proved resistant to oxytetracycline and was treated with gentamicin + sulphadine-trimethoprim. After treatments were begun their condition improved. Once the health condition of the animals was stabilized they were partitioned into groups, to be released as part of a restocking effort for the species following the guidelines of R(EC) 1100/2007 (Anon., 2007). This represents the first record for both bacterial species in the host *Anguilla anguilla* in the Spanish Mediterranean. Evidence of environmental alterations and the possible enrichment for *Delftia acidovorans* and its subsequent effects as an emerging pathogen of aquatic animals will also be presented.

RESPUESTA INMUNE DE REPRODUCTORES DE RODABALLO (*Psetta maxima*)

N. García-Lamas, P. García-González, S. González-González, A. Vizcaíno-Hermida e Y. Santos

Dpto. Microbiología y Parasitología, Ed. CIBUS-Fac. de Biología, Univ. De Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela (A Coruña), ESPAÑA.

El desarrollo de la acuicultura ha conllevado la aparición de numerosas patologías de diverso origen, destacando las patologías de origen bacteriano por su repercusión económica en este sector. En particular, la tenacibaculosis marina, causada por *Tenacibaculum maritimum*, es en la actualidad uno de los principales problemas patológicos que afectan al cultivo del rodaballo, *Psetta maxima* (L.).

El conocimiento del sistema inmune es básico para el desarrollo de métodos de prevención de las enfermedades. En este estudio se han inmunizado contra *Tenacibaculum maritimum* reproductores de rodaballo de ambos sexos, y se han medido diferentes parámetros del sistema inmune humoral para poder valorar la posible transferencia de inmunidad a la progenie.

SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD PROBIÓTICA EN ACUICULTURA

Maria Bobo¹, Leticia Rivera¹, Teresa P. Nieto^{1*}, Rosa Farto¹

¹ Area de Microbiología, Depto de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Lagoas-Marcosende, 36310, Vigo

En este trabajo se utilizó la microbiota obtenida de la superficie de organismos marinos cultivados para seleccionar cepas con carácter inhibitorio frente a bacterias patógenas tanto de peces como de moluscos. Estas son bacterias que comparten el medio ambiente del cultivo y por tanto adaptadas a las condiciones del mismo y a la dinámica de producción.

Se seleccionaron 150 cepas bacterianas, para probarlas *in vitro*, de las cuales 14 resultaron inhibitoras de cepas de *Vibrio anguillarum*, 2 cepas inhibieron a *Aeromonas salmonicida* y 7 cepas inhibieron a *Vibrio tapetis*. Cuatro de estas cepas comparten el carácter probiótico frente a los tres patógenos estudiándose actualmente el mecanismo de inhibición.

El crecimiento de *V. anguillarum* es inhibido en cultivo mixto, *Aeromonas salmonicida* es inhibida por un mecanismo de Quorum Quenching ya que las cepas probióticas muestran capacidad de degradar la molécula señal de este patógeno (N-butanoil-L-homoserina-lactona) y el mecanismo de inhibición de *V. tapetis* todavía se está estudiando. Al mismo tiempo se trabaja en la identificación de estos probióticos.

Los experimentos *in vivo*, usando rodaballo como animal de experimentación, han permitido evaluar la adherencia de *V. anguillarum* y la cepa probiótica a la superficie de dicho hospedador durante un mes. Se ha demostrado que la cepa probiótica desplaza al patógeno y perdura durante 15 días, aunque es desplazada por la microbiota normal a los 30 días. Los resultados demuestran que se aumenta la tasa relativa de supervivencia cuando se aplica el probiótico en concentraciones suficientes. Los experimentos *in vivo* usando moluscos como animal de experimentación presentan problemas para el seguimiento de los probióticos.

Los resultados son muy esperanzadores pues sugieren que un mismo probiótico es capaz de inhibir varios patógenos que afectan a los cultivos marinos.

ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DEL LENGUADO (*SOLEA SENEGALENSIS*) A LA INFECCIÓN CON BETANODAVIRUS RECOMBINANTES A DIFERENTES TEMPERATURAS

Sandra Souto*, Jose G. Oliveira, Adrián Fernández-López, Carlos P. Dopazo e Isabel Bandín.

Unidad de Ictiopatología- Instituto de Acuicultura. Depto. de Microbiología y Parasitología. Campus Vida, USC, 15706, Santiago de Compostela. A Coruña.

La encefalopatía o retinopatía viral es una de las patologías virales que ha adquirido más peso dentro de la acuicultura en la última década. Esto se debe a que el agente causal, perteneciente a la familia *Nodaviridae*, género *Betanodavirus*, tiene una gran capacidad para producir mortalidades en un gran rango de especies, incluyendo peces tanto marinos como de agua dulce. Los betanodavirus son virus desnudos y de pequeño tamaño con genoma RNA bisegmentado de cadena positiva. Dentro del género se distinguen cuatro genotipos, de los cuales el genotipo *redspotted grouper* (RGNNV) es el aislado más común en la península ibérica. Además, se ha detectado también la presencia del genotipo *striped jack* (SJNNV). Recientemente nuestro grupo ha descrito la aparición de virus recombinantes en dorada y lenguado de tipo RGNNV/SJNNV. El objetivo de este trabajo es evaluar la susceptibilidad del lenguado (*Solea senegalensis*) a una cepa de betanodavirus recombinante (RGNNV/SJNNV) a 15 y 22°C. Un total de 250 juveniles de lenguado se infectaron por inmersión a una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml. Se realizaron varios grupos: peces mantenidos todo el experimento a 15 °C y peces mantenidos a 15 °C durante 15 días, 30 días y 45 días tras los cuales la temperatura se aumentó progresivamente hasta alcanzar los 22 °C. Los lenguados mantenidos a 15 °C mostraron síntomas característicos de la enfermedad y una gran mortalidad, alcanzando un 94% al final del experimento. Las mortalidades en los tres grupos a 22°C alcanzaron el 100% a día 19, 28 y 17 (después del aumento de temperatura a día 15, 30 y 45 p.i., respectivamente). El virus se ha podido re-aislar en cultivo celular en todos los lotes y se ha detectado por RT-PCR y PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos indican que las cepas recombinantes de betanodavirus no sólo son capaces de mantenerse durante largos periodos a 15 °C sino que pueden replicar y causar mortalidad.

RESPUESTA PROTEÓMICA A LA EXPOSICIÓN AL Cu^{+2} EN LA BACTERIA MARINA *PANTOEA SP*

Paulina Pradel, Carolina Hernández, Manuel Sandoval, Benita Quilodrán y Alex González*

Laboratorio de Microbiología Ambiental, Núcleo de Biotecnología, Departamento de Recursos Naturales y Medioambiente, Universidad de los Lagos, Puerto Montt, Chile. alex.gonzalez@ulagos.cl

El cobre es un metal con características biocidas actualmente utilizado por la industria acuícola en pinturas industriales para evitar la adherencia de micro-organismos en balsas jaulas y embarcaciones. En estudios anteriores se ha demostrado la presencia de este metal en sedimentos marinos cercanos a centros salmonícolas. A partir de muestras obtenidas de estos sitios se aisló una bacteria Gram Negativa, cuya identificación basada en la secuencia del 16s rRNA evidenció que corresponde a *Pantoea sp*. Su alta resistencia a este metal fue determinada a través de la CMI de 15 mM. Para revelar los potenciales mecanismos moleculares involucrados por este microorganismo para resistir y absorber este metal se realizaron perfiles de proteínas totales mediante SDS-PAGE en distintos puntos de las curvas de crecimiento en ausencia y presencia de cobre (7mM). Las proteínas expresadas diferencialmente fueron secuenciadas mediante LC-MALDI-TOF. La identidad de las proteínas reveló que los procesos metabólicos se encuentran asociadas a la síntesis de proteínas y la glicólisis en este microorganismo.

Financiamiento: Proyecto DI-ULA, Núcleo de Biotecnología Marina y Ambiental, U. Lagos.

PROTEÓMICA DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE UNA CEPA DE *Edwardsiella tarda* VIRULENTE PARA EL RODABALLO Y OTRA AVIRULENTENoemí Buján^{1*}, Carolina Hernández-Haro², Alicia E. Toranzo¹, Concha Gil² y Beatriz Magariños¹¹Dpto. de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Fac. de Biología, USC, 15782 Santiago de Compostela²Dpto. de Microbiología II, Fac. de Farmacia, UCM, IRYCIS, 28040 Madrid

Edwardsiella tarda es una bacteria Gram-negativa responsable de la enfermedad conocida como edwardsielosis. Este patógeno infecta a multitud de organismos, desde peces hasta humanos. Solamente en el mundo de la acuicultura es capaz de causar mortalidades en más de 20 especies diferentes siendo la responsable de grandes pérdidas económicas en dicha industria.

La especie ha sido descrita como un grupo fenotípicamente homogéneo; por el contrario los estudios serológicos y de tipado molecular (LPS, OMP, ERIC-PCR, REP-PCR, RAPD) han mostrado una amplia heterogenicidad. Estos estudios no han podido determinar el motivo de la variabilidad patogénica, por lo que nos hemos planteado el estudio proteómico de expresión diferencial de una cepa virulenta frente a otra avirulenta, para intentar identificar proteínas implicadas en la virulencia de *E. tarda*. Con esta finalidad, hemos utilizado la metodología cuantitativa DIGE (Difference Gel Electrophoresis), que nos permite, no sólo comparar proteomas, sino también cuantificar los niveles de expresión de las proteínas de interés. Esta aproximación se basa en la técnica 2D-PAGE, a la cual incorpora el uso de fluorocromos para poder marcar los diferentes proteomas.

Los resultados previos obtenidos muestran una gran variabilidad proteica entre las dos cepas, ya que se han localizado 295 proteínas de expresión diferencial, de un total de 2000, con unas limitaciones estadísticas de 0,01 para el t-test (estadístico de Student) y un ratio de +/- 3 puntos en la cuantificación de las proteínas.

NUEVAS ESPECIES BACTERIANAS MARINAS CON ACTIVIDAD QUORUM QUENCHING

Manuel Romero*, Celia Mayer, Andrea Muras y Ana Otero

Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología (CIBUS), Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela

Debido a que numerosas especies de bacterias patógenas coordinan su virulencia mediante sistemas de Quorum Sensing (QS) mediados por N-Acilhomoserín lactonas (AHLs), la interceptación de éstas señales de Quorum o Quorum Quenching (QQ) constituye una alternativa interesante a los problemas de resistencia a antibióticos. Resultados previos de aislamiento de bacterias marinas con actividad QQ indicaron que estos procesos presentan una elevada prevalencia en el medio marino, con una elevada frecuencia de aislados con capacidad de degradación enzimática de señales de QS tipo AHL (Romero et al., 2011, 2012). De entre los aislados obtenidos con actividad QQ se han seleccionado por su elevada capacidad para degradar todo el rango de tamaños de AHL conocido 8 aislados pertenecientes a géneros estrictamente marinos. Estos aislados con actividad QQ de amplio espectro pertenecieron a Proteobacteria y Bacteroidetes. Todos presentan actividad QQ de tipo enzimático tanto en célula viva como extractos celulares crudos (ECCs). Se realizó una caracterización de la actividad QQ de los ECC de los aislados, resultando resistentes a altas temperaturas, liofilización. También evaluó el potencial del QQ sobre AHLs en cultivos larvarios de moluscos.

ESTUDIOS PRELIMINARES DEL MECANISMO DE *QUORUM SENSING* Y DEL SISTEMA DE SECRECCIÓN TIPO VI EN *Vibrio tapetis*Sabela Balboa^{1*}, Manuel Romero¹, Ana Otero¹, Debra Milton², Jesús L. Romalde¹¹ Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela y ²Department of Molecular Biology. University of Umeå. Sweeden.

El quorum *sensing* (QS) es un mecanismo de señalización celular mediado por pequeñas moléculas difusibles que permiten a la bacteria modular su expresión génica en función de la densidad de la población y que puede estar implicado en virulencia y formación de biopelículas. En bacterias gram negativas estas moléculas reguladoras son mayoritariamente homoacil-lactonas (AHLs). Para la realización de este trabajo se utilizaron tres cepas de *V. tapetis*, agente causal de la enfermedad del anillo marrón en almejas adultas, aisladas de tres hospedadores diferentes: almeja japonesa (*Venerupis philippinarum*), almeja fina (*V. decussata*) y halibut (*Hipoglossus hipoglossus*). En primer lugar, se procedió a la detección de la producción de AHLs de cadena corta mediante el biosensor *Chromobacterium violaceum*. Además, se estudiaron las AHLs producidas mediante HPLC. Ambos experimentos mostraron que las tres cepas producen las mismas AHLs: C4-2, C8, C10 y OHC8. Por otro lado se detectaron diversas proteínas y/o genes de un sistema de QS análogo al de *V. anguillarum*. Así, se detectó mediante PCR y se secuenció el gen regulador transcripcional *vanT* que en *V. anguillarum* activa la expresión de la metaloproteasa EmpA y de diversos exopolisacáridos, aunque en esta especie no está implicado en la virulencia de manera directa. Por otro lado se detectaron diversos componentes del sistema de secreción tipo VI (T6SS) mediante western blot. Entre otros, se detectó la presencia de la hemolisina Hcp análoga a la de *V. anguillarum* o la proteína estructural VtsC, aunque el grado de expresión de las proteínas varió entre cepas. Además, se estudió la citotoxicidad de los productos secretados por las tres cepas en diferentes líneas celulares.

DIVERGENCIA Y DINÁMICA EVOLUTIVA DE *Yersinia ruckeri*Asmine Bastardo^{1,2*}, Carmen Ravelo², Jesús L. Romalde¹¹ Depto. de Microbiología y Parasitología, CIBUS, Universidad Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España² Estación de Investigaciones Hidrobiológicas de Guayana, Fundación La Salle de Ciencias Naturales, 8051 San Félix, Venezuela.

Yersinia ruckeri es el agente etiológico de la enfermedad de la boca roja o yersinosis. Desde su primera descripción en la década de los 50, esta bacteria ha sido causante de constantes pérdidas económicas en la industria de la salmicultura. En este trabajo se estudia la dinámica evolutiva *Y. ruckeri* a partir de las secuencias multilólicas (<http://pubmlst.org/yrukeri>) de diferentes aislados procedentes de 9 áreas geográficas, en un periodo comprendido entre 1965 y 2009. Los análisis incluyeron métodos basados en coalescencia para la estimación de la divergencia genética, crecimiento y diferenciación poblacional. Además se utilizaron métodos de inferencia Bayesiana, para la determinación de la edad y ubicación de sub-poblaciones ancestrales e identificación de ancestros comunes más recientes, que permiten reconstruir los mecanismos de emergencia y dispersión de los haplotipos actuales. Los resultados demostraron una divergencia primigenia, así como la migración y permanencia en el tiempo de haplotipos en diferentes áreas geográficas, apoyando la teoría de que *Y. ruckeri* se ha diseminado desde USA hacia Europa y Suramérica durante la expansión de la salmicultura a nivel mundial. Sin embargo, la alta diferenciación genética encontrada, especialmente entre diferentes sub-poblaciones de Suramérica y Europa con las de USA, la divergencia de nuevos haplotipos entre 1994 y 2009 y la expansión demográfica observada en la población de *Y. ruckeri*, evidencian que además ha evolucionado de forma independiente en áreas específicas. La ubicación temporal de los diferentes nodos ancestrales provee fuerte evidencia estadística de que muchas de las cepas emergentes que han causado los brotes de yersinosis recientes (2002-2008) en peces vacunados surgieron hace 10-20 años, sugiriendo que el uso masivo a largo plazo de la misma vacuna puede haber inducido una fuerte presión selectiva favoreciendo la fijación de los haplotipos más virulentos.

COMPARACIÓN DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE PRESENTE EN DOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE VIEIRA (*Pecten maximus*) EN NORUEGAAna L. Diéguez^{1*}, Anita Jacobsen², Thorolf Magnesen², Jesús L. Romalde¹¹Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS. Universidad de Santiago de Compostela y ²Departamento de Biología. Universidad de Bergen. Bergen, Noruega.

La vieira, *Pecten maximus*, está considerada como especie potencial en acuicultura en Noruega y otros países europeos debido a su alto precio y la existencia de mercados establecidos. La tecnología utilizada en los criaderos noruegos no ha progresado mucho desde los años 60 y la mayoría dependen de sistemas estáticos de agua o de sistemas de flujo continuo (FTS). En los primeros estadios de vida, la vieira sufre elevadas tasas de mortalidad, la mayoría de etiología bacteriana. Se han propuesto diferentes procedimientos para aumentar la supervivencia incluyendo diferentes sistemas de cultivo como los sistemas de recirculación (RAS) y/o el uso de probióticos para eliminar bacterias perjudiciales como las poblaciones de vibrio. En este trabajo, se comparó la microbiota cultivable asociada a los distintos compartimentos en dos sistemas de producción, FTS y RAS. Se tomaron muestras de reproductores, larvas, microalgas, agua, biofilm, biofiltros y agua tratada con UV en distintos tiempos a lo largo del ciclo de producción. Los aislados obtenidos fueron identificados por caracterización fenotípica y secuenciación del gen 16S rRNA. El porcentaje de bacterias fermentativas (40%) y oxidativas (60%) es similar en reproductores y en la mayoría de los compartimentos de ambos sistemas, excepto en las muestras de biofilm, donde el porcentaje de bacterias oxidativas fue mayor. Algunas de las especies de *Vibrio* presentes en los reproductores también fueron detectadas en otras partes del sistema lo que puede indicar una transmisión vertical de estos aislados. La diversidad de bacterias oxidativas fue mayor que la de vibrios, mostrando ser más ubicuas y abundantes las especies de los géneros *Shewanella*, *Colwellia*, *Neptuniibacter* y *Pseudoalteromonas*.

ABUNDANCIA, DIVERSIDAD Y PAPEL ECOLÓGICO DE LAS BACTERIAS FOTOHETEROTRÓFICAS MARINAS

Isabel Ferrera^{1,2*}, Silvia G. Acinas¹, Carles M. Borrego³, Michal Koblizek⁴ y Josep M. Gasol¹

¹ Dpt. Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ciències del Mar-CSIC, 08003 Barcelona, ²Dpt. Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, ³Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona, 17071 Girona, y ⁴Institute of Microbiology CAS, 379 81 Trebon, República Checa

El descubrimiento durante la última década de las bacterias fotoheterotróficas marinas revolucionó nuestra visión sobre el ciclo del carbono en el océano. Un grupo importante de estos microorganismos es el de las bacterias fototróficas aeróbicas anoxigénicas (AAPs), organismos que aunque no fijan CO₂ contienen pigmentos (bacterioclorofila *a*) que les permiten obtener energía a partir de la luz. A pesar de lo aprendido en estos últimos años, su relevancia en el ecosistema marino no está del todo clara. En un principio se propuso que su metabolismo mixotrófico les aportaría una ventaja ecológica en relación a otras bacterias heterótrofas cuando la disponibilidad de carbono orgánico fuera limitante. Sin embargo, los resultados más recientes no apoyan esta hipótesis y, contrariamente, indican que las AAPs son más abundantes en ambientes eutróficos. Determinar cuál es su verdadero papel en el ecosistema marino sería el primer paso para incorporarlas a los modelos biogeoquímicos actuales. Con este objetivo, hemos realizado un estudio exhaustivo de su abundancia, actividad, distribución y diversidad en el océano. En primer lugar hemos estudiado su estacionalidad a lo largo de un ciclo anual en el Observatorio Microbiano de la Bahía de Blanes donde estos organismos representan entre un 0,2 y un 6,3% de los procariotas totales y muestran una clara estacionalidad con abundancias mayores en verano. Los análisis de diversidad del gen *pufM* (marcador génico de las AAPs) mediante pirosecuenciación, muestran que en el Mediterráneo Noroccidental la comunidad está dominada por miembros de las *Gammaproteobacteria* y no de las *Alfaproteobacteria* como ocurre en otras regiones del océano previamente estudiadas. En cuanto a actividad, las AAPs muestran tasas de crecimiento altas y son responsables de una gran parte de la producción bacteriana total a pesar de representar solo una pequeña parte de la comunidad total. Estos datos sugieren que su contribución al reciclaje de materia orgánica es mayor de la que se podría deducir a partir de su abundancia. Los datos estacionales obtenidos en Blanes se compararán con los de los muestreos extensivos realizados en las campañas de circunnavegación Malaspina y Tara Oceans que en conjunto cubren la mayor parte de áreas costeras y oceánicas del mundo.

ESTUDIO DE *LEGIONELLA* Y OTROS MICROORGANISMOS EN LAS DIFERENTES FASES DE LA ESTACIÓN DE TRATAMIENTO DE AGUAS POTABLES DE SANT JOAN DESPÍ Y SU AFECTACIÓN EN LA RED DE ABASTECIMIENTO

Carles Vilaró, Gemma Saucedo, Ana M^a Aira, Ivan Manero, Eva Durán y Belén Galofré.

Laboratorio Microbiología Sociedad General de Aguas de Barcelona

Desde los inicios del 2011 se ha cuantificado sistemáticamente el contenido de *Legionella spp* y *L. pneumophila* mediante la técnica de real time PCR en las diferentes fases de la ETAP de Sant Joan Despí así como las muestras sistemáticas de la red de abastecimiento de SGAB en el contexto de la legislación vigente. Se ha hecho un estudio de los datos obtenidos en el primer año de este control y se presentan las conclusiones extraídas.

Por lo que respecta a la *Legionella spp* en la ETAP de SJD la reducción media total del tratamiento es de 2,69 logaritmos de unidades de genoma (UG)/L, si bien los filtros de carbón activo granulado suponen un repunte considerable de los valores detectados. El resultado obtenido en la ozonización y en la salida de planta es muy cercano al LQ del método, que es de 2 logaritmos (100 UG/L). Por lo que respecta a las fases intermedias del tratamiento, sólo se ha detectado *Legionella pneumophila* en 2 ocasiones por debajo del límite de cuantificación del método (1000 UG/L), una en el agua ozonizada y la otra en la filtrada por carbón activo granulado, y muy puntualmente en el agua cruda.

En las muestras de la red de abastecimiento el porcentaje de muestras negativas es cercano al 95% para *Legionella spp* y del 100% para *Legionella pneumophila* (causante principal de la enfermedad de la legionelosis).

Igualmente se estudian otros parámetros microbiológicos como coliformes totales, bacterias aerobias a 22° C, *Aeromonas* y *Pseudomonas* para intentar establecer una posible relación como indicadores de la calidad del agua.

ESTABILIDAD Y DINÁMICA FUNCIONAL EN TAPETES MICROBIANOS: EL EJEMPLO DE LAS POBLACIONES DE ESPIROQUETASMercedes Berlanga,^{1*}Jordi Urmeneta,²Antoni Navarrete,² Ricardo Guerrero^{2,3}¹Depto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, UB, 08028 Barcelona.²Depto. Microbiología, Facultad de Biología, UB, 08028 Barcelona. ³Institut d'Estudis Catalans, 08001 Barcelona

Los tapetes microbianos son biofilms complejos de unos pocos milímetros de grosor, cuyas poblaciones procarióticas se distribuyen en forma laminada en la interfase sedimento/agua/aire. Los problemas técnicos que comporta muestrear comunidades bentónicas complejas comprimidas en tan poco espacio, e identificar las especies procarióticas por los métodos tradicionales, dificultan el análisis de su estructura, composición, ecofisiología y ecogenética. En este trabajo se ha realizado un estudio polifásico integrado de los tapetes microbianos del delta del Ebro en el que se han utilizado sondas moleculares (16S rRNA específicas de espiroquetas) y el análisis de biomarcadores lipídicos. Las muestras fueron recogidas en diferentes estaciones del año a lo largo de tres años. El estado fisiológico de la comunidad fue determinado por biomarcadores de lipídicos señal (ciclopropano/monoenoico y *trans*-monoenoico/*cis*-monoenoico). Los resultados mostraron que el ecosistema era estable, a pesar de las fluctuaciones estacionales cíclicas, de temperatura, salinidad y desecación, así como de las fluctuaciones diarias, de concentración de oxígeno y sulfuro. En estudios realizados en los tapetes microbianos de Guerrero Negro (Baja California, México), se ha observado que el dominio *Bacteria* representa el 90 % de las secuencias de 16S rRNA detectadas, el dominio *Archaea* representa el 9 %, y tan sólo el 1% corresponde a microorganismos del dominio *Eukarya*. Del total de secuencias de *Bacteria*, el filum Spirochaeta representa aproximadamente 1–4 %. A pesar de su baja representación, estudios moleculares del 16S rRNA utilizando cebadores específicos para las espiroquetas de los tapetes del delta del Ebro han mostrado una enorme diversidad de filotipos. Algunos filotipos presentaban una distribución estacional, p.ej., solo se observaban en la primavera, pero no en el invierno, mientras que otros estaban presentes en todas las estaciones. La redundancia funcional, como la que se ha observado en el caso de las espiroquetas, contribuiría a la estabilidad funcional del ecosistema, ya que asegura la presencia de un reservorio de especies que serían capaces de realizar la “misma” función ecológica. De esta manera, el sistema permanecería estable frente a una perturbación aunque sus miembros (“especies” de una población) fueran distintos.

BIOGEOGRAFÍA Y DIVERSIDAD DE PROCARIOTAS DIAZOTRÓFICOS MARINOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES Y GENÓMICAS

Francisco Miguel Cornejo-Castillo^{1*}, Guillem Salazar¹, Lucas Stal², Pascal Hingamp³, Josep M. Gasol¹ y Silvia G. Acinas¹

¹Dpt. Biología Marina i Oceanografía, Institut de Ciències del Mar-CSIC, 08003 Barcelona, Spain, ²Royal Netherlands Institute of Sea Research (NIOZ- Yerseke), 4400 AC Yerseke, The Netherlands, ³Laboratoire Information Génomique & Structurale, Parc Scientifique de Luminy, 13288 Marseille, France

El estudio de la biogeografía de los microorganismos marinos es una de las líneas de investigación actualmente más innovadoras y relevantes de la ecología microbiana gracias a la existencia de expediciones de circunnavegación global, tales como TARA Oceans (<http://oceans.taraexpeditions.org/>). Dentro de TARA Oceans, el consorcio de procariotas (TANIT), se ha focalizado entre otros objetivos, en el análisis de patrones de biogeografía de las distintas poblaciones bacterianas marinas en un contexto global, entre ellas las procariotas diazotróficas marinas. Estos microorganismos son fijadores de N₂ que, por su relevancia ecológica y limitada información sobre su distribución global, son de gran interés.

En una primera aproximación, se realizaron 5 genotecas, con un total de 413 clones pertenecientes a uno de los genes marcadores de la fijación de nitrógeno, *nifH*. Estas genotecas engloban 5 regiones oceanográficas muy importantes tales como el Mar Mediterráneo, Océano Índico, Atlántico sur, Antártico y Pacífico sur. Esto nos permitió analizar los patrones de diversidad de *nifH* en dichas regiones oceanográficas. En segundo término, gracias a que disponemos de más de 70 metagenomas de la fracción de bacterias (0.22-3 µm) secuenciados por Illumina procedentes de dichas regiones oceanográficas, se extrajeron las secuencias del *nifH* presentes en dichos metagenomas. Una de las secuencias recuperada mediante ambos métodos, (genotecas y metagenomas), pertenece a una cianobacteria diazotrófica integrada al taxón UCYN-A. Este grupo de bacterias, ha despertado mucho interés en los últimos años debido a que las secuencias genómicas del mismo proceden de una población mixta aislada por citometría de flujo y secuenciada con técnicas de secuenciación masiva. El análisis de dichas secuencias ha mostrado que poseen un metabolismo muy particular. En concreto, no presentan rutas metabólicas propias de cianobacterias y de fotótrofos en general, incluyendo el ciclo de los ácidos tricarbónicos y se postula que podrían ser microorganismos ectosimbiontes. Para profundizar un poco más en la genómica de este grupo de cianobacterias se realizó un análisis de reclutamiento de fragmentos (FRA), técnica que consiste en alinear secuencias metagenómicas a un genoma de referencia. En este caso, se tomó como referencia el genoma de UCYN-A. Sorprendentemente, dicho análisis nos permitió recuperar en determinadas muestras superficiales del Atlántico Sur hasta un 90% del genoma de UCYN-A. Finalmente, se analizaron en detalle las diferencias y similitudes entre el genoma de UCYN-A y las secuencias metagenómicas asignadas a dicho microorganismo y su distribución espacial.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL RÍO HENARES

Inmaculada F. Monistrol*, Marina Dacal, Ana Alobera, Paula García y Juan Soliveri.

Dpto. Microbiología y Parasitología. UAH. Campus externo, 28871, Alcalá de Henares, Madrid

El río Henares, en su tramo bajo, pasa por diversos núcleos de población de gran tamaño que alteran la calidad sanitaria y ambiental de sus aguas. Sin embargo, actualmente está siendo utilizado para el baño y la pesca por la población colindante. Con el fin comprobar si las aguas del río son adecuadas para estos usos, se han realizado análisis microbiológicos que muestran altos niveles de contaminación fecal, por lo que el Henares no cumple con las normas reguladoras para las aguas de baño.

ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE CALICIVIRUS EN BROTES DE GASTROENTERITIS TRANSMITIDOS POR AGUA Y POR CONSUMO DE MARISCO EN CATALUÑA

Susana Guix¹, Aurora Sabrià¹, Rosa M. Pintó¹, Angela Domínguez², Albert Bosch¹ y Grupo de Trabajo para el estudio de GEA víricas en Cataluña

¹ Grupo de Virus Entéricos, Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona.

² Departamento de Salud Pública, Universidad de Barcelona.

El agua y el consumo de marisco están considerados como importantes vías de transmisión de enfermedades humanas, y a pesar de la normativa reguladora basada en bacterias entéricas, todavía hoy son la causa de numerosos brotes de infecciones víricas. Los patógenos que más frecuentemente originan brotes asociados al consumo de agua y marisco contaminados son los norovirus (NoV), los cuales causan gastroenteritis aguda y son miembros de la familia *Caliciviridae*. Los sapovirus (SaV) pertenecen a la misma familia y, a pesar de que son reconocidos como agentes causantes de gastroenteritis esporádicas, todavía se desconoce si también constituyen un riesgo potencial en la contaminación de agua y marisco. El objetivo de este trabajo fue investigar la relevancia y las características epidemiológicas de los brotes de gastroenteritis por NoV y SaV de transmisión hídrica y asociada al consumo de marisco en Cataluña.

Como parte del estudio de vigilancia epidemiológica, se investigó la presencia de NoV y SaV por RT-PCR cuantitativa en las muestras de heces de todos los pacientes de brotes de gastroenteritis de posible etiología vírica durante los años 2010 y 2011. De los 102 brotes declarados compatibles con una etiología vírica negativos para bacterias, parásitos y toxinas, el 50 % se produjeron por transmisión alimentaria y el 4 % por transmisión hídrica. Se identificó NoV como agente causante de todos los brotes de origen alimentario e hídrico, y no se identificó ningún brote asociado a SaV. En un tercio de los brotes de origen alimentario (17 brotes) se identificó el marisco entre los alimentos sospechosos. El 76,5% de estos brotes se declararon durante los meses fríos, mientras que los brotes de transmisión hídrica ocurrieron principalmente durante los meses cálidos. NoV fue identificado como el agente causante en los 21 brotes analizados, y en 5 casos pudo confirmarse la contaminación vírica en las muestras de agua y de bivalvos, analizadas por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. En 15 de estos brotes se identificó únicamente NoV genogrupo II, en 1 brote se identificó únicamente NoV genogrupo I, en 2 brotes se identificó genogrupo I y II, y 3 brotes quedaron sin poder tiparse. Las cepas de genogrupo II aisladas con mayor frecuencia correspondieron a GII.4 2010, GII.12 y GII.13. A pesar de que SaV no se identificó como agente causante de ningún brote de transmisión alimentaria o hídrica, estos virus se identificaron en algunos de los individuos afectados de 2 de estos brotes, sugiriendo que el marisco podría haber jugado un papel también en la transmisión de SaV. Los resultados obtenidos confirman la importancia del agua y del marisco como agente causante de brotes de gastroenteritis vírica asociados a NoV.

DETECCIÓN Y GENOTIPADO DE NOROVIRUS DETECTADOS EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DE MOLUSCOS. IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS

Carmen F. Manso*, Alba Monteagudo, Jesús L. Romalde

Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.15782, Santiago de Compostela.

Los Norovirus (NoV) son la principal causa de gastroenteritis, tanto de brotes como de casos esporádicos, en todo el mundo. El género Norovirus, dentro de la familia *Caliciviridae*, es genéticamente muy diverso, incluyendo 29 genotipos dentro de 6 genogrupos (I-VI). Los NoV representan un importante problema de salud pública, debido a su gran resistencia en el medio ambiente y su transmisión a través de agua o comida contaminada, especialmente moluscos.

En este trabajo se analizaron un total de 2643 muestras de pacientes afectados de gastroenteritis procedentes del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, Galicia, durante un periodo de 1 año (julio 2010-junio 2011). Se analizaron también 81 muestras de mejillón recogidas mensualmente en 6 puntos de muestreo de la Ría do Burgo, Galicia, durante un periodo comprendido entre octubre de 2010 y marzo 2012. Tras la extracción del RNA, la detección de NoV presentes en las muestras se realizó mediante RT-PCR en tiempo real con sondas TaqMan. El genotipado de las distintas cepas de NoV detectadas se llevó a cabo mediante secuenciación de una región parcial del gen de la capsida, tras su amplificación mediante seminested RT-PCR específicas para GI y GII.

De las 2643 muestras clínicas analizadas, se detectó la presencia de NoV en 747 (28,26%). Todas las cepas fueron caracterizadas como GII. Dentro de este genogrupo, las cepas se asignaron a distintos genotipos: GII.1 (0,67%), GII.3 (2,65%), GII.4 (36,42%), GII.7 (8,6%), GII.6 (2,65%), GII. 12 (2,65%), GII.13 (13,24%), GII.14 (33,11%). En el caso de los moluscos, 50 de las 81 (61,7%) muestras analizadas fueron positivas para la presencia de NoV. En estas muestras se detectó tanto la presencia de GI (37,5%) como de GII (62,5%). Todas las muestras de GI detectadas se asignaron al genotipo GI.4, mientras que las muestras de GII se asignaron a los genotipos GII.4 (80%) y GII.6 (10%).

VIRUS NUEVOS, EMERGENTES Y CLÁSICOS DETECTADOS EN AGUA, EMPLEANDO UN PROCEDIMIENTO DE CONCENTRACIÓN DE BAJO COSTO, Y ENSAYOS DE PCR Y SECUENCIACIÓN EN MASA

Byron Calgua^{1*}, Paul G. Cantalupo², Tulio Fumian³, Gouyan Zhao⁴, Ayalkibet Hundesa¹, Marta Rusiñol¹, Jesús Rodríguez-Manzano¹, Silvia Bofill-Mas¹, David Wang⁴, Marize Miagostovich³, James M. Pipas² and Rosina Girones¹.

¹ Universitat de Barcelona, Cataluña, España. ² University of Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

³ Oswaldo Cruz Institute, Brazil. ⁴ Washington University, Missouri, USA.

Introducción. El agua residual es la principal fuente de contaminación fecal para el medio ambiente. Los virus humanos que se transmiten por la vía fecal-oral son habitualmente detectados en aguas contaminadas. Al día de hoy se reconocen cerca de 3.000 virus agrupados en 84 familias. Sin embargo, recientes estudios metagenómicos en heces y en agua, sugieren que la cantidad de virus podría ser mucho mayor que los reportados hasta el momento.

Objetivos. (i) Analizar la robustez de métodos para la concentración de virus en agua. **(ii)** Estudiar la diseminación en agua de río de Barcelona y Río de Janeiro, de nuevos virus descritos recientemente [Klassevirus (KV), Asfarvirus-like virus (ASFLV), Merkel cell, KI and, WU polyomavirus (MCPyV/KIPyV/WUPyV)]. Conjuntamente, analizar en agua de río adenovirus humanos (HAdV) y JC polyomavirus (JCPyV) como indicadores víricos de contaminación fecal, y norovirus y rotavirus como principales agentes de gastroenteritis vírica. **(iii)** Desarrollar un protocolo para el estudio de los virus presentes en agua residual, usando secuenciación en masa para identificar nuevos virus humanos excretados en agua residual.

Resultados. En los ensayos inter-laboratorio, el método para concentrar virus en agua de río empleando agua artificialmente contaminada con HAdV, JCPyV, NoV y RV mostró un 50% de recuperación vírica. Durante el estudio de campo en agua de río, las concentraciones detectadas para HAdV, JCPyV y NoV GGII fueron similares en Barcelona y Río de Janeiro con rangos entre 10^3 y 10^4 CG/L. En Río de Janeiro se detectó RV en concentraciones de 10^3 GC/L. En Barcelona únicamente se detectó MCPyV (33,33%), mientras que en Río de Janeiro la prevalencia de KV, ASFLV, KIPyV, WUPyV y MCPyV fue de 33,33; 16,66; 16,66; 16,66 y 50 %, respectivamente. Los ensayos de secuenciación en masa de agua residual, mostraron la presencia de 234 virus conocidos, incluyendo 17 que infectan humanos y que son miembros de las familias: *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Papillomaviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* y *Polyomaviridae*. También se detectaron en grandes concentraciones bacteriófagos y virus de plantas. Los virus detectados y representados en 26 familias, incluyen virus con genomas ssDNA, dsDNA, ssRNA(+), y dsRNA. Los nuevos virus encontrados podrían ser miembros de 51 familias diferentes. Sin embargo, la gran mayoría de secuencias obtenidas (600.000 aproximadamente), muestran poca relación con los virus conocidos, no pudiendo ser incluidas dentro de las familias descritas hasta el momento.

Conclusiones. Los ensayos de secuenciación en masa sugieren que el agua residual es el metagenoma vírico más diverso estudiado hasta ahora. El presente estudio es la primera descripción de KV y ASFLV en agua de río y de MCPyV, KIPyV and WUPyV en el medio ambiente de Brasil. MCPyV mostró una elevada prevalencia tanto en Barcelona como en Río de Janeiro. Los procedimientos de concentración de virus empleados en ambos estudios son metodologías eficientes, de bajo costo y fáciles de implementar en laboratorios relacionados con la evaluación microbiológica del agua.

DIVERSIDAD DE ESPECIES DE *Arcobacter* EN MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES PROCEDENTES DE PLANTAS DE TRATAMIENTO AMERICANAS

Arturo Levicán^{1*}, Sandra Mac Lellan³, Antonio Martínez-Murcia², María José Figueras¹

¹Unidad de Microbiología, IISPV, URV, Reus; ²Unidad de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, Orihuela;

³Great Lakes Water Intitute, University of Wisconsin-Milwaukee, USA

El género *Arcobacter* pertenece a la familia *Campylobacteraceae* y algunas de sus especies son consideradas patógenos emergentes. Aunque se cree que es un microorganismo autóctono del agua, su presencia en este medio se ha correlacionado con contaminación fecal. En este sentido, las especies de este género, y en particular *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*, presentan una alta prevalencia y diversidad en aguas residuales. El análisis de las comunidades bacterianas presentes en dos plantas de tratamiento de aguas residuales de USA, utilizando las regiones hipervariables del gen 16S ARNr, reveló que *Arcobacter* representa un 3.5% de las secuencias siendo uno de los géneros más predominantes. El estudio de dichas secuencias (n=805), comparándolas con las de las cepas tipo de las especies del género, es el objetivo de este trabajo.

Se procesaron 8 muestras entre 2005 y 2008 de las plantas Jones Island y South Shore, Milwaukee, USA. La secuenciación de regiones hipervariables del gen 16S se realizó mediante pirosecuenciación 454. El análisis comparativo de las 805 secuencias asignadas al género *Arcobacter* con secuencias del gen 16S de las 15 especies aceptadas y 3 potenciales nuevas especies, reveló que sólo 778 (96,6%) pertenecían filogenéticamente a arcobacters aunque las 27 (3,4%) restantes se agruparon dentro de la familia *Campylobacteraceae*. Sin embargo, sólo 239/778 (30,7%) de estas secuencias se agruparon con especies conocidas, como *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. venerupis* y "A. suis". Las secuencias restantes, 539/778 (69,3%), aparentemente representan nuevas líneas filogenéticas dentro del género *Arcobacter* y 371/539 (47,7%) de estas se agruparían cerca de la especie recientemente descrita *A. venerupis*.

El análisis filogenético de secuencias de zonas hipervariables del gen 16S ARNr obtenidas de las aguas residuales reveló una diversidad de *Arcobacter* spp. distinta a la observada por cultivo. Gran parte estas secuencias (~70%) podrían pertenecer a potenciales nuevas especies del género.

DIVERSIDAD DE *Aeromonas* EN AFLORAMIENTOS DE CIANOBACTERIAS EN FINLANDIA

Roxana Beaz-Hidalgo^{1*}, Katri Berg², R. Maarit Niemi³, Jarkko Rapala⁴, Christina Lyra² y María José Figueras¹

¹ Unidad de Microbiología, IISPV, URV, Reus; ² Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki, ³ Finnish Environment Institute; ⁴ Department of Promotion of Welfare and Health, Helsinki, Finlandia.

Las comunidades bacterianas heterotróficas asociadas a afloramientos de cianobacterias pueden tener un impacto importante en los ecosistemas acuáticos y efectos letales en peces e invertebrados acuáticos, incluso pueden afectar la salud humana. En un estudio anterior se recuperaron 460 aislados de bacterias asociadas a afloramientos detectados en el mar báltico y en lagos y ríos de Finlandia, de los cuales 195 pertenecían a la clase *Gammaproteobacteria* y un 61% se identificaron como *Aeromonas* sp. en base al gen 16S rRNA. La secuenciación del gen *rpoD* y su posterior análisis filogenético nos permitió reconocer que las especies más prevalentes eran por orden decreciente *A. veronii* (23.5%, 28/119), *A. popoffii* (20.2%, 24/119), *A. salmonicida* (15.1%, 18/119), *A. piscicola* (11.8%, 14/119), *A. hydrophila* (6.7%, 8/119), *A. bestiarum* (5.9%, 7/119), *A. sobria* (3.4%, 4/119), *A. jandaei* (2.5%, 3/119), *A. encheleia* (0.8%, 1/119) y *A. allosaccharophila* (0.8%, 1/119). Así mismo se observó que 11 cepas identificadas como *Aeromonas* sp. pertenecían a 3 posibles nuevas líneas filogenéticas en el género. Las 11 cepas fueron analizadas utilizando 7 genes *housekeeping* y los resultados ratifican la presencia de 3 posibles nuevas especies coincidiendo con los obtenidos con el gen *rpoD*. Este estudio demuestra una elevada prevalencia en afloramientos de cianobacterias de especies de *Aeromonas* capaces de producir infecciones en peces y de *A. veronii*, una de las especies que afecta principalmente al hombre, pudiendo considerarse un riesgo adicional para la salud humana y animal.

EFEECTO DE LA INMUNOESTIMULACIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE LA LUBINA (*Dicentrarchus labrax*)Miguel Carda*¹, Alex Mira², Carlos Zarza³ y Belén Fouz¹¹ Dpto. de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, 46100 Valencia, ² Depto. Genómica y Salud, CSISP, 46020 Valencia y ³ Fish Health Service, Skretting. Carretera de la estación s/n. Cojóbar, Burgos, Spain.

La acuicultura es el sector de producción alimentaria que está creciendo con más rapidez, siendo la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) la especie cultivada más importante en el área mediterránea. Las enfermedades infecciosas representan uno de los principales factores limitantes de los cultivos acuáticos. Una de las estrategias más novedosas para minimizar el impacto de estas enfermedades es la administración de dietas funcionales que potencien o estimulen el funcionamiento del sistema inmunitario. El principal objetivo de este trabajo ha sido averiguar el efecto de dietas “salud” seleccionadas sobre la composición de la microbiota intestinal de la lubina. Para ello, se alimentaron lubinas con una dieta estándar y con dos dietas “salud” (B y C) y se analizó la composición bacteriana del moco y del contenido intestinal de los peces empleando técnicas de secuenciación masiva de segunda generación (pirosecuenciación de productos de PCR del gen ADNr 16S usando cebadores bacterianos universales). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que existe una mayor diversidad bacteriana en el moco intestinal (microbiota residente) que en el contenido intestinal (microbiota transeúnte). En el caso de la microbiota del contenido intestinal, el análisis no resultó reproducible. Por el contrario, sí resultó reproducible el análisis de la microbiota presente en el moco intestinal. Tras 4 semanas de administración de las dietas, en los peces alimentados con las dietas “salud” se observó una reducción significativa en la población del género *Dysgonomonas* y, además, en los alimentados con la dieta C, un aumento significativo de la población del género *Ralstonia*. Este efecto resultó reversible y la microbiota recuperó sus niveles iniciales tras 8 semanas de alimentación con la correspondiente dieta. La relación entre los cambios observados y posibles efectos beneficiosos en la resistencia a enfermedades está en fase de análisis.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos AGL 2011-29639 (cofinanciado con fondos FEDER) y por el Programa Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00006

CARACTERIZACIÓN POLIFÁSICA DE AISLADOS DE *Shewanella* SPP. ASOCIADOS A MICROBIOTA DE ALMEJA

A. Lasa*, A.L. Diéguez y J.L. Romalde.

Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.

El género *Shewanella* fue creado después de la reclasificación de dos especies del género *Alteromonas* (*Alteromonas putrefaciens* y *Alteromonas hanedai*), como *Shewanella putrefaciens* y *Shewanella hanedai*. Desde entonces, el número de especies descritas dentro del género se ha incrementado considerablemente, y en la actualidad el género *Shewanella* está compuesto por más de 50 especies. Las especies de este género son bacterias Gram negativas, con metabolismo anaerobio facultativo y, principalmente, se encuentran asociados a hábitats marinos.

Un grupo de 10 aislados marinos se obtuvo de muestreos de almeja fina (*Venerupis decussata*) y almeja japonesa (*V. philippinarum*) en Galicia. La caracterización bioquímica de estos aislados determinó que se trataba de bacilos Gram negativos, con metabolismo aerobio, oxidasa y catalasa positivos, que hidrolizan gelatina y esculina, reducen nitratos a nitritos, presentando además algunas cepas actividad agarolítica. La secuenciación del gen 16S rRNA mostró que estas cepas presentaban una mayor similitud con miembros del género *Shewanella*, concretamente con la especie *Shewanella japonica* (similitud del 96,1% al 99%). En algunos de estos aislados se ha detectado actividad antibacteriana contra miembros patógenos del género *Vibrio*. Ya que los resultados obtenidos hasta el momento, indican que algunos de estos aislados podrían constituir nuevos taxones no descritos, en la actualidad se están llevando a cabo ensayos de hibridación y MLSA para su correcta identificación.

THE SYMBIOTIC MYCOBIOTA OF AQUATIC INSECTS: ELUDED GROUP OF FRESH-WATER HABITANTS?

Laia Guàrdia Valle

Universitat Autònoma de Barcelona, Fac. Biociències, Botànica. Bellaterra 08193-Barcelona. Laia.guardia@uab.cat

Arthropod gut symbionts comprise diverse organisms including bacteria, protists, nematodes (Metazoa) and fungi, each developing a particular role within the digestive system of their arthropod hosts (Dexter Dyer 2002, Cafaro 2005, Lichtwardt et al 2001, Nardi et al 2006).

Immature stages of non-predaceous aquatic insects and crustaceans harbor in their guts filamentous microorganisms, branched or not, attached to the chitinous gut lining of their hosts by means of cellular structures or secreted holdfast material (Lichtwardt 1986). These are members of the obsolete class Trichomycetes, now recognized as an ecological group including two orders of Mesomycetozoon protists: Amoebidiales and Eccrinales (Benny and O'Donnell 2000, Cafaro 2005, White et al 2006b, Hibbett et al 2007) and two orders of fungal Kickxellomycotina: Harpellales and Asellariales (Zygomycota) (Hibbett et al 2007). Trichomycetes are considered to be commensalistic, but this may underestimate the complex reality of the symbiosis, and possible shifts have been documented in *Smittium* species, ranging from parasitism to mutualism under certain nutritional conditions (McCreadie et al 2005). However, little is known about their ecology and many questions regarding their functional role, physiology, or their relationship with other inhabitants of the gut lumen, such as the numerous bacteria that are often associated to their thalli, keep unresolved. Some species of Harpellales (e.g. *Tectimyces* spp) appear indefinitely associated to filamentous bacteria, and over their physical contact, they may probably have some metabolic interactions.

The trichomycetes (except some Dipteran-associated species), obligate inhabitants of the digestive tracts of their larval or nymphal non-flying hosts, have an apparent spreading limitation. However they are ubiquitous in fresh water habitats where their potential hosts are present, and may have an important role in the maintenance of the arthropod community and thus, in the system equilibrium.

CARACTERIZACIÓN Y TRAZABILIDAD DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS AERÓBICAS HETEROTRÓFICAS DE AGUAS MINERALES NATURALES EMBOTELLADASLaura Sala-Comorera^{1*}, Arnau Casanovas-Massana¹ y Anicet R. Blanch¹¹Dept. de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona.

La demanda de agua embotellada ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años, este incremento se debe a distintos factores. Las fuentes y los acuíferos poseen una microbiota propia que los caracteriza y diferencia. Se ha descrito que la microbiota autóctona de las aguas embotelladas evoluciona a lo largo de su vida comercial. La caracterización de la microbiota y sus variaciones en el tiempo, podrían aportar una herramienta para la trazabilidad del producto. En este estudio se propuso la caracterización y trazabilidad de la microbiota de 4 aguas minerales naturales, del territorio español, envasadas en botellas de vidrio y analizadas a los 55, 127 y 365 días después de su envasado. Se procedió al aislamiento de las poblaciones microbianas por filtración en membrana y posterior incubación en R2A a 22°C y 7 días. Las cepas aisladas fueron fenotipadas bioquímicamente mediante las placas PhP-48 PhPlate AB. Se calcularon los índices de diversidad y similitud entre las poblaciones, y se identificaron las cepas representativas de los grupos fenotípicos mayoritarios mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. La diversidad poblacional fue elevada aunque disminuyó con el paso del tiempo, pasando a estar dominada por pocos grupos fenotípicos. Los índices de similitud poblacional mostraron diferencias significativas en las composiciones de las microbiotas en las distintas botellas. El agua según el estadio de envejecimiento presenta un perfil bioquímico propio por lo que se produce un cambio en la estructura de la microbiota del agua con el paso del tiempo. Aunque la diversidad es muy elevada, se han identificado sólo pocos géneros bacterianos, por lo que la microbiota puede estar formada por un número elevado de especies en bajas concentraciones. La metodología basada en la comparación fenotípica resultó ser un método válido para diferenciar poblaciones de aguas minerales a lo largo de su vida comercial.

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE UNA PLANTA PILOTO DE ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO

Abzazou Tarik¹, Canals Oriol² Salvadó Humbert² Rosa M^a Araujo¹

¹Depto. De Microbiología, Facultad de Biología, UB, 08028 Barcelona, España.

²Depto. De Biología Animal, Facultad de Biología, UB, 08028 Barcelona, España.

La alta concentración de amonio en las aguas residuales es uno de los problemas más importante de las plantas depuradoras. El sistema Nitrificación Parcial-Anaerobic amonium oxidation (NIPAR-ANAMMOX) es uno de los sistemas más adecuados para la eliminación de nitrógeno en las aguas residuales teniendo en cuenta la eficiencia y el ahorro económico que representa comparándolo con los sistemas convencionales de eliminación de nitrógeno (un ahorro del 20% de O₂ suministrado y hasta 40% de materia orgánica añadida).

El estudio de la diversidad microbiológica de cualquier sistema de depuración nos ayuda a entender tanto el funcionamiento del sistema como su eficiencia, y para llevar a cabo este estudio varias técnicas han aparecido en los últimos años. Una de las técnicas más aplicadas en este tipo de estudios es la técnica de *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH).

La planta piloto estudiada en este trabajo consiste en la combinación de dos reactores, uno de nitrificación parcial y otro ANAMMOX. La planta se ha diseñado con el objetivo de tratar un agua residual con elevada concentración de amonio mediante la actividad microbiana oxidando el amonio a nitrógeno gas.

El objetivo de este trabajo es la puesta a punto de la técnica FISH para el estudio de la diversidad microbiana en el sistema NIPAR-ANAMMOX de la planta piloto de eliminación de nitrógeno estudiada. Las muestras estudiadas fueron la del licor mezcla y la del biofilm formado en los carriers de ambos reactores, las muestras fueron analizadas quincenalmente.

Para poder observar y cuantificar las bacterias implicadas en el proceso de eliminación de nitrógeno y en concreto las bacterias ANAMMOX se puso a punto un proceso de desagregación de los flóculos mediante sonicación.

La técnica de FISH fue aplicada con éxito y los resultados obtenidos nos confirman la eficacia esa técnica como herramienta útil para el estudio *in situ* de las comunidades bacterianas en sistemas complejos de tratamiento de aguas residuales como el sistema NIPAR-ANAMMOX.

DESARROLLO DE FILTROS CERAMICOS PARA LA ELIMINACIÓN DE VIRUS DEL AGUA DE BEBIDA EN EL CONTEXTO DE HAITÍ

Laura Guerrero-Latorre¹, Marta Rusiñol¹, Joseph Osnick², Silvia Bofill-Mas¹, Rosina Girones¹.

¹ Virus contaminantes de agua i alimentos, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

² Laboratoire de Qualité de l'Eau et de l'Environnement, Université Quisqueya, Port-au-Prince, Haïti

En países de baja renta y bajo nivel sanitario, los tratamientos de agua a nivel domiciliario son soluciones que demuestran ser costo-efectivas y rentables para mejorar la calidad del agua y por lo tanto, de la salud. Entre ellos, los Filtros de Agua Cerámicos cumplen con las recomendaciones de rendimiento microbiológico dictadas por la OMS para la eliminación de bacterias (reducción de 2-4 log), sin embargo, las eficiencias de eliminación viral descritas varían en un rango comprendido entre 0,21 y 0,45 log. Estos niveles no son suficientemente altos para evitar riesgos por contaminación microbiana en el medio acuático como demuestra un estudio llevado a cabo en colaboración con la Universidad de Quisqueya (Port-au-Prince, Haití) donde se han detectado virus en elevadas concentraciones en las aguas superficiales de la capital del país.

Un nuevo modelo de Filtro de Agua Cerámico desarrollado en nuestro laboratorio con arcilla proveniente de Haití y cocida en atmósfera reductora ha sido testado usando agua mineral artificialmente contaminada con 1.00E+05 GC/ml de adenovirus humanos, 1.00E+07 UFP/ml de bacteriófagos MS2 y 1.00E+06 UFC/ml de *E.coli*. Los resultados han demostrado una reducción de virus y bacterias de más de 3.0 log y 3.5 log, respectivamente, reducción que cumpliría con los criterios microbiológicos recomendados por la OMS.

EFFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LEGIONELLA Y PROTOZOOS

Sílvia Cervero-Aragó¹, Regina Sommer², Rosa M. Araujo¹.

¹ Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, y ² Institute of Water Hygiene and Applied Microbiology, Medical University of Vienna.

Legionella es un microorganismo resistente a condiciones fisicoquímicas extremas en comparación con otros microorganismos acuáticos. Por otra parte, esta resistencia se ve incrementada cuando la bacteria se encuentra como endosimbionte de protozoos con los que comparte hábitat. Esta asociación proporciona a la bacteria nutrientes para multiplicarse y una protección frente las condiciones adversas del medio incluyendo los desinfectantes.

La susceptibilidad de *Legionella* frente a los diferentes métodos de desinfección, ha sido descrita por varios autores, especialmente frente al cloro y a la temperatura, que son los biocidas más utilizados en los sistemas de distribución de agua españoles. El tercer método más utilizado para la desinfección de agua es la radiación UV. El sistema de desinfección con luz UV presenta una gran ventaja debido a que no deja ningún compuesto residual en el agua, y no causa efectos secundarios.

Existen algunos estudios referentes al efecto desinfectante de la luz UV sobre *Legionella*, sin embargo todos ellos, se han realizado con células bacterianas en suspensión, sin tener en cuenta la asociación con amebas de vida libre.

El objetivo principal de nuestro trabajo fue estudiar el efecto desinfectante de la radiación UV sobre distintas cepas de *Legionella* sp, amebas de vida libre en estado de trofozoito y quiste, y sobre bacterias y amebas asociadas.

Los resultados mostraron que las células de *Legionella* libres fueron las que se inactivaron hasta 4 logaritmos aplicando un flujo de luz ultravioleta de entre 20-50 J/m². Sin embargo, las amebas mostraron una mayor resistencia, especialmente en estado de quiste. Para inactivar los quistes de *Acanthamoeba* sp. fue necesario aplicar un flujo superior a 1000 J/m² para poder observar una inactivación de 4 logaritmos.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE *LEGIONELLA SPP* Y *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* MEDIANTE REAL TIME PCR SEGÚN AFNOR NF T90-471 EN EL MARCO DE LA ISO17025

Gemma Saucedo, Belén Galofré.

Laboratorio Microbiología Sociedad General de Aguas de Barcelona

Si bien en el ámbito de la investigación las guías MIQE dan la unificación de criterios y las pautas necesarias para la publicación de experimentos de real time PCR, en la empresa privada es la acreditación de los métodos -con su previa validación y posterior control de calidad- en el marco de la ISO17025 la que determina la validez de un resultado analítico.

Un ejemplo en el caso de la biología molecular mediante la técnica de real time PCR es la acreditación del método para la detección y cuantificación de *Legionella* y/o *Legionella pneumophila* por concentración y amplificación génica por la reacción de real time PCR según Norma AFNOR NF T 90-471. Esta norma marca las siguientes pautas para la validación del método y el control de calidad necesario:

- Dominio de aplicación
- Referencias normativas
- Términos y definiciones
- Principios
- Envases
- Condiciones generales de realización de los ensayos
- Modo operacional: concentración, extracción, amplificación, secuencias y protocolo.
- Expresión de resultados
- Informe de ensayo
- Evaluación de los análisis: Inclusividad y exclusividad de los primers y sondas, recta de calibración, verificación del límite de detección y cuantificación, rendimiento, robustez e incertidumbre.
- Controles de calidad y seguimiento de los análisis: controles positivos y negativos, blanco de reactivos y control de inhibición.

Esto supone un trabajo analítico previo a la acreditación del método y posterior para garantizar que éste mantiene las condiciones que se han establecido en la misma.

EFFECTOS DE LA AGREGACIÓN INDUCIDA POR CULTIVO EN BIO-PELLETS Y SU USO COMO INÓCULO EN LA VERIFICACIÓN DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE *Legionella pneumophila*Inmaculada Solís^{1*}, M^a Carmen Ballester¹, Begoña Bedrina Broch², Guillermo Rodríguez Albalat²¹ Iproma, S.L.; ² Biótica, S.L.

En el presente trabajo se ha identificado una interferencia dependiente del estado de agregación del patógeno *Legionella pneumophila* cuando se utilizan técnicas moleculares para su detección. Se ha utilizado un test de captura inmunomagnética y enzimoimmunoensayo (CEIA) y se ha realizado una comparación con el método de cultivo siguiendo lo establecido en la norma UNE-ISO 11731:2007. Diferentes muestras de agua, artificial y naturalmente contaminadas, se ensayaron tanto por el test como por el cultivo. Una disminución de la inmuno-detectabilidad de *L. pneumophila* se obtuvo para las muestras en que se había realizado una inoculación utilizando el microorganismo cultivado en medio sólido, mientras que para recuentos similares, la inmuno-detectabilidad en las muestras inoculadas con el mismo organismo no cultivado en medio sólido fue mayor. Esto sugiere una desviación negativa causada por la agregación de las células bacterianas (*clusters*) inducida por su crecimiento en un medio artificial y la producción de biopelículas consistentes que dificultan su dispersión y reducen la interacción con los anticuerpos inmovilizados sobre partículas magnéticas.

El primer efecto detectado es una disminución de la detectabilidad ya que la tasas de detección va a depender de la cantidad de antígenos expuestos y esta cantidad se ve disminuida cuando hay efectos de agregación. El siguiente efecto es la obtención de una interacción débil entre la partícula inmunomagnética y la bacteria, lo que aumentará el riesgo de liberación de la célula durante el ensayo. Si el tamaño de los pellets es suficientemente grande, el complejo del pellet de células con partículas magnéticas puede no ser retenido por el imán. El fenómeno se da sólo al utilizar muestras artificialmente contaminadas si el inóculo es un "bio-pellet" preparado por el crecimiento de las células en medio rico. Si esta desviación no se considera en los procedimientos de validación, los parámetros de rendimiento de nuevas técnicas en comparación con el método de cultivo pueden ser subestimados. En este estudio se proponen algunas soluciones simples para reducir los efectos no deseados y procurar una verificación correcta de tests moleculares.

NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DIRECTA DE *Aeromonas* spp. EN MUESTRAS DE AGUA

Fadua Latif*, Roxana Beaz-Hidalgo, Carolina Silvera, María José Figueras.

Unidad de Microbiología, IISPV, URV, Reus.

Las especies del género *Aeromonas* son consideradas autóctonas del medio acuático, por lo que están ampliamente distribuidas en el medio ambiente, pudiéndose aislar además a partir de peces enfermos, diversos tipos de alimentos y en muestras clínicas. Hoy en día las *Aeromonas* son consideradas patógenos emergentes en seres humanos, pudiendo afectar tanto a individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Las principales formas de adquirir infecciones asociadas a *Aeromonas*, son el contacto de heridas abiertas con agua y el consumo de agua contaminada, de ahí la importancia de detectar de forma rápida y fiable estos microorganismos. Su detección e identificación mediante métodos convencionales es laboriosa y depende de la utilización de medios de enriquecimiento y selectivos y de la confirmación de las colonias sospechosas mediante identificación bioquímica y molecular. En este estudio se evaluó la utilización de la amplificación por PCR de la GCAT (Glicerofosfolípido Colesterol Acetil Transferasa) para determinar de forma rápida la presencia de estas bacterias en muestras de agua. La GCAT es un marcador específico del género *Aeromonas*, hasta ahora utilizado sólo para identificar cultivos puros.

Se analizó la presencia de *Aeromonas* en 19 muestras de agua (12 de río, 2 de mar y 5 de una depuradora) y se comparó el método clásico de cultivo con la detección directa de la GCAT en el ADN extraído de muestra con y sin enriquecimiento. Sólo 17 (89,5%) de las 19 muestras fueron positivas tanto por cultivo como por la GCAT-PCR tras el enriquecimiento. Sin embargo, sólo 4 (23,5%) de las muestras sin enriquecimiento resultaron ser positivas para la GCAT. Estos resultados indican que el paso de enriquecimiento es fundamental para la detección y aislamiento de *Aeromonas* y que la GCAT-PCR es una herramienta rápida y fácil para determinar la presencia de estos microorganismos en agua.

DEFENSA DEL MÉTODO P/A CON LOS KITS DE MICROKIT® PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS OFICIALES DE AGUAS, MEDIANTE DATOS INTERCOMPARATIVOS

Jorge Sanchis Solera. Laboratorios MICROKIT®, S.L. Apdo.44, 28210-Madrid

El método Presencia/Ausencia triunfa en análisis microbiológicos “de campo” desde la segunda guerra mundial. Gracias a los kits desarrollados por MICROKIT®, desde hace dos décadas, también triunfa en numerosos laboratorios de todo el mundo que aprecian no sólo su comodidad, sino sobre todo su efectividad, que es incluso mayor que la del método oficial de recuento de coliformes, *E.coli*, enterococos fecales, *Clostridium perfringens* y sus esporas, así como en otros parámetros del agua como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophila*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, algas, cianobacterias, levaduras y mohos (Sanchis 1,2,3,4,5; ielab 6). La única limitación del método P/A es obviamente el parámetro “recuento de aerobios”.

Sin embargo los estamentos oficiales de muchos países, incluidos los de la UE, siguen empeñados en legislar, por pura inercia histórica de métodos, que los métodos oficiales de búsqueda de patógenos sean de recuento (Filtración de membrana o NMP) incluso para luego exigir que el recuento sea 0 ufc/100 ml. Y algunos hasta creen razonable afirmar que eso no es equivalente a “ausencia” (como si en microbiología existiesen fracciones decimales de células y “cero” no fuese idéntico a “ausente”), exigiendo inviables estudios de equivalencia entre un método cuantitativo y uno cualitativo. Lo cual impide que el método P/A triunfe al nivel que debería, a pesar de que se ha demostrado no sólo como más fácil de emplear e interpretar por cualquier usuario, sino además como más robusto y seguro en aguas de consumo humano, de bebidas envasadas y de baño (continentales). Todo ello provoca que este método esté viendo limitada su aplicación al *screening* negativo de muestras primarias que resulten negativas, que no es poco; el problema es que muchos laboratorios parecen no saber que pueden usarlo así y, sólo en los casos positivos, confirmar la muestra con métodos oficiales de recuento. Lo que les ahorraría muchísimo tiempo, trabajo y dinero. Se ha puesto de moda en muchos países emplear métodos miniaturizados de NMP como *screening* negativo de muestras primarias, pero si los laboratorios sustituyeran dichos métodos por el método P/A, ahorrarían aún mucho más tiempo, trabajo y dinero, sin renunciar lo más mínimo a una máxima efectividad de sus análisis (exactitud, precisión y rango inferior “traducidas” a sensibilidad, especificidad y límite de detección).

Aportamos los últimos datos de que disponemos comparando Filtración de membrana (MF), NMP y el método P/A, que sumados a la bibliografía preexistente antes mencionada, deberían ser más que suficientes ante inspectores y auditores.

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES ORALES

Por un lado, en un estudio comparativo de muestras naturales amablemente cedido y realizado en 2011 por el Dr. Antonio Doménech-Sánchez de Saniconsult Ibérica S.L, de Palma de Mallorca y del Área de Microbiología e Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS) de la Universidad de las Islas Baleares, se observa la similitud de resultados entre el método NMP QuanyTry de Idexx y los kits P/A de MICROKIT® para coliformes y *E.coli*. Las únicas 4 discrepancias de 70 muestras comparadas para coliformes aparecen en recuentos mínimos y se corresponden a 3 muestras (4,3%) con ausencias P/A y que con NMP se obtiene 1 ufc/100 ml; y a 1 muestra (1,4%) con presencia P/A y que con NMP se obtiene < 1 ufc, de modo que si se tomase este método NMP como referencia (al estar oficialmente autorizado por Sanidad), el método P/A obtendría para coliformes una sensibilidad del 95,7% y una especificidad del 98,6%. La única discrepancia de 70 muestras comparadas para *E.coli* aparece en una sola muestra (1,4%) con recuento NMP mínimo de 2 ufc/100 ml y ausencia por P/A, de modo que si se tomase el método NMP como referencia, el método P/A obtendría para *E.coli* una sensibilidad del 98,6% y una especificidad del 100%. Aún así, dado que estas discrepancias sólo se dan en los valores mínimos de recuento, afirma el autor del estudio que es muy probable que se deban a diferencias en la toma de la alícuota más que a diferencias del método (en ambos parámetros: coliformes y *E.coli*).

Por otra parte, siguiendo con nuestros estudios comparativos entre el método P/A y el método oficial de Filtración de membrana (MF), con los datos obtenidos en nuestros servicios intercomparativos SEILAGUA®, en este caso con los datos recopilados desde nuestra última publicación al respecto (1-2009) hasta el momento de la redacción de esta ponencia (4-2012) podemos observar, independientemente de los medios empleados (ya que nuestro objetivo es sólo comparar ambos métodos) y teniendo en cuenta o no cada servicio como un suceso independiente de los demás, en los 1.236 resultados comparados:

No es objetivo de este estudio confirmar el límite inferior de cuantificación/límite de detección de ambos métodos, ya demostrado en anteriores estudios, pero según los valores-inóculo de cada servicio, se demuestra que ambos métodos siguen teniendo en la mayoría de laboratorios un valor adecuado para este parámetro. Curiosamente, los 4 participantes de SEILAGUA® que usan P/A Colilert y P/A DRCM (kits P/A de otras marcas ajenas

Microorganismo	MÉTODO MF			MÉTODO P/A MICROKIT®		
	FALSOS +	FALSOS -	EFICACIA	FALSOS +	FALSOS -	EFICACIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13,5-14,4%	32,9-26,2%	76,8-79,7%	0%	0%	100%
<i>Burkholderia cepacia</i>	12,5-16,7%	44,4-40,0%	71,5-71,6%	0%	0%	100%
<i>Legionella pneumophila</i>	10,5-10,4%	68,2-70,1%	60,6-59,7%	0%	0%	100%
<i>Legionella spp</i>	7,4-8,3%	78,1-80,6%	57,2-55,5%	0%	28,6-25,0%	85,7-87,5%
<i>Staphylococcus aureus</i>	28,6-27,5%	34,8-32,3%	68,3-70,1%	0%	0%	100%
<i>Escherichia coli</i>	21,1-19,8%	9,0-8,6%	84,9-85,8%	7,1-7,7%	0%	96,5-96,1%
Coliformes totales	42,6-41,2%	21,3-21,2%	68,0-68,8%	0%	8,33-10,0%	95,8-95,0%
Enterococos fecales	60,4-57,1 %	5,7-5,9%	67,0-68,5%	16,6-20,0%	3,0-4,8%	90,2-87,6%
<i>Clostridium perfringens</i>	22,5-22,0%	46,3-49,0%	65,6-64,5%	4,8-6,7%	48,0-42,9%	73,6-75,2%

a MICROKIT®) obtienen resultados muy aberrantes, con eficacias por debajo del 50%, por lo que hay que elegir bien el medio/marca del kit P/A para tener la seguridad de que los resultados serán satisfactorios.

Por muy incómodo que resulte aceptarlo, vuelve a quedar patente que la robustez de indicadores como *E.coli*, coliformes totales, enterococos fecales o *C.perfringens* de patógenos como *Legionella* (incl. *L.pneumophila*), *B.cepacia*, *S.aureus* y *P.aeruginosa* queda en entredicho con el sistema de filtración de membrana; no así con el método P/A con kits de MICROKIT® (algo menos, según estos últimos datos, para *Legionella spp.* y para *C.perfringens*, aunque en ellos la detección P/A sigue siendo más cercana a la realidad que el recuento MF). Por

todo ello, proponemos el uso de los kits P/A de MICROKIT® como el más cómodo, económico y eficiente método de screening negativo de muestras.

- 1: 11/1999: Estudio Intercolaborativo sobre el **método de Presencia/Ausencia** en el análisis microbiológico de aguas. XII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Oviedo, 9/2000. Se recomienda este método mejor que la Filtración de Membrana y que el método del Número Más Probable, siempre que no se requiera recuento, por su mejor sensibilidad, economía y fácil uso.
- 2: 6/2003: **Validación P/A** Intercolaborativa e Intercomparativa. Técnicas Laboratorio. El método más sensible en agua para *E.coli*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y hasta 5 veces más sensible que el método de Filtración de membrana entre los 11 parámetros microbiológicos comparados.
- 3: 5/2006: **Validación microbiológica de los Kits P/A MICROKIT®** frente a la Filtración de Membrana en el servicio intercomparativo SEILAGUA®, mediante una novedosa hoja de cálculo. Técnicas de Laboratorio-312.
- 4: **03-2009: VALIDACION COLIFORMES Y E.coli EN MICROBIOLOGÍA DE AGUAS.** Validación y estudio de equivalencia de MUGPLUS Agar y MCC P/A Broth en aguas. 7 pp. MICROKIT® 31-Marzo-2009
- 5: **07-2009: VALIDACION MICROBIOLOGÍA DE AGUAS.** Validación de análisis de aguas. 11 pp. MICROKIT® 09-Julio-2009
- 6: **07-2011: VALIDACIÓN DEL CLOSTRICULT P/A.** Estudio intercolaborativo entre 12 laboratorios acreditados ISO17025, para el parámetro *Clostridium perfringens* en aguas, coordinado por ielab, que compara este kit con el método de filtración de membrana con m-CP Agar, TSC Agar y TSCMUP Agar, y demuestra que el Clostricult P/A es el más sensible, específico, eficaz, concordante y conforme. Estudios previos de MICROKIT® prueban que también es el que detecta desde el más bajo límite de detección.

DETECCIÓN DE *BIFIDOBACTERIACEAE* ESPECÍFICAS DE HUÉSPED APROPIADAS PARA MICROBIAL SOURCE TRACKING MEDIANTE QPCR MOLECULAR EN TIEMPO REAL

Marta Gómez-Doñate^{1*}, Elisenda Ballesté¹, Maite Muniesa¹ y Anicet R. Blanch¹

¹Depto. de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona.

Bifidobacterium spp. pertenece a la microbiota intestinal comensal de los animales de sangre caliente. Algunas cepas de *Bifidobacterium* muestran especificidad con el huésped y por ello han sido propuestas como indicadoras específicas de huésped para determinar el origen de la contaminación fecal (MST, *Microbial Source Tracking*). Algunas cepas de *Bifidobacterium* spp. han sido utilizadas en estudios de MST basados en métodos dependientes de cultivo. Aunque algunos de estos avances han demostrado ser muy útiles, la baja prevalencia de *Bifidobacterium* cultivables en el ambiente implica que los métodos moleculares independientes de cultivo pueden aportar aplicaciones prácticas en MST. En este estudio se han diseñado diversas qPCRs específicas para detectar *Bifidobacterium* spp. asociadas a un huésped, que pueden ser usadas para determinar la fuente de la contaminación fecal (humano, bovino, porcino y aviar). A partir de la visualización en los geles de DGGE de las bandas predominantes de los amplificadores del 16SrDNA por PCR obtenidos de las cepas de *Bifidobacterium* de cada origen fecal, se diseñaron un par de cebadores y 4 sondas Taqman, cada una para detectar cada origen de contaminación. Las reacciones de qPCR fueron testadas con 25 muestras de agua de diverso origen: agua residual urbana, agua residual de cuatro mataderos (porcino, bovino y aviar) y agua de río con menor carga de contaminación fecal. Los resultados indican que las diferentes reacciones de qPCR mostraron un alto grado de especificidad de huésped. No se observaron reacciones cruzadas entre los cebadores y las sondas. Sobre la base de estos resultados, se concluye que estas herramientas son suficientemente robustas para ser aplicadas en estudios ambientales de MST.

DESARROLLO DE UNA ONE-STEP RT-PCR CUANTITATIVA CUÁDRUPLEX PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A, NOROVIRUS GI Y GII Y MENGOVIRUS

Cristina Fuentes*, Nerea Beguiristain, Rosa M. Pintó y Albert Bosch

Grupo de Virus Entéricos. Depto. de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona

El virus de la Hepatitis A (HAV) y los Norovirus genogrupo I (NoV GI) y genogrupo II (NoV GII) son importantes agentes causantes de enfermedades de transmisión por agua y alimentos. En este estudio se presenta un ensayo de RT-PCR cuantitativa en formato cuádruplex para la detección y cuantificación simultánea de estos tres virus juntamente con el virus Mengo, siendo este último un virus utilizado como control para la determinación de la eficiencia del proceso de extracción del virus y de su RNA. Además de dicho control, en el ensayo cuádruplex presentado también se incluyen transcritos correspondientes a cada uno de los virus como controles externos para la determinación de la eficiencia de la reacción enzimática, permitiendo de esta manera corregir los datos crudos y obtener una cuantificación más precisa de la carga vírica de las muestras.

El ensayo ha sido validado en comparación a los correspondientes ensayos en formato monoplex adoptado por el Comité Europeo de Normalización (CEN) de la Dirección General Sanco de la UE, obteniendo resultados muy similares en ambos formatos con diluciones seriadas tanto de los RNAs víricos como de los plásmidos con las correspondientes secuencias diana utilizados para la construcción de las curvas estándar. Además, se han testado muestras de agua procedentes de distintos puntos de una planta de tratamiento de aguas así como una muestra de agua de un depósito asociada a un brote de NoV en Girona en 2011. En general se observa una buena concordancia entre ambos formatos de RT-PCR, tanto en los datos brutos como en los datos corregidos con las eficiencias de extracción y de la reacción de RT, incluso con bajos niveles de carga viral. Así pues, la RT-PCR cuádruplex presentada resulta una herramienta de gran utilidad para la cuantificación de HAV y NoV en muestras de agua debido a la reducción en tiempo y costes respecto a los correspondientes formatos monoplex.

PCR DIAGNÓSTICA PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS MARINOS

P. García-González*, N. García-Lamas, A. Vizcaíno-Hermida, S. González-González e Y. Santos

Dto. Microbiología y Parasitología, Ed. CIBUS-Fac. de Biología, Univ. De Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela (A Coruña), España.

La industria de la acuicultura se ha desarrollado considerablemente en las últimas décadas y es, hoy en día, uno de los sectores del mundo de más rápido crecimiento en la producción de alimentos. Como ocurre en otras áreas de producción animal, las enfermedades infecciosas son un peligro siempre presente en la acuicultura, con el potencial de causar graves pérdidas en los lotes o reducir el valor comercial del pescado como alimento para los seres humanos.

La disponibilidad de métodos fiables para la detección e identificación de bacterias patógenas es fundamental para el establecimiento de medidas de control, con el fin de eliminar o reducir el impacto de las enfermedades de los peces en cultivo. El objetivo principal de este estudio ha sido el desarrollo de métodos moleculares para la detección de bacterias patógenas de peces marinos cultivados en Galicia, que permitirá un diagnóstico rápido de una de las principales enfermedades que afectan la producción acuícola como es la tenacibaculosis.

COMPARACIÓN DE LOS METODOS DE MEDIDA DE CONCENTRACION DEL ARNbc PARA LA qPCR DEL AQUABIRNAVIRUS IPNV

Diego Vázquez*, Juan M. Cutrín, Carmen López-Vázquez, Isabel Bandín y Carlos P. Dopazo

Instituto de Acuicultura Dpto. de Microbiología y Parasitología, Campus Vida, USC

Uno de los puntos críticos de la qPCR es la hora de obtener resultados precisos y reproducibles cuando se trabaja con virus de ARNbc como el aquabirnavirus IPNV, es la fiabilidad de la medida de la concentración de ácido nucleico tras su extracción. Las directrices de la guía MIQE recomiendan varios procedimientos de cuantificación, los cuales requieren un material genómico de referencia que haya sido certificado; sin embargo, ninguno de ellos ofrece un estándar de ARNbc, puesto que, hoy en día, no se comercializan estándares de este tipo. En el presente estudio, hemos realizado un análisis comparativo entre los sistemas de medición propuestos por la guía MIQE, con el fin de obtener mayor información de cuál aporta mediciones más precisas de la concentración de ARNbc de IPNV.

Hemos comparado la concentración obtenida con espectrofotometría (NanoDrop, Thermo Scientific), análisis en sistemas de microfluidos (Bioanalyzer, Agilent Technologies) y detección mediante fluoróforos intercalantes (RiboGreen, Molecular Probes). Como ácido nucleico de referencia hemos empleado ARNbc extraído de virus purificado y ADN de dos plásmidos de longitud semejante a los dos segmentos genómicos del virus. Los resultados obtenidos mostraron alta repetibilidad (CVs < 10%), aunque los datos de reproducibilidad no fueron tan buenos (CVs ≈ 20%). La mayor sensibilidad se obtuvo con el método RiboGreen con el estándar de ADNbc; sin embargo a concentraciones inferiores a 0,1 ng/μl se aprecian fallos en reproducibilidad. Además, se han obtenido diferencias de concentración cercanas a un logaritmo entre los distintos métodos de cuantificación ensayados. En base a nuestros resultados se deduce que no es prudente comparar datos de concentración de ácido nucleico obtenidos con los diferentes métodos de medición. En la actualidad estamos trabajando en la síntesis de ARNbc de ambos segmentos, a partir de la secuencia genómica viral, obtenidos mediante transcripción *in vitro*, para disponer de un estándar más realista y reproducible. Esperamos demostrar que con este tipo de estándar de referencia mejore la fiabilidad de las cuantificaciones de ARNbc.

DESARROLLO DE UN NUEVO ENSAYO T-RFLP PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES DE VIRUS QUE INFECTAN MICROALGAS

Anna Carratala^{1,2*}, Jérémie Garnodier¹, Manon Denjean¹, Camille Clerissi¹ y Yves Desdevises¹.

¹ UPMC Université Paris 06, UMR 7232, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France y ² Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

Los virus marinos son los microorganismos más abundantes (10^6 - 10^9 partículas víricas/ml) en los océanos representando la mayor diversidad genética conocida. Entre ellos, los prasinovirus infectan 3 géneros de microalgas abundantes en las zonas eufóticas oceánicas (*Ostreococcus*, *Bathycoccus* y *Micromonas*), ejerciendo un papel ecológico importante. Hasta la fecha, no existe un método simple, rápido y poco costoso que permita estudiar la diversidad y realizar seguimientos espacio-temporales de las comunidades de virus de picoeucariotas acuáticos. En este trabajo, describimos un nuevo ensayo "Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism" (T-RFLP) para el estudio de prasinovirus en el medio acuático. Para ello, se desarrollaron dos pares de cebadores degenerados para la detección específica de prasinovirus mediante ensayos de PCR amplificando una región de la DNA polimerasa (dpol) o la proteína mayor de la cápside (MCP) respectivamente. La especificidad de los cebadores se comprobó analizando 4 aislados virales pertenecientes a la familia *Phycodnaviridae* así como ácidos nucleicos de los huéspedes de los virus de interés, obteniendo resultados negativos en todos los casos. Para el análisis de T-RFLP, se seleccionó las enzimas de restricción en función de su capacidad de discriminación entre los distintos "Operational Taxonomic Units" (OTUs), descritos *in silico* alineando las secuencias de 5 prasinovirus disponibles en Genbank. La capacidad de discriminación entre OTUs de prasinovirus de la técnica desarrollada se comprobó, comparativamente, analizando 10 especies de prasinovirus obtenidos mediante cultivo celular y prasinovirus aislados a partir de muestras recolectadas en 3 puntos distintos del Golfo de Lion (dos lagunas y una estación de muestreo marina costera). La técnica desarrollada representa un avance técnico relevante para el estudio de la diversidad y las dinámicas de las comunidades de prasinovirus en el medio acuático.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL COMPONENTE C3 DEL COMPLEMENTO DE RODABALLO (*Psetta maxima*)

S. González-González*, A. Díaz-Gómez, N. García-Lamas, P. García-González e Y. Santos

Dto. Microbiología y Parasitología, Ed. CIBUS-Fac. de Biología, Univ. De Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela (A Coruña), ESPAÑA.

Al igual que otros animales vertebrados, los peces tienen una serie de mecanismos específicos (inmunidad adquirida) e inespecíficos (inmunidad innata) que actúan de forma complementaria con el fin de proteger al organismo de agentes patógenos.

Los mecanismos de defensa inespecíficos, presentes en todos los seres vivos desde su nacimiento, están formados por componentes celulares y humorales que se activan en respuesta a propiedades químicas inherentes al agente agresor. En los peces el sistema del complemento constituye el factor humoral más importante dentro de la inmunidad innata y puede ser activado a través de la vía clásica o dependiente de anticuerpo y las vías alternativa y de las lectinas o independientes de anticuerpo. El complemento de los peces presenta una menor temperatura de reacción, un mayor efecto antimicrobiano, más específico de especie y grupo que el de los mamíferos. El componente C3 del complemento juega un papel fundamental en todos los procesos de activación, por esto es el componente mejor caracterizado. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otras especies de peces, en rodaballo este componente no ha sido aún estudiado. El presente estudio describe el proceso de optimización del método de purificación del componente C3 del complemento de rodaballo así como su caracterización parcial.

ANÁLISIS POR MALDI-TOF MS DE CEPAS DE LA FAMILIA *VIBRIONACEAE* DEPOSITADAS EN LA CECT

M. Amparo Ruvira*, M. Carmen Macián, Esperanza Garay, David R. Arahal

Dpto. de Microbiología y Ecología, y Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universitat de València, 46100 Burjasot, Valencia.

MALDI-TOF MS (*Matriz Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) es una técnica de ionización suave usada en espectrometría de masas para el análisis de biomoléculas. En taxonomía microbiana, esta técnica es aplicada a un extracto bacteriano para la determinación de las proteínas que se expresan constitutivamente (principalmente proteínas ribosomales). El perfil generado permite discriminar entre especies cercanamente relacionadas, permitiendo, incluso, la clasificación en algunos géneros a nivel de subespecie. Además, algunos autores han estudiado su alta capacidad discriminatoria en comparación con el análisis de secuencia del gen 16S rRNA, sugiriendo que MALDI-TOF MS posee una mayor precisión para la identificación de determinadas especies microbianas. Por esta razón, y debido a su alta reproducibilidad, fácil manejo y bajo coste, esta técnica se convierte en una herramienta muy útil para la identificación y autenticación.

En este trabajo se han estudiado 76 cepas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo: 3 de *Aliivibrio*, 4 de *Enterovibrio*, 1 de *Grimontia*, 10 de *Photobacterium*, 1 de *Salinivibrio* y 58 del género *Vibrio*. Los espectros generados se han analizado mediante el software Biotyper 1.0 (Bruker Daltonics), y el resultado obtenido se ha comparado con otras técnicas empleadas en taxonomía.

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7, 2007-2013), Research Infrastructures action, under the grant agreement No. FP7-228310 (EMbaRC project); and from Generalitat Valenciana (PROMETEO/2012/040).

ANÁLISIS MULTILÓCICO DEL CLADO 'MEDITERRANEI' DEL GÉNERO *VIBRIO*, BASADO EN SECUENCIAS PARCIALES DE LOS GENES 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*, *mreB* y *pyrH*

Eva Tarazona*, T. Lucena, D. R. Arahal, M. C. Macián, E. Garay y M. J. Pujalte.

Dpto. de Microbiología y Ecología, y Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universitat de València, 46100 Burjasot, Valencia.

Se han estudiado sesenta y una cepas identificadas presuntivamente como *Vibrio mediterranei* o *Vibrio 'shilonii'*, procedentes de muestras marinas (agua, sedimento, bivalvos, crustáceos, peces y corales) de distintas zonas geográficas (Mediterráneo este -Israel- y oeste -costa de Valencia-, Atlántico -costa de Galicia- y Pacífico -costa mejicana), que abarcan aislados de tres décadas (1981-2008).

Los análisis preliminares efectuados con los genes 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*, *mreB* y *pyrH* han permitido hasta el momento llegar a las siguientes conclusiones: a) la identificación presuntiva mediante GTG₅ produce un número de errores inaceptable, ya que la cuarta parte de los aislados identificados por este método de 'fingerprinting' no se corresponden con la especie ni el clado; b) no se observa apenas separación apreciable, ni siquiera a nivel subespecífico, entre *V. 'shilonii'* y *V. mediterranei*, en consonancia con los datos previos basados en DDH y fenotipo; c) por el contrario la diversidad interna del clado y la aparición de, al menos, un subclado marginal bien definido hace sospechar la existencia de posibles nuevas especies; y d) existe una estrecha relación entre las cepas de *V. mediterranei* en sentido estricto, sin que se aprecie una distribución diferenciada según el origen geográfico (Mediterráneo, Atlántico, Pacífico), la época de aislamiento o el hospedador.

Estudio financiado a través de los proyectos CGL2010-18134/BOS y PROMETEO/2012/040

Conferencia de clausura

HERRAMIENTAS GENÓMICAS PARA LA DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA DE MEDIOS ACUÁTICOSFrancisco Rodríguez-Valera¹¹ Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 San Juan de Alicante

La secuenciación de DNA de alto rendimiento ha abierto nuevas vías de investigación en Microbiología. Pueden secuenciarse comunidades enteras sin necesidad de cultivar sus componentes y sin preocuparse de cebadores de PCR y sus sesgos. Es una aproximación holística en el sentido de que se describe (o al menos se intenta) a la población microbiana completa y sus interacciones entre sí y con el ambiente. La metagenómica y, más recientemente la genómica de células individuales (single-cell genomics) son sus principales exponentes. En ambos casos se generan cantidades enormes de datos que requieren de una base bioinformática sustancial. Aunque hay formas de simplificar este problema. Por ejemplo, en el caso de metagenomas colapsando las lecturas individuales en “contigs” ensamblados. El estudio de ambientes acuáticos por estas vías es muy apropiado por la naturaleza relativamente homogénea que tienen y la facilidad de recuperar distintas fracciones de la microbiota por filtración selectiva. Se comentarán algunos ejemplos de la información que se puede obtener con estas tecnologías y de sus limitaciones. Incluyendo trabajos que hemos realizado en el Mar Mediterráneo, el Río Amazonas y las salinas solares.