

**VII Reunión Científica**  
**Microbiología del Medio Acuático**

**programa - resúmenes**



**Bilbao, 25, 26, 27 septiembre 2008**



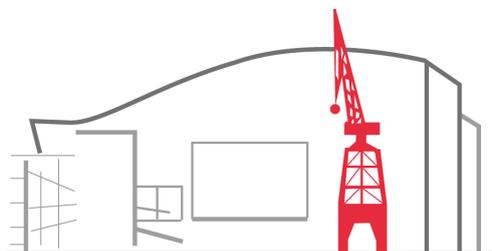




**VII Reunión Científica**  
**Microbiología del Medio Acuático**

Sociedad Española de Microbiología

**programa - resúmenes**



**Bilbao 2008**



VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

---

Editado por J. Iriberry y B. Ayo

Dpt. Inmunología, Microbiología y Parasitología

Facultad de Ciencia y Tecnología

Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea UPV-EHU

© De los autores

ISBN: 978-84-691-4565-4

Depósito legal: BI-2073-08

Septiembre de 2008

Diseño: Ana Undurraga



## Comité Organizador

Presidente      Juan Iriberry

Miembros      Isabel Barcina  
                    Begoña Ayo  
                    M<sup>a</sup> Antonia Unanue  
                    Itxaso Artolozaga  
                    Iñigo Azúa  
                    Alicia Muela  
                    Inés Arana

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea UPV-EHU  
Apdo. 644  
E-48080 Bilbao



## Comité Científico

Presidente	Albert Bosch (Universidad de Barcelona)
Miembros	Juan Luis Barja (Universidad de Santiago)
	Juan José Borrego (Universidad de Málaga)
	Alejandro De La Sota (Consortio de Aguas Bilbao Bizkaia)
	M <sup>a</sup> José Figueras (Universidad Rovira i Virgili)
	Esperanza Garay (CECT, Universidad de Valencia)
	Ricardo Guerrero (Universidad de Barcelona)
	Joan Jofre (Universidad de Barcelona)
	Teresa Pérez Nieto (Universidad de Vigo)
	Sara Isabel Pérez Prieto (CIB, CSIC, Madrid)
	Francisco Ruiz Berraquero (Universidad de Sevilla)
	Inmaculada Solís (IPROMA S.L., Castellón)
	Antonio Ventosa (Universidad de Sevilla)

## Secretaría Técnica

Naiara Ruiz  
Viajes Iberia, Campus de Leioa UPV-EHU  
leioa.upv\_ehu@viajesiberia.com  
Tel: 94 463 3157



## Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de las siguientes instituciones y entidades:

Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea UPV-EHU  
[www.ehu.es](http://www.ehu.es)

Consejería de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco  
[www.ejgv.euskadi.net](http://www.ejgv.euskadi.net)

Ministerio de Ciencia e Innovación  
[www.micinn.es](http://www.micinn.es)

Diputación Foral de Bizkaia-Bizkaiko Foru Aldundia  
[www.bizkaia.net](http://www.bizkaia.net)

Ayuntamiento de Bilbao  
[www.bilbao.net](http://www.bilbao.net)

Consortio de Aguas Bilbao Bizkaia  
[www.consorciodedeaguas.com](http://www.consorciodedeaguas.com)

SUL Suministro Urgente al Laboratorio S.A.L., Trapaga, Bizkaia  
[sul@sul1.com](mailto:sul@sul1.com)

Itsas Natura, Oiartzun, Gipuzkoa  
[www.itsasnatura.com](http://www.itsasnatura.com)

AZTI-Tecnalia  
[www.azti.es](http://www.azti.es)

Proquinorte S.A., Bilbao, Bizkaia  
[www.proquinorte.com](http://www.proquinorte.com)

Caja Laboral-Euskadiko Kutxa  
[www.cajalaboral.es](http://www.cajalaboral.es)

Sociedad Española de Microbiología  
[www.semico.es](http://www.semico.es)





## PRESENTACIÓN

En la pasada VI Reunión de Microbiología del Medio Acuático de la Sociedad Española de Microbiología (SEM), celebrada en Valencia en 2006, se nos encomendó la organización de la presente reunión.

En mi nombre y en el de los miembros del Comité Organizador, os damos la más cordial bienvenida a Bilbao para celebrar la VII Reunión Científica de Microbiología del Medio Acuático Bilbao-2008.

Ya han pasado 12 años desde que nos reunimos por primera vez en Málaga en 1996, dando forma a lo que hoy en día podemos afirmar es un Grupo especializado de la SEM consolidado y caracterizado por su actividad y buen hacer. Los responsables han sido no solo las numerosas personas que han formado parte de sus directivas sino principalmente sus miembros, tanto los investigadores senior y especialmente los jóvenes, como los trabajadores de la microbiología del agua que se encuentran en empresas e instituciones. Algo también han tenido que ver en la calidad del Grupo nuestras reuniones bianuales, donde hemos podido discutir nuestro trabajo en un ambiente siempre amable. Nuestro reconocimiento a los equipos organizadores de las anteriores reuniones de Málaga-1996 Juan J. Borrego, Girona-1998 Carles Abellá, Santiago-2000 Juan L. Barja, Sevilla-2002 Antonio Ventosa, Tarragona-2004 M<sup>a</sup> José Figueras y Valencia-2006 Esperanza Garay.

La Microbiología del agua como disciplina ha experimentado en las últimas tres décadas un cambio casi revolucionario así como un crecimiento exponencial. La estrategia y los nuevos métodos han sido los principales protagonistas del cambio. Cambio que ha afectado a las distintas áreas que se recogen en nuestras reuniones, desde la biodiversidad, pasando por la contaminación y la patología en acuicultura, hasta la visión integradora de la ecología microbiana acuática. También la estrategia y el método han propiciado un enorme cambio positivo en la ciudad que hoy es sede de nuestra VII Reunión, Bilbao. Esperamos y deseamos que Bilbao se muestre tranquila y amable, tal y como es habitual, para que disfrutéis de una reunión agradable.

Hemos procurado organizar la reunión manteniendo su estructura en cuanto a la distribución de sesiones científicas, incluyendo además una conferencia inaugural a cargo del Dr. Josep M. Gasol del Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona, la ponencia correspondiente al premio a la mejor tesis doctoral a cargo de la Dra. Ana I. Mata y la asamblea plenaria del Grupo. También mantenemos como único modo de transmisión la exposición oral y en sesión única. Dada la buena acogida de la reunión, el número de trabajos es importante, por lo que confiamos en el respeto de los tiempos asignados a cada



ponencia. La única novedad que nos hemos permitido introducir, es la concesión de un premio al mejor trabajo presentado en cada una de las cinco sesiones temáticas. Los premios consisten en una modesta cantidad de 200,00 € y un diploma acreditativo, y serán resueltos por los miembros del Comité Científico de la reunión.

Por último, queremos expresar nuestro agradecimiento a todas aquellas instituciones, entidades, empresas y personas que, de forma entusiasta, han apoyado este proyecto y han colaborado económicamente en él. Sin su apoyo y su ayuda no hubiera sido posible la reunión que os ofrecemos. Nuestro deseo a partir de ahora es que vuestra participación sea activa y que veáis alcanzados vuestros objetivos en un ambiente acogedor.

Juan Iriberry



## **INFORMACIÓN GENERAL**

### **Sede del Congreso**

La Reunión se celebrará en el Palacio de Congresos y de la Música Euskalduna Jauregia, en la avenida Abandoibarra nº 4. Todas las sesiones, apertura, inaugural, científicas, premio, asamblea, tendrán lugar en la Sala A4, a la cual se accede desde el hall general de exposiciones por la entrada de Abandoibarra.

### **Inscripción y recogida de documentación**

Se podrá realizar el jueves 25 de Septiembre de 9:00 a 12:00 en el hall de exposiciones, cerca de la entrada de la sala A4, así como en las pausas café a lo largo de la reunión.

### **Preparación de las sesiones científicas**

Los ponentes que no hayan enviado por correo electrónico sus presentaciones, deberán ponerse en contacto con la persona responsable del sistema de proyección con antelación suficiente. Se dispondrá de cañón de proyección con ordenador portátil formato PC. Como soporte informático se recomienda el uso de memorias USB (pendrive).

### **Premios a los mejores trabajos presentados**

Se concederá un premio al mejor trabajo presentado en cada una de las cinco sesiones temáticas que se abordan en la reunión. Los premios están dotados con 200,00 € y diploma acreditativo, y serán resueltos por miembros del Comité Científico.

### **Comidas de trabajo**

Se ofrecen con la inscripción dos comidas de trabajo para los días 25 y 26 de Septiembre en el restaurante Jauregia situado en las propias instalaciones del Palacio de Congresos y de la Música Euskalduna.

### **Programa social**

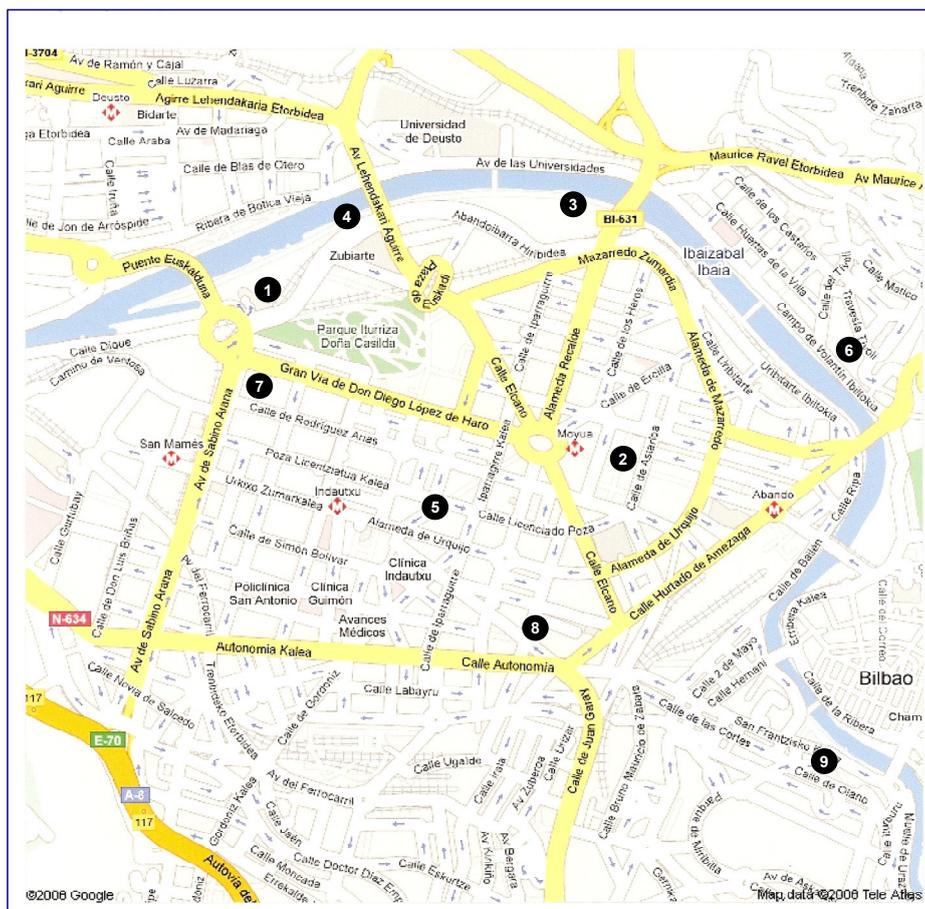
Recepción de Bienvenida, el jueves 25 de Septiembre, en el Palacio de la Diputación Foral de Bizkaia, Gran Vía de Diego López de Haro nº 25, a las 20:00.

Visita guiada al Museo Guggenheim Bilbao, el sábado 27 de Septiembre a las 18:30, duración estimada una hora y media.

Cena de Clausura, el sábado 27 de Septiembre a las 21:30 en el Hotel Sheraton Bilbao, calle Lehendakari Leizaola 29, cercano al Museo Guggenheim Bilbao y a la sede del congreso.



## PLANO DEL CENTRO DE BILBAO



- 1 Palacio de Congresos y de la Música Euskalduna
- 2 Palacio de la Diputación Foral de Bizkaia
- 3 Museo Guggenheim Bilbao
- 4 Hotel Sheraton
- 5 Hotel Ercilla
- 6 Hotel Barceló Nervión
- 7 Hotel Abba Parque
- 8 Hotel Ibis Bilbao
- 9 Hotel Residencia Blas de Otero

## PROGRAMA



**JUEVES, 25 DE SEPTIEMBRE**

- 09:00-12:00 ENTREGA DE DOCUMENTACIÓN
- 12:00-12:30 CEREMONIA DE APERTURA
- 12:30-13:30 CONFERENCIA INAUGURAL  
**Relacionando diversidad y función en bacterioplancton marino**  
Dr. J. M. Gasol
- 13:30-15:30 Comida
- Sesión: ECOLOGÍA Y FISIOLÓGIA  
Moderadores: Carmen Amaro y Begoña Ayo
- 15:30-15:45 **Respiración del bacterioplancton marino: relación con la biomasa y capacidad de producción del ecosistema**  
Z. Baña, I. Goiriena, I. Artolozaga, B. Ayo y J. Iriberry
- 15:45-16:00 **Liberación de D-aminoácidos durante el crecimiento del bacterioplancton**  
I. Goiriena, M. Unanue, Z. Baña, J. Iriberry e I. Azúa
- 16:00-16:15 **Quórum sensing en *Vibrio vulnificus***  
C. Amaro, E. Valiente, J. B. Bruhn, K.F. Nielsen y L. Gram
- 16:15-16:30 **Quorum quenching en el medio marino: Aislamiento de bacterias marinas anti-AHL**  
M. Romero, A. Roca, A.M. Cabello y A. Otero
- 16:30-16:45 **Oxidación anaeróbica de la piritita mediante la respiración de nitrato por *Thiobacillus denitrificans***  
J. Urmeneta, C. Torrentó, J. Cama y R. Guerrero
- 16:45-17:00 **Mecanismos de interacción del lantano con *Idiomarina loihiensis* MAH1**  
F. Morcillo, M.L. Merroun, J.D. Bueno, M.T. González y J.M. Arias
- 17:00-17:15 **Producción de Kutnahorita por diversas cepas bacterianas del género *Idiomarina*.**  
M. T. González-Muñoz, F. Martínez-Ruiz, F. Morcillo, C. De Linares, C. Hernández, J. D. Martín-Ramos y J. M. Arias
- 17:15-17:30 **Microbiología del manantial hidrotermal de aguas sulfuradas de Archena (Murcia): caracterización inicial de microorganismos en hábitats seleccionados del sistema**  
P.F. Sánchez López y F. Torrella Mateu
- 17:30-18:00 Café
- Sesión: CONTAMINACIÓN MICROBIANA - 1  
Moderadores: Albert Bosch y Alicia Muela
- 18:00-18:15 **Detección y cuantificación del virus de la hepatitis A y norovirus en la cuenca del río Llobregat**  
U. Pérez, R.M. Pintó, D. Sano, J.M. Huguet, F. Ribas y A. Bosch



- 18:15-18:30 **Evaluación de la depuración intensiva para la eliminación del virus de la hepatitis A y Norovirus de moluscos procedentes de zona C**  
M.L. Vilariño, D. Polo, M. Angulo, C. Álvarez, S. Darriba, A. Longa y J.L. Romalde
- 18:30-18:45 **Enterovirus infecciosos en muestras ambientales y clínicas recogidas en Cataluña**  
A. Costán-Longares, L. Mocé-Llivina, N. Rabella, G. Rodríguez, A. Avellón, G. Trallero, J. Jofre y F. Lucena
- 18:45-19:00 **Detección de virus entéricos asociados a la importación de moluscos bivalvos**  
D. Polo, M. Quintela, M.L. Vilariño, J.L. Barja y J.L. Romalde
- 19:00-19:15 **Bacteriófagos de *Bacteroides* como trazadores de la contaminación fecal en aguas**  
M. Muniesa, A. R. Blanch, A. Payan y J. Jofre
- 20:00-21:00 RECEPCIÓN DE BIENVENIDA EN EL PALACIO DE LA DIPUTACIÓN

#### VIERNES, 26 DE SEPTIEMBRE

Sesión: CONTAMINACIÓN MICROBIANA - 2

Moderadores: María José Figueras e Inés Arana

- 09:00-09:15 **Desarrollo de un modelo matemático predictivo de la supervivencia de *E. coli* en aguas residuales tratadas**  
P. Wrent, M.I. de Silóniz y J.M. Peinado
- 09:15-09:30 **Idoneidad de *Escherichia coli* portadoras de genes que codifican proteínas fluorescentes para conocer el destino de las bacterias intestinales durante el tratamiento de aguas residuales**  
M. Orruño, I. Arana, C. Seco, I. Garaizabal, A. Muela e I. Barcina
- 09:30-09:45 **Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en aguas residuales por métodos culturales, métodos inmunológicos y PCR**  
I. Solís, S. Ballester, R. Aznar y P. Elizaquivel
- 09:45-10:00 ***Salmonella* spp. en un sistema mixto de depuración de aguas residuales mediante filtración, percolación y humedales: estudio comparado de técnicas de análisis**  
F. García Martínez, M.D. Valera Parra y F. Torrella Mateu
- 10:00-10:15 **Aislamiento e identificación de *Vibrio vulnificus* en agua residual**  
I. Cañigral, Y. Moreno, I. Amorós y M.A. Ferrús
- 10:15-10:30 **Prevalencia de *Arcobacter* spp. en muestras de agua del río Llobregat**  
L. Collado, D. García y M. J. Figueras
- 10:30-10:45 **Caracterización molecular de las poblaciones de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de ambientes acuáticos**  
S. Rodríguez y R. Araujo



- 10:45-11:00 **Factores de riesgo en la colonización de sistemas de aguas sanitarias calientes por *Legionella pneumophila***  
A. Serrano, S. Cervero, O. Canals, J. Mendez, J. Dellundé, H. Salvadó y R. Araujo
- 11:00-11:30 **Café**
- Sesión: BIODIVERSIDAD MICROBIANA EN LOS SISTEMAS ACUÁTICOS  
Moderadores: Carmen Márquez y María Jesús Pujalte
- 11:30-11:45 **Reclasificación de *Teichococcus ludipueritiae* y *Muricoccus roseus* como *Roseomonas ludipueritiae* comb. nov. y *Roseomonas rosea* comb. nov., respectivamente**  
C. Sánchez-Porro, V. Gallego, H-J Busse, P. Kämpfer y A. Ventosa
- 11:45-12:00 ***Aeromonas fluvialis*, sp. nov, una nueva especie aislada de agua de río**  
A. Alperi, M., A. Monera, A. Martínez-Murcia y M. J. Figueras
- 12:00-12:15 **Tres posibles nuevas especies de *Vibrio* dentro del clado de *Vibrio splendidus***  
A.L. Diéguez, R. Beaz-Hidalgo, S. Prado, A.E. Toranzo y J.L. Romalde
- 12:15-12:30 **Evolución de la microbiota autóctona de un manantial mineral después del proceso de envasado**  
M.C. de la Rosa, M. C. Pintado, C. Rodríguez y M. A. Mosso
- 12:30-12:45 **Caracterización taxonómica de cepas bacterianas pigmentadas de amarillo aisladas del Mar Mediterráneo**  
M.J. Pujalte, E. Alberici, J. Pascual, M.C. Macián, D.R. Arahal y E. Garay
- 12:45-13:00 **Estudio de la variabilidad intraespecífica del patógeno de almeja *Vibrio tapetis* mediante MLSA**  
S. Balboa, A. Doce, A.L. Diéguez y J.L. Romalde
- 13:00-13:15 **Variabilidad intraespecífica de cepas de la especie *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* aisladas de peces marinos cultivados**  
A. Labela, J.L. Romalde, M.C. Alonso, M. Manchado, D. Castro y J.J. Borrego
- 13:15-14:00 **PREMIO A LA MEJOR TESIS DOCTORAL DE LA ESPECIALIDAD 2006-2007  
Desarrollo y estandarización de técnicas de PCR múltiple para la detección de patógenos bacterianos de importancia en acuicultura**  
Dra. A. I. Mata



14:00-16:00	Comida
	Sesión: PATOLOGÍA DE ESPECIES ACUÍCOLAS - 1 Moderadores: Sara Isabel Pérez y Juan Luis Barja
16:00-16:15	<b>Estudios de transmisión del virus de linfocistis (LCDV) en larvas de doradas (<i>Sparus aurata</i>, L)</b> I. Cano, E. García-Rosado, J.B. Ortiz-Delgado, B. López-Jimena, M.C. Alonso, D. Castro, J.J. Borrego y C. Sarasquete
16:15-16:30	<b>Presencia de birnavirus acuáticos en peces procedentes de las rías de Galicia</b> J.M. Cutrin, I. Bandín, A. Silva, E. Areoso, J.L.Barja y C.P. Dopazo
16:30-16:45	<b>El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa de salmónidos: Caracterización molecular de aislados españoles y chilenos</b> A. I. de las Heras, S. Rodríguez Saint-Jean, A. Romero, C. Ortega, M. Monrras, R. Enríquez y S. I. Pérez Prieto
16:45-17:00	<b>Infección experimental de juveniles de rodaballo, lenguado y trucha común con cepas del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) aisladas de peces salvajes de origen marino</b> M. Lago, J.G. Oliveira, M. Conde, C.P. Dopazo e I. Bandín
17:00-17:15	<b>Secuenciación del genoma del primer virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) aislado de anguila europea (<i>Anguilla anguilla</i>)</b> A. Montesinos, K. Hodneland, C. Sexton, E. Sanjuán y C. Amaro
17:15-17:30	<b>Detección de herpesvirus en anguilas procedentes de la albufera de Valencia</b> S. Souto, J.M. Cutrín, C. Esteve, E. Alcaide, C. López-Vázquez e I. Bandín
17:30-18:00	Café
	Sesión: PATOLOGÍA DE ESPECIES ACUÍCOLAS - 2 Moderadores: Alicia Estévez y María Teresa Pérez
18:00-18:15	<b>Vancrobactina vs. anguibactina: evolución de dos sistemas de biosíntesis y transporte de sideróforos en <i>Vibrio anguillarum</i></b> M. Balado, M.C. Cerviño, A.J. Rivas, C.R. Osorio y M.L. Lemos
18:15-18:30	<b>Factores que controlan el crecimiento de bacterias autóctonas del medio marino en cultivos mixtos con <i>Vibrio anguillarum</i></b> E.P. Lago, N.F. González, M. López, T.P. Nieto y R. Farto
18:30-18:45	<b>Evolución de la infección experimental por dos biotipos de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (no diarreico y diarreico) en almejas <i>Ruditapes philippinarum</i>, durante la post-cosecha</b> C. López-Joven, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzueta, L. Elandaloussi, D. Furones y A. Roque



- 18:45-19:00 **Identificación de genes regulados por hierro en *Vibrio alginolyticus* TA15 mediante la realización de un ensayo de titulación de Fur (FURTA)**  
A.J. Rivas, M. Balado, M.C Cerviño, M.L. Lemos y C.R. Osorio
- 19:00-19:15 **Comparación de la composición de vibrios en almejón de sangre (*Callista chione*) de dos poblaciones de Cataluña**  
A. Roque, B. Gómez-Gil, B. Lacuesta, J. Perez, L. Elandaloussi y M. Delgado
- 19:15-19:30 **Análisis de vibrios aislados del lenguado (*Solea senegalensis*) obtenidos de tres localidades en España**  
B. Gómez-Gil, L. Dongankaya, D. Furones, N. Duncan, E. Salas, I.García de la Banda, J.P. Cañavate, C. Lobo y A. Roque
- 19:30-19:45 **Competencia “in vitro” entre bacterias autóctonas y especies patógenas asociadas a la acuicultura gallega**  
M. López, N.F. González, E.P. Lago, T.P. Nieto y R. Farto

#### SÁBADO, 27 DE SEPTIEMBRE

Sesión: PATOLOGÍA DE ESPECIES ACUÍCOLAS - 3

Moderadores: Jesús L. Romalde y Juan José Borrego

- 09:00-09:15 ***Lactococcus garvieae*, patógeno emergente en la acuicultura mediterránea, estudios genéticos mediante microarrays de ADN y herramientas bioinformáticas**  
M. Aguado, J.F. Fernández-Garayzábal, A. Gibello, M.T. Cutuli y M.M. Blanco
- 09:15-09:30 **Identificación mediante IVET (*In Vivo Expression Technology*) de genes de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* inducidos específicamente durante la infección en rodaballo**  
M.C. Cerviño, M. Balado, A.J. Rivas, C.R. Osorio y M.L. Lemos
- 09:30-09:45 **Estudio histopatológico y bacteriológico de almejas cultivadas (*Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*) en Galicia**  
A. Doce, C. López, A.L. Diéguez, A. González, S. Balboa y J.L. Romalde
- 09:45-10:00 **Implicación del operón *traHIJKCLMN* en la virulencia de *Yersinia ruckeri***  
J. Méndez, L. Fernández y J.A. Guijarro
- 10:00-10:15 **La aplicación del modelo animal pez cebra en el estudio de patologías de especies acuícolas**  
U. Oyarbide, M. Olasagasti, S. Rainieri, A. Estonba y M.A. Pardo
- 10:15-10:30 **Motilidad como posible factor de virulencia de *Flavobacterium psychrophilum***  
D. Pérez-Pascual, A. Menéndez, B. Álvarez y J. A. Guijarro



- 10:30-10:45 **Virulencia en *Lactococcus garvieae* y genes implicados en la D-alanilación de los ácidos teicoicos (genes *dlt*)**  
P. Reimundo, A. Menéndez y J.A. Guijarro
- 10:45-11:15 **Café**  
Sesión: AVANCES METODOLÓGICOS Y NORMALIZACIÓN DE MÉTODOS  
Moderadores: Esperanza Garay y Francisco Lucena
- 11:15-11:30 **Evaluación de la UNE-EN 12780 para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* en agua de manantial mediante análisis fenotípicos y genotípicos**  
A. Casanovas, F. Lucena y A. Blanch
- 11:30-11:45 **Evaluación de cebadores para la detección de *Edwardsiella tarda***  
N. Castro, A.E. Toranzo, S. Núñez y B. Magariños
- 11:45-12:00 **Detección de micobacterias no tuberculosas en torres de refrigeración mediante pcr real time**  
B. Adrados, E. Julián, F. Codony, E. Torrents, M. Luquin y J. Morató
- 12:00-12:15 **Utilidad del MALDI-TOF para la identificación-caracterización de bacterias acuáticas**  
J. L. Barja, N. Castro, E. Guitián, A. E. Toranzo y B. Magariños
- 12:15-12:30 **Desarrollo de un dispositivo miniaturizado basado en microfluidica y biosensores para la detección rápida y simultánea por PCR de múltiples patógenos de transmisión hídrica**  
E. Soria, M.A. Yáñez, R. Múrtula, J. Alonso y V. Catalán
- 12:30-12:45 **Desarrollo de métodos moleculares para la detección de IPNV en peces asintomáticos**  
B. López-Jimena, E. García-Rosado, C. Infante, M.C. Alonso, I. Cano, M. Manchado, D. Castro y J.J. Borrego
- 12:45-13:00 **Optimización de un método para la detección de las microcistinas en aguas superficiales**  
H. Smienk, E. Sevilla, M. Peleato y L. Mata
- 13:00-13:15 **Validación de los nuevos protocolos de análisis microbiológico de aguas mediante servicios intercolaborativos y servicios intercomparativos**  
J. Sanchis
- 13:15-13:30 **Ejercicios europeos de equivalencia entre métodos de sustrato definido para *E.coli* y enterococos y los respectivos métodos ISO para aguas de baño**  
F. Ribas, C. Allaert, H. Gu, A. Isern, S. Niemela y C. Fricker
- 13:30-14:30 ASAMBLEA PLENARIA Y ACTO DE CLAUSURA
- 18:30-20:00 VISITA GUIADA AL MUSEO GUGGENHEIM
- 21:30-24:00 CENA DE DESPEDIDA



VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

Hora ☺	25 septiembre jueves	26 septiembre viernes	27 septiembre sábado	Hora ☺	
09.00				09.00	
09.15				09.15	
09.30			SESION Patología de especies acuícolas-3	09.30	
09.45		SESION Contaminación microbiana-2		09.45	
10.00	Inscripción y entrega documentación			10.00	
10.15				10.15	
10.30				10.30	
10.45				10.45	
11.00					11.00
11.15					11.15
11.30				11.30	
11.45				11.45	
12.00	CEREMONIA APERTURA	SESION Biodiversidad microbiana en los sistemas acuáticos	SESION Avances metodológicos y normalización de métodos	12.00	
12.15				12.15	
12.30	Conferencia Inaugural Josep M. Gasol			12.30	
12.45				12.45	
13.00		Premio Tesis Ana I. Mata		13.00	
13.15				13.15	
13.30			ASAMBLEA del GRUPO	13.30	
13.45				13.45	
14.00				14.00	
14.15				14.15	
14.30				14.30	
14.45				14.45	
15.00				15.00	
15.15				15.15	
15.30				15.30	
15.45				15.45	
16.00	SESION Ecología y Fisiología	SESION Patología de especies acuícolas-1		16.00	
16.15				16.15	
16.30				16.30	
16.45				16.45	
17.00				17.00	
17.15				17.15	
17.30				17.30	
17.45				17.45	
18.00	SESION Contaminación microbiana-1	SESION Patología de especies acuícolas-2		18.00	
18.15				18.15	
18.30			VISITA GUGGENHEIM	18.30	
18.45				18.45	
19.00				19.00	
19.15				19.15	
19.30				19.30	
19.45				19.45	
20:00	RECEPCIÓN EN LA DIPUTACIÓN		CENA DESPEDIDA		
20:15				21.30	
20:30					



VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

---

**RESÚMENES  
DE LAS  
PONENCIAS**





VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

---

CONFERENCIA INAUGURAL  
Dr. J. M. Gasol





## Relacionando diversidad y funci3n en bacterioplancton marino

Josep M Gasol

*Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ci3ncies del Mar-CSIC*

A pesar de que en los 3ltimos a3os hemos aprendido bastante sobre qu3 microorganismos habitan en el mar, tenemos todav3a poca informaci3n sobre qu3 hace cada uno de ellos. Las t3cnicas de biolog3a molecular nos informan, no sin sesgos, sobre las secuencias que dominan en un ambiente determinado. Pero entre que no es factible aplicarlas a gran escala en much3simas muestras, y que la presencia del organismo nos informa relativamente poco sobre su funci3n en el ecosistema, nos queda todav3a much3simo por conocer de c3mo funcionan las comunidades naturales de bacterias y arqueas marinas.

Esto significa que hay algunas de las preguntas que los ec3logos nos planteamos que tienen dif3cil contestaci3n: 3qu3 microorganismos controlan el flujo de carbono y nutrientes? 3existen microorganismos que cuando est3n presentes se convierten en “keystone” para el ecosistema? 3hay microorganismos que realizan funciones esenciales en los ciclos de algunos elementos, o el ecosistema se constituye con multitud de especies muy parecidas que hacen m3s o menos lo mismo y, por tanto, la p3rdida de algunas especies es asumible gracias a la resiliencia del sistema?, etc. Nuestro retraso en contestar estos temas hace que el di3logo con ec3logos de otros campos sea limitado.

Para aproximarnos a contestar estas preguntas, podemos utilizar varias aproximaciones. Una de ellas es la metagen3mica, otra la gen3mica de aislados. Por otro lado, podemos intentar correlacionar la estructura de la comunidad bacteriana con los par3metros funcionales del ecosistema, para as3 poder detectar grupos de organismos que son clave en algunas funciones del oc3ano. Y, finalmente, podemos combinar herramientas de an3lisis a nivel celular individual para interrogar los microorganismos marinos sobre su identidad (por ejemplo mediante FISH), y su funci3n (por ejemplo mediante autoradiograf3a).

En la ponencia presentaremos nuestro trabajo en el Observatorio Microbiano de la Bah3a de Blanes (NW Mediterr3neo), mediante la aproximaci3n “correlativa” pero especialmente mediante nuestro trabajo con sondas de FISH y autoradiograf3a. Para concluir, presentaremos una visi3n global de nuestro conocimiento actual del papel que realizan cada grupo de microorganismos marinos en los ciclos del carbono y del azufre org3nico en el mar.





Sesión:  
ECOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

Moderadores:  
**Carmen Amaro**  
**Begoña Ayo**





## **Respiración del bacterioplancton marino: relación con la biomasa y capacidad de producción del ecosistema**

Z. Baña, I. Goiriena, I. Artolozaga, B. Ayo y J. Iriberry

*Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco UPV-EHU, Bilbao*

Los procariotas suponen la mayor fracción de biomasa del medio marino, y a su vez disponen del mayor almacén de carbono de la biosfera en forma de carbono orgánico disuelto. Los procariotas heterótrofos consumen este carbono disuelto transformándolo en nueva biomasa (producción, PB) y mineralizándolo a CO<sub>2</sub> (respiración, RB). La eficiencia de crecimiento ( $EC=PB/(PB+RB)$ ) relaciona producción y respiración, y es el parámetro que mejor integra todos aquellos procesos metabólicos complementarios, como transporte, mantenimiento, crecimiento y reproducción, que configuran la energética de los procariotas. Resulta por tanto de enorme importancia conocer con precisión la velocidad a la cual el bacterioplancton respira y produce, así como los factores que regulan la velocidad de ambos procesos.

Mientras que los datos de que disponemos sobre producción procariota y factores que la regulan son numerosos, destaca la escasez de medidas de respiración del bacterioplancton. En parte, esto puede deberse a la dificultad de cuantificación precisa del oxígeno consumido o dióxido de carbono producido en tiempos de incubación cortos. El método Winkler de determinación de oxígeno es el más utilizado, si bien muestra serios inconvenientes: la precisión es baja y requiere tiempos de ensayo largos (24-48 horas) para detectar descensos de oxígeno significativos. Además, es una medida discreta y desconocemos la dinámica de variación durante el tiempo de ensayo. Recientemente se ha introducido la utilización de microsensores y microamperometría con el fin de detectar de forma continua pequeños descensos en la concentración de oxígeno.

El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre la carga biológica del sistema, entendida como la biomasa procariota que es capaz de albergar el ecosistema acuático, con la dinámica del proceso de respiración del bacterioplancton. Para ello se llevaron a cabo experiencias con agua de mar en las que se conservaron todas las variables que caracterizaban el ecosistema salvo el nivel de biomasa procariota. Utilizando microsensores, se determinó de forma continua la concentración de oxígeno y se analizó la dinámica del proceso de respiración cuando la carga de biomasa procariota era la presente en el agua de mar, cuando era netamente superior y en condiciones en las que el bacterioplancton podía mostrar producción hasta alcanzar la biomasa habitual del ecosistema.

Los resultados muestran que el descenso de oxígeno debido a respiración del bacterioplancton no es uniforme ni tan siquiera en las 24 primeras horas de ensayo, lo que indica que las medidas de respiración derivadas de métodos discretos y tiempos largos, deben ser analizadas con precaución. Por otra parte, la dinámica de respiración de la comunidad es dependiente de la carga de biomasa del sistema, apreciándose una relación inversa respiración-biomasa. Los resultados sugieren alteraciones en la eficiencia de crecimiento del bacterioplancton en situaciones de desequilibrio de la biomasa del ecosistema.

Estudio financiado por el MEC proyecto CTM2006-08023 y la UPV-EHU GIU-07/30



## **Liberación de D-aminoácidos durante el crecimiento del bacterioplancton**

I. Goiriena, M. Unanue, Z. Baña, J. Iriberry e I. Azúa

*Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco*

Los aminoácidos constituyen una fracción muy importante de la materia orgánica disuelta en el medio marino y una importante fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos. En la naturaleza los aminoácidos se encuentran preferentemente en su forma L, estando las formas D restringidas casi exclusivamente al peptidoglicano de los procariotas. El desarrollo de nuevas técnicas cromatográficas ha permitido conocer la concentración de D-aminoácidos en los sistemas marinos y se ha descubierto que es muy superior a la que cabría esperar de su origen tan restringido.

En este trabajo hemos analizado la concentración y composición de D y L aminoácidos totales disueltos mediante HPLC en sistemas marinos costeros en el Golfo de Vizcaya. La concentración de aminoácidos totales disueltos osciló entre 1,3  $\mu\text{M}$  y 3,9  $\mu\text{M}$  siendo los más abundantes Ala, Asp, Glu y Ser en sus formas L y Gly. El análisis de la composición enantiomérica mostró que los D-aminoácidos constituyen entre el 11% y el 24% del total de aminoácidos disueltos. Entre los D-aminoácidos los más abundantes fueron D-Ala y D-Asp, siendo muy bajas las concentraciones de otros D-aminoácidos. Con el fin de determinar el origen de los D-aminoácidos se ha seguido la evolución de la composición enantiomérica de aminoácidos en microcosmos de laboratorio en incubaciones largas, a medida que se produce la sucesión de las comunidades microbianas y la degradación de la materia orgánica. Se han analizado simultáneamente el número de procariotas y nanoflagelados, la producción heterotrofa procariota y la incorporación de L y D aminoácidos por la comunidad de procariotas. Durante las incubaciones se observó un aumento significativo de la concentración del aminoácido D-Ala durante la etapa de crecimiento del bacterioplancton. Experimentos llevados a cabo con cepas de *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio furnissii* creciendo en agua de mar artificial con glucosa como única fuente de carbono y energía, muestran que durante el crecimiento de estos procariotas se libera de forma significativa el aminoácido D-Ala, aumentando progresivamente su concentración en el medio de cultivo. La liberación de D-Ala durante el crecimiento de los procariotas podría estar relacionada con la síntesis de peptidoglicano. Además, su acumulación a lo largo de la incubación, durante la degradación de la materia orgánica, adquiere especial relevancia porque valida la utilidad de este aminoácido como indicador de biodegradabilidad de la materia orgánica.

Estudio financiado por el MEC proyecto CTM2006-08023 y la UPV-EHU GIU-07/30



## Quórum sensing en *Vibrio vulnificus*

C. Amaro<sup>1</sup>, E. Valiente<sup>1</sup>, J. B. Bruhn<sup>2</sup>, K.F. Nielsen<sup>2</sup> y L. Gram<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia. <sup>2</sup> Centre for Microbial Biotechnology, Technical University of Denmark

*Vibrio vulnificus* es una especie bacteriana acuática que causa infecciones en humanos y peces. La especie se ha subdividido en tres biotipos, quedando las cepas virulentas para peces englobadas en el biotipo 2. Este biotipo contiene una serovariedad zoonótica, la serovar E.

El genoma completo de dos cepas de origen humano y biotipo 1 ha sido secuenciado y en él se han identificado los genes biosintéticos y reguladores del sistema del *quorum sensing* (QS) mediado por autoinductores de tipo diéster de furanosil borato o autoinductor-2 (AI-2). No se han encontrado genes relacionados con el sistema de QS mediado por homoserina lactona acilada (AHL) o autoinductor-1 (AI-1) ni tampoco se ha detectado su producción mediante bioensayos en las cepas analizadas, todas ellas clínicas y de biotipo 1. Estos resultados han llevado a los investigadores, siguiendo una visión simplista de la especie bacteriana, a concluir que el sistema de QS en *V. vulnificus* está mediado por moléculas AI-2 y no por moléculas AI-1.

En este trabajo hemos analizado el fenómeno del QS en *V. vulnificus* bajo una perspectiva poblacional. Para ello, hemos incluido en el estudio cepas representativas de los distintos biotipos y serovares aisladas por todo el mundo. La diversidad genotípica de estas cepas fue confirmada mediante ribotipado y análisis de agrupamiento. Con alguna excepción, las cepas aparecían distribuidas en dos grupos principales, uno (GI) formado por cepas de biotipo 1 aisladas de sangre humana y el otro (GII) formado por cepas de los tres biotipos aisladas del medio acuático y de heridas humanas. Todas las cepas de los GI y II fueron positivas para el gen *luxS*, gen biosintético implicado en la síntesis de AI-2. El gen *luxS* de una cepa de biotipo 2 fue secuenciado y comparado con su homólogo en el biotipo 1 y en otras especies de *Vibrio* y bacterias acuáticas construyéndose el árbol filogenético para la proteína. Este árbol se comparó con el derivado del gen que codifica para el rRNA 16S comprobándose que ambos eran equivalentes.

Los resultados de los bioensayos efectuados para la detección de AI-1 con cepas mutantes deficientes en este sistema fueron positivos para un 30% de los aislados del GII y para ninguno de los aislados del GI. La producción de AI-1 resultó dependiente del medio de crecimiento, siendo sólo detectable en agar agua de mar e incrementándose de forma significativa cuando se añadían derivados de sangre, especialmente transferrina. El compuesto AI-1 se identificó por cromatografía líquida y espectrometría de masas como N-butanoil-homoserina-lactona (C4-HL). La C4-HL se producía *in vivo* en los peces infectados con cepas de biotipo 2, lo que sugiere su implicación en virulencia para peces. Se diseñaron cebadores degenerados a partir de los genes conocidos que codifican para C4-HL en otros *Vibrios*, en *Aeromonas hydrophila* y en *Serratia marcescens*, único caso conocido en que este sistema está codificado en un plásmido, pero no se obtuvieron resultados positivos.

En conclusión, el QS en la especie *V. vulnificus* depende tanto de AI-2 como de AI-1. El sistema dependiente de AI-2 está presente en todos los biotipos y serovares lo que sugiere que es un carácter ancestral y conservado a nivel de especie, mientras que el sistema AI-1 está presente sólo en un grupo de cepas de biotipos 1 y 2 relacionadas con el medio acuático y de probable origen común. Si este carácter ha sido ganado por TGH por las cepas acuáticas o perdido por las cepas de sangre humana es algo que deberá determinarse en posteriores estudios.



## Quorum quenching en el medio marino: Aislamiento de bacterias marinas anti-AHL

M. Romero, A. Roca, A.M. Cabello y A. Otero

*Departamento de Microbiología, Universidad de Santiago, Santiago*

Muchas especies bacterianas responden a los cambios del medio mediante un sistema de comunicación basado en la producción y liberación de pequeñas moléculas señal denominadas “autoinductores” que controlan la expresión de diferentes genes. Este mecanismo es conocido como “Quorum Sensing” (QS). Usando QS las poblaciones bacterianas pueden coordinar importantes funciones biológicas como la transferencia de plásmidos, luminiscencia, biosíntesis de antibióticos, factores de virulencia, formación de biofilms, etc.

La principal familia de autoinductores descrita es la de las Acil-homoserín lactonas (AHLs) basadas en un anillo lactona al que se une por un enlace amino un ácido graso a modo de cadena lateral. Son empleadas por bacterias Gram-negativas y difieren en el tamaño y sustituyentes de la cadena lateral haciéndolas específicas para cada especie bacteriana.

Puesto que las poblaciones bacterianas coordinadas por mecanismos de QS presentan ventajas competitivas en las múltiples interacciones que se producen en la naturaleza tanto con otros procariontes como eucariotas, es racional que los competidores hayan desarrollado sistemas, conocidos como “Quorum Quenching” (QQ), para desarmar los mecanismos de QS. El QQ se ha convertido de esta forma en una interesante alternativa a los problemas de resistencia a antibióticos en salud humana y en la acuicultura.

Debido a la especial relevancia de los procesos de QS en patógenos de peces marinos y con el objetivo de obtener cepas bacterianas inhibitoras de AHLs, se procedió al aislamiento, en diferentes medios de cultivo, de bacterias procedentes de muestras marinas de distinto origen: Sedimento de un tanque-reservorio de agua de mar de un circuito cerrado para el cultivo de peces, una muestra de biopelícula de un tanque de cemento para el cultivo marino de peces en circuito abierto y una muestra de alga *Fucus vesiculosus* obtenida de un sustrato rocoso intermareal en Isla de Arousa.

Se obtuvieron en total 165 aislados para los que la actividad inhibitora/degradadora de AHLs fue ensayada con AHLs de cadena lateral larga y corta con los biosensores de AHLs: *Chromobacterium violaceum* CV026, *Escherichia coli* JM109 pSB536 ó pSB1075 y confirmada por HPLC-MS.

Con los diferentes biosensores utilizados se obtuvieron un total de 65 aislados bacterianos con actividad QQ, de los cuales 10 presentaban actividad QQ sobre AHLs de cadena larga y corta. Estos aislados fueron seleccionados para su caracterización posterior por su inespecificidad y potencial mayor interés para bloqueo de sistemas de QS mediados por AHLs. Únicamente uno de estos se confirmó con actividad enzimática degradadora de AHLs por HPLC-MS. La identificación de bacterias marinas con esta actividad abre la puerta a una amplia aplicación en el campo de la acuicultura y biotecnología marina.



## Oxidación anaeróbica de la pirita mediante la respiración de nitrato por *Thiobacillus denitrificans*

J. Urmeneta<sup>1</sup>, C. Torrentó<sup>2</sup>, J. Cama<sup>2</sup> y R. Guerrero<sup>1</sup>

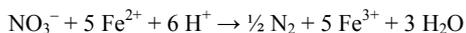
<sup>1</sup> *Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona*

<sup>2</sup> *Institut de Ciències de la Terra "Jaume Almera", CSIC, Barcelona*

La contaminación de los acuíferos por nitratos supone, cada vez más, un serio problema. La reducción del nitrato se puede producir por de la oxidación de la materia orgánica y/o de distintos compuestos reducidos de azufre. La pirita es un reservorio muy importante de azufre reducido en las rocas de muchas zonas. No hay evidencias que el nitrato pueda actuar como oxidante de la pirita en condiciones abióticas, pero en cambio, algunos estudios de campo aportan evidencias indirectas de la oxidación de la pirita mediante la respiración anaeróbica del nitrato por parte de bacterias desnitrificantes quimiolitotóxicas. En este trabajo se presentan los estudios preliminares de laboratorio para discernir el mecanismo y la cinética de la desnitrificación y la oxidación de la pirita mediante la actividad de *Thiobacillus denitrificans*.

Se han llevado a cabo diferentes experimentos en microcosmos de laboratorio. Estos microcosmos consisten en frascos de 50 mL en los que se añadieron diferentes combinaciones de pirita molida (diámetro de partícula aproximado de 50-100  $\mu\text{m}$ ), medio líquido mineral específico para *T. denitrificans* con o sin tiosulfato y con distintas concentraciones de nitrato, y cultivo de *T. denitrificans* DSMZ 12475. Los microcosmos se conservaron a lo largo del experimento en una cámara con una atmósfera controlada (90%  $\text{N}_2$  y 10%  $\text{CO}_2$ ). Se fueron tomando muestras a distintos tiempos (entre 0 y 1000h aprox.), analizando el nitrato, nitrito, sulfato, las distintas formas de hierro y el pH. Algunas muestras de pirita se examinaron al finalizar el experimento mediante microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX).

Los resultados muestran, en experimentos con pirita y microorganismos, partiendo de una concentración inicial de 20 mM en nitrato se produce una disminución cercana al 20% después de 1000h, mientras que llega al 100% en los experimentos con tiosulfato añadido. La disolución de la pirita se puede confirmar por el aumento del sulfato y del hierro y por la disminución del nitrato.



Un hecho a tener en cuenta es que en los experimentos con pirita se producen fuertes oscilaciones del pH llegando a valores por debajo de 5 que podrían inhibir la actividad de los microorganismos durante el estudio.

Todos estos experimentos van orientados a la obtención de datos que permitan la realización de otros estudios en columnas con flujo continuo, que se asemejarían mucho más a las condiciones naturales de los acuíferos



## Mecanismos de interacción del lantano con *Idiomarina loihiensis* MAH1

F. Morcillo<sup>1</sup>, M.L. Merroun<sup>2</sup>, J.D. Bueno<sup>3</sup>, M.T. González<sup>1</sup> y J.M. Arias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada;

<sup>2</sup>Institute of Radiochemistry, Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, Dresden (Alemania);

<sup>3</sup>Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada, Granada.

La movilidad de los metales pesados en el medio ambiente se ve afectada, además de por diversos factores físico-químicos, por la presencia y/o el metabolismo microbiano cuyo papel es importante, reduciendo o incrementando el transporte de estos contaminantes inorgánicos. Entre los diferentes mecanismos de interacción metales-microorganismos implicados cabe citar, entre otros, los siguientes: bioadsorción, bioacumulación, biotransformación y biomineralización.

Un gran número de estudios, encaminados a entender estos mecanismos, se han realizado usando bacterias aisladas de diferentes hábitats naturales (contaminados o no-contaminados con metales pesados), tales como suelos, aguas subterráneas, etc. Sin embargo, se ha investigado poco sobre el papel que juegan las bacterias marinas en el transporte de metales pesados y, menos aún, en el caso particular de los lantánidos en estos sistemas acuáticos.

El objetivo del presente trabajo es estudiar los procesos de interacción del lantano con representantes de cepas bacterianas marinas, habiéndose elegido la cepa MAH1 de *Idiomarina loihiensis* (González-Muñoz et al, 2007), aislada del Mar de Alborán, al estar las *Idiomarina* ampliamente distribuidas en hábitats marinos muy diversos (Ivanova et al, 2000).

El lantano (perteneciente al grupo de los lantánidos) se ha elegido como análogo inactivo de los actínidos trivalentes (Curio, Americio, etc.), presentes en los desechos radioactivos resultantes de las industrias nucleares cuyos vertidos, en ocasiones, van a parar al mar.

Para llevar a cabo estos objetivos se ha usado una metodología multidisciplinar, combinando estudios de tolerancia y bioadsorción, con microscopía electrónica de transmisión (MET) y microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDX) y difracción de electrones.

Los estudios de adsorción del lantano por la cepa MAH1 han puesto de manifiesto que la cantidad máxima del metal adsorbido (unos 50 mg por gramo de biomasa seca) se alcanza transcurridas las primeras horas de contacto. En cuanto a su tolerancia en medios sólidos, es de 8 mM. Este alto grado de tolerancia podría estar asociado con su capacidad de acumular este lantánido en forma de fase mineral cristalina, principalmente alrededor de la pared celular y dentro de las redes del EPS, como se ha puesto de manifiesto mediante MET, EDX y difracción de electrones. La fase mineral precipitada se está analizando mediante estudios espectroscópicos para determinar su naturaleza y estructura.

González-Muñoz et al. 2007. 9<sup>th</sup> Symposium on Bacterial Genetics and Ecology, Wernigerode, Alemania.

Ivanova et al. 2000. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:901–907.



## **Producción de Kutnahorita por diversas cepas bacterianas del género *Idiomarina*.**

M. T. González-Muñoz<sup>1</sup>, F. Martínez-Ruiz<sup>2</sup>, F. Morcillo<sup>1</sup>, C. De Linares<sup>1</sup>, C. Hernández<sup>3</sup>, J. D. Martín-Ramos<sup>4</sup> y J. M. Arias<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología; <sup>2</sup>Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-UGR); <sup>3</sup>Centro de Instrumentación Científica-UGR; <sup>4</sup>Departamento de Mineralogía y Petrología. Universidad de Granada, Granada.

La precipitación microbiana de carbonatos ha sido uno de los procesos naturales más relevantes a lo largo de la historia de la Tierra, a los que se viene dedicando intensa investigación desde hace décadas. Entre estos, la precipitación de dolomita ha sido un tema enormemente controvertido durante más de 150 años. Aunque en medios sedimentarios actuales la precipitación de dolomita no es frecuente, las grandes formaciones dolomíticas en rocas antiguas son uno de los grandes enigmas científicos, sobre el que han arrojado luz las evidencias de precipitación de este mineral por bacterias en medios hipersalinos. En relación con este tema, la precipitación de un carbonato rico en Mn con la estructura de la dolomita, la kutnahorita  $[\text{Ca}(\text{Mn},\text{Mg},\text{Fe})(\text{CO}_3)_2]$ , ha sido recientemente investigada, habiéndose demostrado que la fase rica en Ca y Mg puede ser precipitada por bacterias, tanto en ambientes hipersalinos (1) como en salinidades de agua de mar (2). Este último caso es de gran interés debido a que los océanos, ocupando la mayor parte del planeta, han constituido el principal ambiente para la precipitación de carbonatos. No obstante, en el caso de la kutnahorita, no se ha descrito hasta el momento la precipitación de la fase rica en Mn, que sería la verdadera kutnahorita. Por ello, se ha investigado la producción de este mineral, en medios de cultivo enriquecidos en Mn, por diversas cepas bacterianas del género *Idiomarina*: *I. abyssalis*, *I. loihiensis*, *I. baltica*, *I. homiensis*, aisladas de diversos habitats marinos. Se ha encontrado que todas las cepas investigadas producen calcita y kutnahorita (rica en Mn) en proporciones de, aproximadamente, 60 y 10%, respectivamente, además de producir otras fases minerales como estruvita y aragonito. La precipitación de este mineral en condiciones de salinidad de agua de mar es de gran relevancia ya que abre la posibilidad de la participación bacteriana en la precipitación de dolomita en ambientes no hipersalinos, al tiempo que demuestra la precipitación de la verdadera kutnahorita en estas mismas condiciones.

(1) Rivadeneyra, M. A. et al. 2006. *Geomicrobiol. J.* 23, 1–13.

(2) González-Muñoz, M. T. et al. 2008. *Chemosphere* 72, 465-472.



## Microbiología del manantial hidrotermal de aguas sulfuradas de Archena (Murcia): caracterización inicial de microorganismos en hábitats seleccionados del sistema

P.F. Sánchez López y F. Torrella Mateu

*Depto. de Gen. y Microbiología, Fac. de Biología, Universidad de Murcia, Murcia.*

La naturaleza de las aguas del manantial hidrotermal de Archena (Murcia), que emergen a una  $T^{\circ}$  de 50-51°C y pH 6,4-7,1 y valores aproximados de  $C_{25^{\circ}\text{C}}$  de 6.400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; res. seco (110°C) 4 g/L;  $\text{HCO}_3^-$  350 mg/L;  $\text{SO}_4^{=}$  570mg/L y  $\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^-$  3 a 5 mg/L, además de trazas de nutrientes varios (1), facilita el desarrollo de comunidades microbianas estructuradas en biopelículas en lugares específicos separados de la línea de las aguas destinadas a usos lúdicos y terapéuticos en el establecimiento termal. En este último caso las conducciones, depósitos, bañeras, etc. son sometidos a limpieza y control microbiológico escrupulosos, evitándose el desarrollo de biopelículas. Los crecimientos aparecen sobre todo en los hábitats en los que las aguas sulfuradas contactan con la atmósfera y fluyen libremente hacia los canales de desagüe. En el presente trabajo se muestra el resultado de la caracterización inicial macro y microscópica microbiana desarrollada de forma espontánea en canales y superficies bañados con las aguas del manantial de Archena. Sistemas similares han sido descritos en otras surgencias de España (2) y otros países (3). Asimismo se presenta el resultado de la caracterización inicial de cepas oxidadoras de azufre de ambientes neutros aisladas de las biopelículas de Archena.

El agua sulfurada y anóxica emerge ya desde el sustrato geológico con microorganismos. Los recuentos con DAPI y epifluorescencia oscilan entre 3,0 y 7,0 x 10<sup>4</sup> bacterias totales/ml. Ninguno de los microorganismos de las aguas recién emergidas se multiplica en los medios de cultivo para “microbiota heterotrofa viable” propios del control microbiano rutinario del agua (“recuentos de viables = 0 ufc/ml”).

Las biopelículas están colonizadas por bacterias filamentosas del azufre del género *Beggiatoa*, así como otros oxidadores del azufre de filiación desconocida, libres o asociados a cadenas de gotículas de azufre elemental exocelulares. Varios morfotipos microbianos producen mucílago compactos o velos laminares sobre los que se disponen otros microorganismos. Por su morfología característica se distinguen masas de finas espiroquetas (cf. *Leptospira sp.* 0,1 a 0,3  $\mu\text{m}$ ), así como largas (> 100  $\mu\text{m}$ ) y finas (0,15-0,2  $\mu\text{m}$ ) flexibacterias. En zonas iluminadas proliferan especies de cianobacterias *Oscillatoria sp.* deslizándose en la superficie de las biogloas y *Lyngbia sp.*, responsable de la estructura de biopelículas columnares muy compactas. Entre los microorganismos eucariotas se han observado ciliados bacteriovóricos (*Cyclidium sp.*) en la superficie de las biopelículas y gimnamebas que se alimentan de bacterias penetrando las masas de mucílago.

### Bibliografía:

(1)Maraver F. (ed.).2003. “Manantial Archena” en Vademecum de aguas mineromedicinales españolas, pp.305-308. Madrid. Instituto de Salud Carlos III. (2)Torrella,F. 2006. Ann. Hidrol..Med. 1:61-78. (3) Hiraishi et al.1999. Appl.Environmental Microbiol. 65:198-205.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Dirección del Balneario de Archena las facilidades ofrecidas para la realización de este trabajo.



Sesión:  
**CONTAMINACIÓN MICROBIANA**

Moderadores:  
**Albert Bosch**  
**Alicia Muela**

**María José Figueras**  
**Inés Arana**





## **Detección y cuantificación del virus de la hepatitis A y norovirus en la cuenca del río Llobregat**

U. Pérez<sup>1</sup>, R.M. Pintó<sup>1</sup>, D. Sano<sup>1</sup>, J.M. Huguet<sup>2</sup>, F. Ribas<sup>2</sup> y A. Bosch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Grupo de Virus Entéricos, Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona.*

<sup>2</sup>*AGBAR, Barcelona.*

El presente estudio se encuentra enmarcado dentro del proyecto del Sexto Programa Marco de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la Unión Europea “Assessment of Human Health Impacts from Emerging Microbial Pathogens in Drinking Water; HEALTHY-WATER” (Food-4B-2005-36306). El objetivo global de dicho proyecto es contribuir al conocimiento de la patogénesis de los agentes microbiológicos emergentes presentes en el agua de consumo para dilucidar sus vías de transmisión a humanos. El proyecto cubre todos los tipos de patógenos susceptibles de ser transmitidos por agua, es decir, virus, bacterias y protozoos y estudia su prevalencia en sistemas representativos de agua de consumo, urbanos y rurales, con sus respectivas fuentes de abastecimiento.

Con dicho objetivo en mente, se ha diseñado un estudio virológico de la cuenca del río Llobregat, principal fuente de abastecimiento de agua para consumo del área metropolitana de Barcelona. Dicho estudio comprende una serie de etapas: 1) la toma de muestras de agua en distintos puntos a lo largo del curso del río Llobregat así como en las principales estaciones depuradoras de aguas residuales y estaciones de tratamiento de agua potable situadas a lo largo de su cauce, incluyendo muestras del agua final que es distribuida para el abastecimiento de la población, 2) la concentración de virus en dichas muestras mediante el empleo de filtros de lana de vidrio y floculación con polietilenglicol, 3) la detección y cuantificación mediante RT-PCR específicas a tiempo real del virus de la hepatitis A y norovirus de los genogrupos I y II, y finalmente 4) la caracterización de las cepas aisladas mediante secuenciación del material genético.

Para ello, desde el mes de Octubre del año 2007, se viene realizando un muestreo mensual del río Llobregat que comprende la toma de muestras de agua en un total de 12 puntos estratégicamente seleccionados. La localización de dichos puntos nos permite estimar con bastante exactitud el nivel y la evolución de los contaminantes víricos más relevantes a lo largo del río Llobregat, y la capacidad de los tratamientos de depuración y potabilización de aguas para eliminar dichos patógenos víricos.

Adicionalmente, los datos obtenidos de la caracterización genética de las cepas aisladas permiten la obtención de datos epidemiológicos relevantes a partir de las muestras ambientales que pueden ser comparados con los datos disponibles procedentes de los casos clínicos de gastroenteritis y hepatitis.



## Evaluación de la depuración intensiva para la eliminación del virus de la hepatitis A y Norovirus de moluscos procedentes de zona C

M.L. Vilariño<sup>1</sup>, D. Polo<sup>1</sup>, M. Angulo<sup>2</sup>, C. Álvarez<sup>2</sup>, S. Darriba<sup>2</sup>, A. Longa<sup>3</sup> y J.L. Romalde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Facultad de Biología. Universidad de Santiago, Santiago de Compostela.

<sup>2</sup>INTECMAR, Peirao de Vilaxoán, Vilagarcía de Arousa

<sup>3</sup>Consello Regulador Denominación de Orixe Mexillón de Galicia, Vilagarcía de Arousa

En mayo de 2006 entró en vigor en España el RD 640/2006 que incorpora la nueva normativa europea (Reglamento 854/2004) referente a la higiene de productos alimenticios y las condiciones sanitarias de determinados productos de origen animal. A diferencia de la derogada legislación (Directiva 91/492/CEE), no se contempla la depuración intensiva, como alternativa a la reinstalación por períodos prolongados en zonas limpias, para el destino directo a mercado de moluscos vivos de zonas con alto nivel de contaminación fecal (zonas C). Esto conlleva una pérdida económica importante para los productores, por el menor valor del producto que ha de destinarse a procesado (conservas, etc). En la nueva normativa, el control sanitario sigue basándose en el recuento de bacterias fecales como indicadores de contaminación.

En el presente trabajo, se ha estudiado la capacidad de la depuración intensiva para la eliminación de los principales virus entéricos transmitidos por moluscos, empleando las recientes técnicas de RT-PCR en tiempo real, que permiten una cuantificación de la carga viral en las muestras. Los resultados se han comparado con los obtenidos para la depuración de bacterias fecales y bacteriófagos F-RNA, como posibles indicadores.

Para ello se realizaron 12 ciclos de depuración con almeja (*Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*) procedente de áreas de cultivo clasificadas como zonas C. Las muestras se sometieron a un proceso de depuración intensiva en "bins", retirando una muestra cada 24 horas hasta completar el total de una semana. El recuento de *Escherichia coli* y de bacteriófagos se llevó a cabo mediante los protocolos estandarizados ISO/TS 16649-3 e ISO 10705/1, respectivamente. Tras el procesamiento de las muestras, se extrajo el RNA y se sometió a protocolos de RT-PCR en tiempo real para la detección de NoV (genogrupos I y II) y HAV. En cada reacción se incluyeron controles de las eficiencias de extracción y de PCR.

Sólo en 3 de los 12 ciclos de depuración se detectaron virus en la muestra inicial, aunque en otros 6 se detectó RNA viral en muestras de días intermedios, lo que podría explicarse por una distribución heterogénea de la contaminación o por malas prácticas en la depuradora. No se encontró correlación entre depuración de bacterias fecales, bacteriófagos y virus entéricos. De hecho, de acuerdo con los niveles de *E. coli*, todas las muestras cumplirían los requisitos legales tras la depuración.



## Enterovirus infecciosos en muestras ambientales y clínicas recogidas en Cataluña

A. Costán-Longares<sup>1</sup>, L. Mocé-Llivina<sup>1</sup>, N. Rabella<sup>2</sup>, G. Rodríguez<sup>2</sup>, A. Avellón<sup>3</sup>, G. Trallero<sup>3</sup>, J. Jofre<sup>1</sup> y F. Lucena<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Hospital de Sant Pau, Barcelona. <sup>3</sup>Servicio de Virología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.

El género enterovirus, uno de los grupos más importantes de virus entéricos, está asociado a sintomatologías clínicas muy diversas (meningitis asépticas, encefalitis, parálisis o miocarditis). Desde mediados de los 70 diversos factores han hecho variar los números y los serotipos presentes en las aguas contaminadas. Por este motivo, y aprovechando las metodologías de enumeración, detección y tipificación descritas recientemente (Mocé-Llivina, 2004; Papageorgiu *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2001), se determinó la frecuencia y distribución de enterovirus infecciosos en muestras ambientales (aguas residuales crudas (n:74), efluentes secundarios (n:78), efluentes terciarios (n:87), aguas de mar (n:21) y de río (n:58)). Además, se realizó un estudio filogenético entre las cepas ambientales y clínicas aisladas en la región de estudio.

Los valores medios de enterovirus en el agua residual, efluentes secundarios, efluentes terciarios, agua de río y de mar fueron respectivamente: 1.012; 12,5; 0,024; 0,41 y 0,36 PFU /L. Los porcentajes de muestras positivas fueron del 94%; 48,7%; 34,5%; 74,6% y 63,3% respectivamente.

Entre el 70-100% de los aislamientos ambientales correspondieron a Coxsackievirus, entre el 3-27% a Echovirus y entre el 1-4,3% a Poliovirus. Los serotipos identificados fueron CB1, B2, B3, B4, B5, CA9, E1, E7, E9, E14, y E24. El CB4 fue el serotipo más abundante en el ambiente y exceptuando CB5, los demás no coincidieron con los serotipos más frecuentemente aislados a partir de muestras clínicas. Estos serotipos fueron E6 (14%), E11 (11%), Echo 30 (5%) y CB5 (5%).

Esta divergencia puede deberse a las líneas celulares empleadas, al hecho de que CB4 presentaría un patrón de circulación endémica y el serotipo mayoritario en clínica no y finalmente, a que ciertos serotipos clínicos podrían estar sobre representados debido a su importancia sanitaria.

Los estudios filogenéticos de las muestras ambientales mostraron que los distintos serotipos se agrupaban formando clusters y sub-clusters, circulando en el mismo lugar al mismo tiempo. Únicamente los aislamientos de CB1 mostraron distintos patrones de circulación temporal entre los subtipos. Los aislamientos clínicos se agruparon con los clusters formados por las muestras ambientales mostrando relaciones entre ambos tipos de muestras.



## Detección de virus entéricos asociados a la importación de moluscos bivalvos

D. Polo, M. Quintela, M.L. Vilariño, J.L. Barja y J.L. Romalde

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

Los brotes de enfermedades causadas por virus entéricos, principalmente hepatitis A y gastroenteritis, asociados al consumo de moluscos constituyen un problema de salud pública a nivel mundial. Ha sido bien documentado que los métodos de control sanitario actuales, basados en indicadores bacterianos, no son útiles para determinar la contaminación vírica en estos productos.

Desde hace años, la mejora de las condiciones sanitarias y las prácticas en higiene en países desarrollados, han cambiado el patrón epidemiológico de estas enfermedades virales, observándose una disminución de la prevalencia en las poblaciones y como consecuencia, un aumento de la susceptibilidad. Una de las posibles rutas de aparición de este tipo de brotes es la importación de moluscos procedentes de países en desarrollo, donde enfermedades como la hepatitis A, presentan una endemicidad más alta. El incremento del comercio internacional a gran escala entre zonas endémicas y no-endémicas favorece la transmisión de dichas patologías.

Por estos motivos se analizaron para la presencia de virus de la hepatitis A (HAV), norovirus (NoV) y astrovirus (AsV), un total de 32 muestras recibidas entre Septiembre del 2006 y Abril del 2008, de las cuales 25 procedían de Marruecos, 4 de Perú, 2 de Vietnam y 1 de Corea del Sur. Las especies analizadas fueron: Conchafina (*Callista chione*), ostra (*Crassostrea angulata*), bigaros (*Littorina* sp.), berberechos (*Cerastoderma edule*), navaja (*Ensis* sp.), coquina (*Donax* sp.) y almeja (*Transanella pannosa*, *Meretrix lyrata*).

Las muestras se transportaron desde sus países de origen refrigeradas o congeladas, llegando al laboratorio varios días después de su recolección. Al llegar, las muestras se dividieron en varias submuestras independientes, se limpiaron, sacando las valvas en condiciones asépticas, se extrajeron por disección los hepatopáncreas y se homogeneizaron con un volumen de agua de peptona 0,1%. Después se extrajo el RNA de los homogenizados mediante el kit de extracción Total Quick RNA Cells and Tissues (Talent). Para la detección viral se optó por la técnica de RT-PCR en tiempo real para NoV (genogrupos I y II) y HAV, y la técnica de RT-PCR seguida de hibridación para AsV. En cada caso se incluyeron los controles de las eficiencias de extracción y amplificación correspondientes.

Los análisis mostraron la presencia de NoV (genogrupos I y II), HAV y AsV. Hasta el momento, los datos obtenidos reflejan que un 6,2% de las muestras analizadas fueron positivas para la detección de HAV, mientras que NoV GI, se detectó en el 21,8% de las muestras.



## Bacteriófagos de *Bacteroides* como trazadores de la contaminación fecal en aguas

M. Muniesa, A. R. Blanch, A. Payan y J. Jofre

*Departamento de Microbiología. Universidad de Barcelona. Diagonal 645. 08028. Barcelona*

En los últimos años se han propuesto diversos procedimientos para trazar el origen de la contaminación fecal. Entre los métodos microbiológicos, se ha propuesto el uso de algunos bacteriófagos, como los bacteriófagos que infectan a *Bacteroides*. Este género bacteriano muestra un amplio grado de interacción simbiótica con su huésped que le puede conferir una elevada especificidad. Aislando cepa adecuadas de *Bacteroides* a partir de aguas con un cierto tipo de contaminación fecal (por ejemplo, humana) se pueden detectar específicamente bacteriófagos de origen fecal humano y así determinar el origen de la contaminación fecal en una determinada muestra de agua. Del mismo modo, se pueden seleccionar cepas de *Bacteroides* específicas para detectar fagos de diferentes orígenes de contaminación fecal, y adecuadas para cada área geográfica.

Un método descrito anteriormente (Payan et al., 2005) ha permitido, de forma fácil y barata, el aislamiento de diversa cepas de *Bacteroides* que permiten la detección específica de bacteriófagos de origen humano. Con el mismo método se han aislado en este estudio cepas que detectan bacteriófagos excretados por cerdos, vacas y aves. El grado de especificidad de estas cepas al detectar bacteriófagos de un determinado origen ha sido comprobado al analizar muestras de diversos orígenes. Después de analizar entre 100 y 200 aislamientos bacterianos a partir de cada tipo de muestra, se han aislado 2 cepas útiles para cerdos, 2 para vacas y 4 para aves. Estas cepas detectan respectivamente bacteriófagos en un rango superior a  $10^3$  UFP/100ml en muestras de agua con contaminación fecal del mismo origen, mientras que no detectan ningún bacteriófago o menos de 10 UFP/100ml en muestras con contaminación de otros orígenes.

Un buen trazador ha de ser capaz de detectar el origen de la contaminación incluso en muestras que presenten una contaminación no reciente. Para poder analizar la persistencia de los bacteriófagos de *Bacteroides* detectados por nuestras cepas, se han escogido los bacteriófagos que infectan a la GA17, específica para contaminación humana. Los bacteriófagos de GA17 han sido analizados en muestras sometidas a diversos procesos de inactivación y desinfección. Las muestras analizadas comprenden aguas residuales de origen humano y animal, efluentes secundarios y terciarios, agua de río moderadamente contaminada, lodos activados de una planta de tratamiento y muestras de agua de río sometida a inactivación natural "in situ" en invierno y verano. Los valores de bacteriófagos obtenidos con la cepa GA17 fueron comparados con los de colifagos somáticos, usados como valor de referencia. Los resultados indican que los bacteriófagos de GA17 no se detectaron en muestras con contaminación animal, aunque los niveles de contaminación fueran altos. En los distintos tipos de muestras humanas, el número de bacteriófagos fue suficientemente alto para permitir su detección (aproximadamente  $5.0 \log_{10}$  UFP/100ml en agua residual, 4.3 en lodos, 4.0 en efluentes secundarios, 2.3 en terciarios y 2.5 en agua de río). El ratio colifagos somáticos/bacteriófagos GA17 se mantuvo constante en todas las muestras y la inactivación presentada por ambos grupos de bacteriófagos fue similar.

La detección de fagos de *Bacteroides* es una buena herramienta que permite discriminar el origen fecal de cada muestra incluso en aquellas con contaminación no reciente. Los datos generados con este método aportan nueva información a los modelos predictivos desarrollados y aplicados para poder definir el origen de la contaminación fecal en distintos tipos de aguas.



## Desarrollo de un modelo matemático predictivo de la supervivencia de *E. coli* en aguas residuales tratadas

P. Wrent, M.I. de Silóniz y J.M. Peinado

*Departamento de Microbiología. Facultad de Biología, Universidad Complutense. Madrid.*

La supervivencia de *Escherichia coli* en aguas y suelos ha sido bastante estudiada en los últimos años y se han publicado abundantes datos cuantitativos. El modelo matemático más usado para describir y analizar los datos ha sido la clásica ecuación exponencial negativa que asume una cinética de primer orden en la inactivación. Sin embargo este modelo no explica los numerosos casos en los que no hay inactivación en tiempos cortos (“offset”) o en los que ésta deja de ocurrir a tiempos largos (“tailing”). Peleg ha propuesto el uso de distribuciones estadísticas tipo Weibull para desarrollar modelos que incluyan tanto las cinéticas convexas, con un periodo inicial sin aparente inactivación, como las cóncavas en las que las que no se consigue una inactivación completa. En este trabajo hemos aplicado una distribución tipo Weibull para modelizar la supervivencia de *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella entérica* en diversos tipos de aguas y analizamos los resultados.

El modelo asume que la inactivación microbiana puede ser considerada como un fallo, como la incapacidad de la célula para resistir el estrés, al cabo de cierto tiempo. Y asume también que la población es heterogénea, es decir, que cada célula tarda un tiempo diferente en morir. Si la población es suficientemente grande, la curva de supervivencia puede ser descrita por una ecuación conocida como la función de distribución de Weibull:

$$N/N_0 = \exp(-(t/b)^n)$$

una ecuación sencilla con sólo dos parámetros,  $b$ , que suele ser llamado coeficiente de localización y  $n$ , llamado coeficiente de forma ya que la curva correspondiente a la ecuación toma formas convexas cuando  $n$  es mayor que 1 y cóncavas cuando es menor que 1. Cuando  $n$  es igual a 1 la ecuación de Weibull se convierte en la típica ecuación exponencial negativa

El modelo ha sido validado en un sistema experimental con agua residual sintética a la que se añadió glucosa y que fue inoculada con los tres géneros bacterianos solos o mezclados. Al medir la supervivencia por recuento de viables, utilizando los medios Colilert y Chromocult, observamos que en aguas limpias la cinética de supervivencia era convexa, con valores de  $n$  mayores que 1, mientras que en aguas con nutrientes la cinética era cóncava, con valores de  $n$  inferiores a 1.

Del análisis de nuestros resultados concluimos que el modelo de distribución de Weibull puede ser empleado para describir con exactitud la cinética de inactivación de las bacterias entéricas en aguas residuales, con la ventaja de que una sola ecuación permite describir las diferentes cinéticas observadas en los distintos tipos de aguas. Los resultados confirman que la supervivencia es mayor a medida que el agua es más limpia. La cinética de inactivación en aguas limpias, con valores del parámetro  $n$  superiores a 1, puede ser explicada por la mayor heterogeneidad de la población. La presencia de nutrientes homogenizaría a la población produciendo cinéticas convexas con una rápida inactivación inicial, pero en las que la presencia de colas, puede suponer un peligro por la supervivencia de las células más resistentes.



## **Idoneidad de *Escherichia coli* portadoras de genes que codifican proteínas fluorescentes para conocer el destino de las bacterias intestinales durante el tratamiento de aguas residuales**

M. Orruño, I. Arana, C. Seco, I. Garaizabal, A. Muela e I. Barcina

*Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco, Bilbao*

El objetivo prioritario del tratamiento de las aguas residuales es eliminar o reducir los riesgos sanitarios y ecológicos asociados al vertido de aguas sin tratar a los medios acuáticos. La legislación vigente establece la idoneidad de estos tratamientos en base a la caracterización físico-química final de los efluentes de las plantas, obviando la caracterización microbiológica. Trabajos previos, realizados con muestras de agua provenientes de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Crispijana, han puesto de manifiesto la ausencia de relación entre parámetros físico-químicos y microbiológicos y la mayor sensibilidad de estos últimos a los cambios durante el tratamiento. Además, el seguimiento del proceso mediante ensayos basados en la cultivabilidad infraestima la densidad bacteriana antes y después del tratamiento. Así, tras los tratamientos primario y secundario, se detectaron más de 97% de bacterias no cultivables y, aproximadamente, un 40% de bacterias viables no cultivables (VNC). El análisis de estos resultados indica que los tratamientos primario y secundario aplicados no inducen la entrada en estado VNC. Aunque, la presencia de estas subpoblaciones no cultivables y VNC en los efluentes de las plantas de tratamiento plantea problemas desde un punto de vista sanitario si se consideran los posteriores usos del agua.

El comportamiento y destino de *E. coli* durante el tratamiento sirve de modelo para predecir el devenir de las bacterias intestinales, incluidas bacterias patógenas. Las cepas de *E. coli* que expresan proteínas fluorescentes pueden distinguirse en el conjunto de una población heterogénea. Se utilizaron las siguientes cepas portadoras de plásmidos en los que se ubican los genes *gfp* o *drFP583* que codifican información para la expresión de las proteína GFP (verde fluorescente) o DsRed (roja fluorescente): *E. coli* EGFP (Cormack *et al.* 1996), *E. coli* pGEN222 y *E. coli* DsRed (Hakkila *et al.* 2002). Se comprobó su comportamiento durante su permanencia en microcosmos de agua residual decantada (AD) y tratada (AT) en ausencia y presencia de la microbiota del agua residual. Posteriormente, y dado que el seguimiento de estos microorganismos manipulados no es factible en una planta de tratamiento, se monitorizaron en una planta de tratamiento miniaturizada (parámetros de funcionamiento en equilibrio: caudal=400 ml/h; caudal de recirculación=2-3 l/h;  $DBO_{AD}=70$  mg/l;  $DBO_{AT}=5$  mg/l). La eficacia de la planta miniaturizada (>99,9% de reducción de la carga bacteriana) fue superior a la determinada la planta de tratamiento de Crispijana (98,105%) y se corresponde con el incremento en la eficacia de reducción de DBO y sólidos suspendidos (parámetros físico-químicos de control obligado).

Nuestros resultados muestran una reducción del número de *E. coli* totales y cultivables descartando que se induzca la transición al estado VNC durante la permanencia en la miniplanta. La reducción en la población de *E. coli* durante el tratamiento puede atribuirse tanto a procesos físico-químicos, adhesión y floculación (transvase de contaminantes bacterianos del agua al fango), como a procesos microbiológicos, relación de depredación por protozoos (eliminación real). El análisis de los dos tipos de experiencias (microcosmos y miniplanta) parece resaltar el papel de los protozoos en el control de la densidad de las bacterias intestinales y su retirada de los efluentes. Este hecho requiere de confirmación.



## Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en aguas residuales por métodos culturales, métodos inmunológicos y PCR

I. Solís<sup>1</sup>, S. Ballester<sup>1</sup>, R. Aznar<sup>2</sup> y P. Elizaquivel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IPROMA S.L. [isolis@iproma.com](mailto:isolis@iproma.com) <sup>2</sup>Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA)(CSIC). [rosa.aznar@uv.es](mailto:rosa.aznar@uv.es)

*E. coli* O157:H7 destaca entre los otros serotipos de *E. coli* por su especial virulencia y por ser el causante de numerosos brotes epidémicos en los últimos 20 años. Su principal reservorio es el intestino del ganado bovino y la transmisión se produce al ingerir carne mal cocinada, leche sin esterilizar o la utilización de agua contaminada. La sobreexplotación de los acuíferos y la escasez de agua para riego inclina al agricultor a la reutilización de las aguas depuradas. Una deficiente depuración de las aguas residuales puede hacer que este patógeno llegue a la tierra y por consiguiente pueda contaminar los productos vegetales frescos. El procedimiento reconocido como oficial para la detección de *E. coli* O157:H7 se basa en técnicas de cultivo, combinadas con un paso de inmuoconcentración, y requiere del aislamiento e identificación de las colonias recuperadas en medios selectivos y diferenciales. Se trata de un método que requiere de tiempos de análisis de 48-72 horas en caso de muestras negativas y de hasta 5 días en caso de muestras positivas. Las últimas aproximaciones para la detección de este patógeno emergente se basan en técnicas inmunológicas o de PCR. Las inmunológicas incluyen la detección del antígeno somático (O157) y del antígeno flagelar (H7), mientras que las de PCR incluyen la detección de genes implicados en la virulencia de este serotipo como *stx1*, *stx2*, *eaeA* o el *uidA* relacionado con la actividad  $\beta$ -glucuronidasa presente en todos los miembros de la especie *E. coli*, excepto en el serotipo O157:H7, debido a una mutación puntual en dicho gen.

El objetivo de este trabajo es comprobar la incidencia de este patógeno en muestras reales de aguas residuales, sobre todo depuradas y consideradas como “aptas para riego” en el RD de aguas reutilizadas, mediante el uso de las tres técnicas: método cultural (método UNE-EN ISO 16654), inmunológica (método VIDAS<sup>®</sup>) y RTi-PCR. En el estudio se han utilizado un total de 220 muestras que incluyen tanto aguas de entrada de depuradora urbana como aguas depuradas y por tanto posiblemente aptas para su uso como agua de riego.

Tal y como se esperaba, se obtuvo un mayor número de muestras positivas en las aguas de entrada de depuradora que en las muestras de salida de las mismas: un 16 % de muestras positivas en las aguas de entrada y un 2% en las aguas de salida, obteniéndose más resultados positivos utilizando RTi-PCR.



## ***Salmonella* spp. en un sistema mixto de depuración de aguas residuales mediante filtración, percolación y humedales: estudio comparado de técnicas de análisis**

F. García Martínez, M.D. Valera Parra y F. Torrella Mateu

*Depto. Gen. y Microbiología, Fac. de Biología, Universidad de Murcia, Murcia.*

Las aguas residuales urbanas de la Univ. de Murcia en el Campus de Espinardo, son tratadas mediante tecnología de Depuración Simbiótica (Golfrat ®), que entre otros aspectos incluye prefiltración de sólidos a 150-250 µm, cuatro unidades de percolación (Fases I a IV) en serie y un humedal. El agua destinada a riego de ornamentales en el campus universitario se almacena y regula en una antigua balsa de lagunaje.

El rendimiento depurador se estima rutinariamente mediante análisis de coliformes totales y fecales (CT,CF) y de *E. coli*; colifagos somáticos y de pili (ØSo y ØPi); clostridios sulfito reductores y enterococos. En las fases de percolación (efluente F-IV vs influente de F-I), el sistema ha demostrado hasta la fecha los siguientes descensos en unidades log (media): 2,88 en CT, 2,76 en CF, 3,04 en *E. coli*, 1,21 en ØSo y 1,18 de ØPi. En cuanto a bacterias patógenas de transmisión hídrica, desde Julio de 2007 a Junio de 2008, se han venido realizando análisis de *Salmonella* spp. en distintos puntos del sistema. Es sabido que el éxito en aislar *Salmonella* está influida por las características de la muestra: aguas marinas, residuales o de otro tipo, alimentos, heces, etc. (1,3,4,5). En el sistema estudiado, las analíticas iniciales que ya incluían un paso por RVSS, pusieron de manifiesto la dificultad para detectar salmonelas debido a la interferencia de otras bacterias capaces de proliferar en los medios de cultivo empleados. En el presente trabajo se aportan resultados de un estudio comparado entre diferentes analíticas para detección de *Salmonella* spp. en las que se han usado los medios One Broth (OB) y Agua de Peptona (AP) en pre-enriquecimiento; Rappaport-Vassiliadis (RV) con y sin novobiocina (+/- nov), RVsemisólido (RVSS +/- nov) en fase de enriquecimiento selectivo, y SS, XLD, BGA y OSCMII, como medios diferenciales de aislamiento. Los aislados se confirmaron mediante bioquímica y serología (antígenos somáticos y flagelares). Los medios usados fueron de Oxoid.

Los resultados obtenidos hasta la fecha en este sistema de depuración, han puesto de manifiesto que el uso de la novobiocina (20 µg/ml) recomendada en varios protocolos analíticos (2) y en UNE-EN ISO 6579 (6) no mejora las detecciones si se usa en los pre-enriquecimientos (AP y OB) o en la fase de migración selectiva (RVSS+nov), pero sí en cambio, si se usa en el enriquecimiento selectivo líquido (RV+nov). Los medios XLD y SS han demostrado ser mejores que BGA y OSCMII para la visualización diferencial de colonias de *Salmonella* spp y su posterior aislamiento final.

**Bibliografía:** (1)Empanza-Knörr et al.1995.Wat.Sci.Technol.31:239-248. (2)Jensen et al.2003.J.Microbiol.Meth.55:249-255. (3)Moriñigo et al.1993.J.Appl.Microbiol.74:330-335. (4)Perales et al.1989.Appl.Environm.Microbiol.55:3032-3033. (5)Torrella et al.2003. Wat.Sci.Technol.48:105-112. (6)UNE-EN ISO 6579, 2003/A1.

**Agradecimientos:** A ESAMUR (Entidad de Saneamiento de Murcia) y al Vicerrectorado de Economía e Infraestructura de la UMU por el apoyo a la realización de este trabajo.



## Aislamiento e identificación de *Vibrio vulnificus* en agua residual

I. Cañigral, Y. Moreno, I. Amorós y M.A. Ferrús

Departamento Biotecnología-Microbiología, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia

*Vibrio vulnificus* es una bacteria halofílica Gram negativa que habita en agua marina, normalmente de zonas templadas. Esta bacteria es capaz de causar rápidamente septicemia debido al consumo de alimentos procedentes del mar crudos o poco cocinados, e infecciones en heridas por exposición de las mismas a aguas contaminadas.

Su potencial patológico es extremadamente elevado: Posee capacidad para atravesar la barrera intestinal, puede pasar al torrente circulatorio y al hígado produciendo una infección severa, con necrosis tisular. La muerte por insuficiencia hepática se produce en el 60% de los casos, especialmente si el paciente posee alguna enfermedad hepática o si es inmunodeprimido.

El principal objetivo de este estudio fue comprobar la presencia de *Vibrio vulnificus* en agua residual procedente de diferentes depuradoras y acequias de la Comunidad Valenciana.

Durante todo el trabajo se procesaron 32 muestras de agua residual recogida en distintos puntos de la Comunidad Valenciana, tanto en depuradoras como en acequias, durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2007.

El procedimiento de aislamiento llevado a cabo consistió en filtrar 100 mL de la muestra y homogeneizar la membrana de filtrado en 250ml en agua de peptona alcalina (APW, 1.5%NaCl). Del homogeneizado se sembraron 100µl en agar thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) de forma directa y después de 24 horas de enriquecimiento a 30°C. Las placas de agar TCBS sembradas fueron incubadas durante 24-48 horas a 37°C. Las colonias que presentaban color verde en agar TCBS fueron cultivadas en Cromo Agar *Vibrio* a 37°C y en caldo marino a 30°C durante una noche. Posteriormente, fueron identificadas mediante tinción de Gram, pruebas bioquímicas y PCR.

Las pruebas bioquímicas llevadas a cabo para la identificación fueron: oxidasa, catalasa, arginina dihidrolasa (ADH), lisina descarboxilasa (LDC) y ornitina descarboxilasa (ODC), prueba de la licuefacción de gelatina (gelatinasa) y prueba de Voges-Proskauer (VP). Además, se valoró el crecimiento en presencia de los siguientes azúcares: L-arabinosa, D-manosa, celobiosa, D-gluconato, L-serina y putrescina.

Para la identificación por PCR, 1 ml del cultivo del posible *V. vulnificus* crecido en caldo marino a 30°C fue sometido a extracción de ADN y el producto obtenido fue usado para amplificar un fragmento de 205 pares de bases del gen de la Hemolisina A presente en esta especie del género *Vibrio*.

De las 32 muestras procesadas, se aislaron 3 cepas, que fueron identificadas como *Vibrio vulnificus*, y que procedían de dos depuradoras diferentes.

En este trabajo se ha demostrado, por primera vez, la presencia de *V. vulnificus* en aguas residuales, lo que indica la posibilidad de transmisión por aguas portadoras de contaminación fecal y plantea la necesidad de nuevos estudios que analicen la eficacia de los tratamientos de depuración para eliminar este patógeno.



## Prevalencia de *Arcobacter* spp. en muestras de agua del río Llobregat

L. Collado, D. García y M. J. Figueras

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

El género *Arcobacter* fue descrito en el año 1991 a partir de cepas aerotolerantes de *Campylobacter* e incluye actualmente seis especies: *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, *Arcobacter nitrofigilis*, *Arcobacter cibarius* y *Arcobacter halophilus*. Las tres primeras especies mencionadas son consideradas patógenas emergentes, ya que se han asociado con sintomatología gastrointestinal (diarrea y calambres abdominales) y en menor proporción con casos de bacteremia en humanos. Estas especies también se han asociado con abortos en ganado vacuno y ovino. El consumo de carnes y agua contaminadas son considerados las vías de transmisión a humanos. Sin embargo, existen pocos trabajos que establezcan la prevalencia de *Arcobacter* en aguas. Además, en los estudios existentes las técnicas de identificación utilizadas no permiten caracterizar todas las especies del género. Recientemente hemos diseñado un método capaz de caracterizar, en base a los patrones de restricción del gen RNAr 16S (ca. 1300 pb) obtenidos con la endonucleasa *MseI*, las seis especies actualmente aceptadas en el género. El objetivo del presente trabajo ha sido establecer la prevalencia de las especies de *Arcobacter* en muestras del río Llobregat utilizando este método. Para esto se realizaron tres muestreos entre febrero y abril del 2008, en 10 puntos a lo largo del curso del río. Siete de estos puntos se establecieron entre las localidades de Berga y Martorell, el punto 8 correspondió a agua del río antes de su entrada a la planta de tratamiento de agua potable de Sant Joan Despí, el punto 9 agua tratada (después de la filtración del agua con carbón activo) y 10 agua potable a la salida de la planta. De cada muestra positiva fueron seleccionadas 8 colonias, para establecer la frecuencia de aislamiento y la caracterización de cada una de ellas a nivel de especie.

La prevalencia global de *Arcobacter* fue del 76,7%, siendo *A. butzleri* la especie más aislada seguida de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*. Sin embargo, nunca se aisló *Arcobacter* en las muestras de agua potable y solo un muestreo resultó ser positivo después de la filtración con carbón activo. Nuestros resultados indican que a pesar de que existe un alta prevalencia de las especies potencialmente patógenas del género *Arcobacter* en las muestras del río Llobregat estudiadas, el tratamiento de potabilización al que se somete el agua es efectivo para su eliminación. Comparativamente, la prevalencia de *Arcobacter* encontrada en este estudio es mayor a los valores obtenidos en otros estudios realizados por nuestro grupo en otras aguas de lagos y de ríos Catalanes (41,3%) y también a la encontrada en otros ríos Españoles o de otros países donde la incidencia varía entre 23,0% y un 40,0%.

**Este estudio ha sido financiado por la Unión Europea a través del proyecto FOOD-CT-2006-036306**



## **Caracterización molecular de las poblaciones de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de ambientes acuáticos**

S. Rodríguez y R. Araujo

*Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona*

Las especies termotolerantes del género *Campylobacter* son una de las principales causas de gastroenteritis bacteriana en España. Su reservorio habitual es el sistema digestivo de numerosos animales homeotermos y su transmisión puede darse a través del medio acuático. En estudios anteriores hemos descrito la presencia de *Campylobacter* en diferentes tipos de aguas de Cataluña.

El primer objetivo de nuestro estudio fue determinar la especie de las cepas aisladas a partir de agua del río Llobregat, agua de marismas deltaicas, agua residual urbana, de mataderos de aves y de purines de cerdos entre abril del 2004 y diciembre del 2006. Realizamos una primera identificación mediante la PCR múltiple descrita por Wong *et al.* (2004) que nos permitió determinar la especie dominante en cada una de las muestras. En río y delta detectamos una mezcla de especies, entre las que dominaba *C. coli*. En agua residual urbana dominó *C. jejuni*. En purines detectamos únicamente *C. coli* y en muestras residuales de aves únicamente *C. jejuni*.

El segundo objetivo fue determinar la estructura génica de las poblaciones ambientales y establecer posibles relaciones según los diferentes tipos de agua. Realizamos el análisis mediante Multilocus Sequence Typing (MLST) de 12 cepas de agua de río, 11 cepas de agua residual urbana, 6 de purines de cerdo, 2 de matadero de aves y 4 cepas clínicas. En total fueron 11 cepas de *C. jejuni* y 26 cepas de *C. coli*. Las 37 cepas presentaron un total de 21 patrones diferentes de MLST, lo que indica la gran diversidad de las poblaciones de *Campylobacter* en estas aguas.

*C. coli* resultó ser una especie con una estructura poblacional más clonal que la de *C. jejuni*. En el caso de *C. coli*, las cepas del agua residual urbana, purines de cerdo y cepas clínicas formaron un grupo diferente al de las cepas de río. En cuanto a las cepas de *C. jejuni*, no formaron ningún grupo bien definido. Aunque se observó una mayor frecuencia de ciertos genotipos en algunos tipos de aguas no se pudo determinar una clara asociación entre un tipo de agua y un genotipo en concreto.



## Factores de riesgo en la colonización de sistemas de aguas sanitarias calientes por *Legionella pneumophila*

A. Serrano<sup>1</sup>, S. Cervero<sup>1</sup>, O. Canals<sup>1</sup>, J. Mendez<sup>1</sup>, J. Dellundé<sup>2</sup>, H. Salvadó<sup>1</sup> y R. Araujo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Biología; Universidad de Barcelona.

<sup>2</sup>Laboratorios Altimir, Blanes. Barcelona.

El origen de muchas infecciones causadas por *Legionella pneumophila* se asocia a duchas o grifos de agua sanitaria caliente donde la bacteria sobrevive y se multiplica en los biofilms. Con el fin de conocer si hay alguna relación entre los factores ecológicos, tanto microbiológicos como fisicoquímicos, y la presencia de *Legionella* se realizó un estudio de los sistemas sanitarios de agua caliente de edificios públicos de Cataluña. Se analizaron un total de 215 muestras, donde se estudiaron los parámetros fisicoquímicos, bacterianos y protozoos que pudieran estar relacionados con la presencia de *Legionella* en estos sistemas.

*L. pneumophila* fue aislada en un 26% de las muestras con una media geométrica de  $6,7 \times 10^1$  ufc/100ml y fue detectada en el 36% de las muestras por PCR semi-anidada de género.

Los parámetros fisicoquímicos, temperatura, cloro, pH, turbidez, carbón orgánico total, Zn, Fe y Cu, no mostraron relaciones estadísticamente significativas con *Legionella* cuando se consideraron de forma independiente.

En el análisis bacteriológico observamos la presencia de *Pseudomonas spp*, Heterótrofos a 23°C y Heterótrofos a 37°C en el 50%, 85%, y en el 89% de las muestras respectivamente. No encontramos relación significativa entre las concentraciones de *Legionella* y *Pseudomonas*. Sin embargo, las concentraciones de Heterótrofos a 23°C y a 37°C mostraron una relación moderadamente significativa con *Legionella*.

El análisis discriminante de estos parámetros indicó que se podía predecir la presencia de legionella, con un porcentaje de aciertos de al menos un 70% de los casos, considerando una función en la que intervienen simultáneamente: temperatura, heterótrofos a 37°C, pH, turbidez y Zn.

Finalmente también determinamos la presencia de protozoos por observación directa con microscopio y por cultivo en cada una de las muestras. En el 20% de las muestras observamos protozoos (amebas, flagelados y ciliados), de éstas las amebas fueron observadas aproximadamente en el 90%. Fueron identificados géneros como *Acanthamoeba* y miembros de las familias *Valhikamphidae* y *Hartmannellidae*. A pesar que muchos autores consideran que los protozoos son el factor de riesgo más importante para la colonización de *Legionella* en sistemas de agua caliente, existen pocos datos al respecto. Nuestros resultados preliminares con análisis estadísticos no paramétricos revelaron cierta relación entre la ausencia de protozoos y la ausencia de *Legionella*.





Sesión:  
DIVERSIDAD MICROBIANA EN LOS  
SISTEMAS ACUÁTICOS

Moderadores:  
**Carmen Marquez**  
**María Jesús Pujalte**





## Reclasificación de *Teichococcus ludipueritiae* y *Muricoccus roseus* como *Roseomonas ludipueritiae* comb. nov. y *Roseomonas rosea* comb. nov., respectivamente

C. Sánchez-Porro<sup>1</sup>, V. Gallego<sup>1</sup>, H-J Busse<sup>2</sup>, P. Kämpfer<sup>3</sup> y A. Ventosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012, Sevilla

<sup>2</sup>Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene, Veterinärmedizinische Universität, A-1210 Wien, Austria

<sup>3</sup>Institute for Applied Microbiology, Justus-Liebig-Universität Giessen, IFZ, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany

Como resultado de un trabajo de investigación realizado durante los años 2003-2004 con el objetivo de estudiar la población bacteriana presente en el agua potable de la ciudad de Sevilla se describieron un total de nueve nuevas especies bacterianas. Una de las cepas descritas, la cepa TR53 presentó máxima semejanza con especies del género *Roseomonas* y fue sometida a un estudio de taxonomía polifásica. En base a los resultados de la caracterización fenotípica, genotípica, quimiotaxonómica y filogenética la cepa TR53 se describió como una nueva especie del género *Roseomonas*: *Roseomonas aquatica* (Gallego y col., 2006).

El género *Roseomonas* fue descrito por Rihs y col. (1998) y actualmente consta de 7 especies, varias de ellas aisladas de ambientes acuáticos. Son  $\alpha$ -proteobacterias que se caracterizan por poseer una pigmentación rosácea con metabolismo oxidativo. Los géneros *Teichococcus* y *Muricoccus* fueron descritos por Kämpfer y col (2003) y cada uno consta de una sola especie, *T. ludipueritiae* y *M. roseus*, respectivamente.

Durante el estudio filogenético de la cepa TR53 observamos que las especies pertenecientes a los géneros *Teichococcus* y *Muricoccus* estaban estrechamente relacionadas con el género *Roseomonas*. En este estudio hemos comparado las especies *Teichococcus ludipueritiae* y *Muricoccus roseus* con las distintas especies del género *Roseomonas* para lo cual hemos utilizado un conjunto de características fenotípicas, quimiotaxonómicas y filogenéticas. En base a los resultados obtenidos proponemos la transferencia de las especies desde los géneros *Teichococcus* y *Muricoccus* al género *Roseomonas*.

Gallego, V., Sánchez-Porro, C., García, M. T. & Ventosa, A. (2006). *Roseomonas aquatica* sp. nov., isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2291-2295.

Kämpfer, P., Andersson, M.A., Jäckel, U. & Salkinoja-Salonen, M. (2003). *Teichococcus ludipueritiae* gen. nov., sp. nov., and *Muricoccus roseus* gen. nov., sp. nov., representing two new genera of the  $\alpha$ -1 subclass of the Proteobacteria. *Syst Appl Microbiol* **26**, 23-29.

Rihs, J. D., Brenner, D. J., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., Hollis, D. G. & Yu, V. L. (1993). *Roseomonas*, a new genus associated with bacteremia and other human infections. *J Clin Microbiol* **31**, 3275-32783.



## ***Aeromonas fluvialis*, sp. nov., una nueva especie aislada de agua de r3o**

A. Alperi<sup>1</sup>, M., A. Monera<sup>2</sup>, A. Mart3nez-Murcia<sup>2</sup> y M. J. Figueras<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Microbiolog3a. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201, Reus.

<sup>2</sup>Molecular Diagnostics Center (MDC), Biomolecular Technologies S.L., y Universidad Miguel Hern3ndez, Orihuela E-03300, Alicante.

Las *Aeromonas* se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos, anaerobios facultativos, capaces de degradar nitratos a nitritos y fermentar la glucosa. Son organismos aut3ctonos del medio acu3tico considerados pat3genos de peces y anfibios, con una creciente implicaci3n en cl3nica. La taxonom3a de este g3nero es compleja debido a una alta similitud interespecie del gen ARN ribos3mico 16S, al solapamiento de los perfiles bioqu3micos as3 como a una insuficiente correlaci3n entre la identificaci3n genot3pica y fenot3pica. Gracias al estudio de diversos genes que codifican prote3nas con funciones esenciales (housekeeping) como el *gyrB*, *rpoD* etc. se ha podido esclarecer la taxonom3a del g3nero ya que estos genes aportan una mayor variabilidad interespecifica que el gen ARN ribos3mico 16S. En la actualidad el g3nero *Aeromonas* incluye 19 especies 2 de ellas (*A. aquariorum* y *A. tecta*) de reciente descripci3n.

En el a3o 2004 se aisl3 del r3o Muga (Girona) una cepa (717) que originalmente se identific3 como *A. veronii* ya que su patr3n de restricci3n del gen ribos3mico 16S era parecido, aunque no id3ntico, al descrito para esta especie. La secuencia del gen ARN ribos3mico 16S mostr3 una similitud del 99.4% con *A. veronii* y del 99.2% con *A. allosaccharophila*. El an3lisis filogen3tico con este gen situaba la cepa 717 en una rama independiente. En un estudio posterior, el an3lisis de la secuencia nucleot3dica del gen *rpoD* mostr3 que esta cepa pod3a pertenecer a una posible nueva l3nea filogen3tica aspecto que tambi3n fue confirmado con la secuenciaci3n de otros genes como el *gyrB*, *recA*, *dnaJ*, *dnaX*, y *gyrA*. Fenot3picamente la cepa 717 se diferencia del resto de *Aeromonas* por su respuesta negativa a la Arginina dehidrolasa (ADH) y al D-Manitol.

En base a estas evidencias fenot3picas y genot3picas se considera que la cepa 717 representa una nueva especie del g3nero *Aeromonas* para la cual se propone el nombre de *Aeromonas fluvialis*.



## Tres posibles nuevas especies de *Vibrio* dentro del clado de *Vibrio splendidus*

A.L. Diéguez, R. Beaz-Hidalgo, S. Prado, A.E. Toranzo y J.L. Romalde

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

Algunas especies del género *Vibrio* son importantes patógenos bacterianos que afectan al cultivo de moluscos bivalvos. Debido a los sucesivos episodios de altas mortalidades en poblaciones de almeja cultivada registrados en los últimos años en Galicia se hace necesario el estudio de la biodiversidad bacteriana asociada con el fin de detectar posibles nuevos patógenos. En el pasado, *V. splendidus* se ha considerado medioambiental, sin ningún significado patogénico específico. Sin embargo, cepas relacionadas con este grupo bacteriano se han asociado a mortalidades en moluscos (Lacoste y col., 2001; Gomez-León y col., 2005). Estudios de genotipado han demostrado la diversidad genética y la naturaleza polifilética de este grupo (Le Roux y col., 2001), pero hasta ahora no existe ningún método bioquímico que logre diferenciarlas. La técnica de polimorfismos de amplificación del DNA (AFLP) reveló la presencia de diversidad específica y permitió esclarecer la identificación de muchos aislados que estaban enmascarados en el grupo de *V. splendidus* por identificación fenotípica.

En este estudio, el análisis mediante AFLP de una colección de aislados asociados a almeja cultivada, permitió agrupar cepas tipo *V. splendidus* en tres clusters diferenciados con 9, 6 y 5 aislados cada uno. Los datos de la técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA) basado en 4 genes “housekeeping” y en el gen 16S rRNA agruparon las cepas dentro del grupo de *V. splendidus* en ramas independientes del resto de las especies. Los datos aportados por la hibridación DNA-DNA apoyan que podrían constituir tres nuevas especies del género *Vibrio*, dentro del clado de *V. splendidus*. Se realizó una caracterización bioquímica completa de los aislados apreciándose variabilidad en diversos caracteres pero, hasta el momento, no se han podido diferenciar de especies fenotípicamente muy similares.

Es interesante destacar que el aislado representativo de uno de los tres grupos resultó ser patógeno para almejas adultas, mostrando actividades citotóxica, en la línea celular de dorada SAF-1, y proteolítica asociadas a sus productos extracelulares.

Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M.L. y Novoa, B. (2005). *Appl Environ Microbiol* **71**, 98-104.

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., y col. (2001). *Dis Aquat Org* **46**, 139-145.

Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waetcher, M., Poubalannes, S., y col. (2002). *Aquat Living Resour* **15**, 251-258.



## **Evolución de la microbiota autóctona de un manantial mineral después del proceso de envasado**

M.C. de la Rosa, M. C. Pintado, C. Rodríguez y M. A. Mosso  
*Departamento de Microbiología II, Universidad Complutense, Madrid*

La microbiota autóctona de los manantiales de aguas minerales presenta una gran diversidad que depende de sus características fisicoquímicas (temperatura, pH, composición química). Cuando este agua se envasa se producen cambios de dicha microbiota, tanto en el número como en los tipos de microorganismos que la constituyen, debido a que se modifican las condiciones del punto de emergencia.

El objeto de este trabajo ha sido estudiar la microbiota autóctona de un manantial mineral bicarbonatado, sulfurado, en el punto de emergencia y en el agua envasada, a los cinco meses y al año, para conocer si había diferencias. Para ello, se ha realizado el recuento de bacterias heterótrofas y oligótrofas, incubadas a 22° C y 37° C, actinomicetos, hongos, microorganismos amonificantes, amilolíticos, celulolíticos, proteolíticos y sulfato-reductores. Además, se han investigado las bacterias oxidantes del azufre y del sulfhídrico, fotosintéticas del azufre, las del hierro, cianobacterias y algas.

El punto de emergencia y las muestras analizadas de agua envasada cumplen con la normativa española de las aguas de bebida envasadas (Real Decreto 1074/2002).

En el agua envasada se ha producido un aumento de dos a tres unidades logarítmicas en el número de los siguientes microorganismos: bacterias heterótrofas y oligótrofas a 22° C, hongos, microorganismos amilolíticos y proteolíticos. La multiplicación de estos microorganismos en los envases se debe a los cambios en las condiciones ambientales (temperatura y luz) que se producen durante el envasado y el almacenamiento. Tanto en el punto de emergencia como en el agua envasada se han detectado bacterias oxidantes del azufre y del hierro. En cuanto a los tipos de bacterias heterótrofas, en el manantial hay una gran diversidad y se han aislado bacilos Gram negativos, fermentadores y no fermentadores, bacilos Gram positivos, esporulados y no esporulados y cocos Gram positivos, pertenecientes a los *Phylum: Proteobacteria* (Clases:  $\alpha, \beta, \gamma$ ), *Firmicutes* y *Actinobacteria*. En el agua envasada predominan las bacterias con pigmentos amarillos, principalmente bacilos Gram negativos no fermentadores (*Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*) y bacilos Gram positivos no esporulados, irregulares (*Leifsonia aquatica*). Estas especies son frecuentes en aguas minerales, algunas son propias de los hábitats acuáticos y otras son ubicuas y necesitan muy pocos nutrientes para su crecimiento por lo que se consideran autóctonas.



## Caracterización taxonómica de cepas bacterianas pigmentadas de amarillo aisladas del Mar Mediterráneo

M.J. Pujalte, E. Alberici, J. Pascual, M.C. Macián, D.R. Arahay y E. Garay

*Departamento de Microbiología y Ecología y Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).  
Universidad de Valencia.*

Un grupo de 16 cepas aisladas de agua marina del Mediterráneo en diversos momentos del año, todas ellas bacilos Gram-negativos, no fermentadores y productoras de pigmentos amarillos han sido sometidas a una caracterización taxonómica que incluye la determinación de numerosas pruebas fenotípicas así como la secuenciación y análisis filogenético del gen rRNA 16S, con el fin de averiguar la adscripción taxonómica de las mismas. Los datos preliminares obtenidos con BLAST dividen el conjunto de cepas en dos grupos filogenéticamente distantes: el primero afiliado a las alfa-proteobacterias del género *Erythrobacter* y cercano a las especies *E. citreus* y *E. flavus*, ambas con pigmentación amarilla (en lugar de la característica rosa-roja de las especies previas) y el segundo ubicado en la familia Flavobacteriaceae, del phylum Bacteroidetes. Las secuencias de las cepas de este segundo grupo presentan valores de semejanza inferiores al 93% con cualquier miembro válidamente descrito hasta la fecha de dicha familia y son por tanto candidatos a constituir un nuevo género.

Las características fenotípicas que presentan ambos grupos son las siguientes:

*Erythrobacter sp.*: crecen en Marine Agar a temperaturas entre 15 y 37°C, pero no a 4° ni a 40°C, son capaces de desarrollarse a muy bajas salinidades –incluso sin sal añadida, aunque el crecimiento es débil– y lo hacen hasta el 9% de salinidad. Se comportan como quimioheterotrofos aerobios estrictos, oxidasa y catalasa positivos, incapaces de reducir nitratos o de fermentar azúcares, producir indol o ADH. No hidrolizan caseína, almidón, alginato, DNA, Tween-80 o lecitina. No presentan requerimientos nutricionales y son capaces de crecer con D-glucosa, D-fructosa, maltosa, D-celobiosa, piruvato, 2-cetoglutarato, succinato, fumarato, L-aspartato, L-tirosina y L-glutamato como únicas fuentes de carbono y energía en Basal Medium Agar.

Las flavobacterias, por su parte, crecen desde 4 a 37°C y entre 0,35 y 12% de salinidad total, son aerobias estrictas, oxidasa positivas, no fermentadoras y reducen los nitratos a nitritos, aunque no producen indol ni ADH. Tan sólo hidrolizan Tween 80, almidón y DNA, de entre los polímeros ensayados y son capaces de crecer con casi todos los carbohidratos probados en medio sintético como fuentes únicas de carbono y energía, presentando una capacidad menor para crecer con ácidos orgánicos y aminoácidos. Son inmóviles y no presentan movilidad deslizante aparente (“swarming”) en ninguno de los medios sólidos ensayados.

Este estudio ha sido financiado por el MEC a través del proyecto CGL2005-02292.



## Estudio de la variabilidad intraespecífica del patógeno de almeja *Vibrio tapetis* mediante MLSA

S. Balboa, A. Doce, A.L. Diéguez y J.L. Romalde

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

*Vibrio tapetis* es el agente causal de la enfermedad del anillo marrón, que produce elevadas mortalidades en almeja. Dentro de esta especie bacteriana pueden distinguirse tres grandes grupos diferenciados por sus características fenotípicas, antigénicas y genéticas asociadas a origen de hospedador, independientemente del lugar geográfico de aislamiento.

La tendencia actual en el estudio de la variabilidad bacteriana y el establecimiento de nuevos taxones (especie, subespecie) es el análisis de diferentes genes "housekeeping" (Multilocus Sequence Analysis, MLSA) como marcadores filogenéticos, dependiendo la elección de los genes de la familia o el género a estudiar.

En este trabajo presentamos el estudio de la variabilidad intraespecífica de *Vibrio tapetis* mediante el la técnica MLSA. Para ello, hemos incluido cepas con diferente origen geográfico aisladas de almeja japonesa, fina y babosa, así como de berberecho y de tres especies de pez: halibut, corvina y acedía. Estas cepas se han analizado utilizando el gen 16S rRNA y genes "housekeeping", entre otros *rpoA* y *atpA*, que han sido descritos como útiles para la discriminación de especies dentro del género *Vibrio*.

Para el análisis de los resultados analizamos cada gen independientemente y un concatenado de todos ellos. En todos los casos los resultados obtenidos confirman la variabilidad intraespecífica descrita previamente por otros métodos para esta especie. Por otro lado, pudimos observar que los aislados de almeja fina y japonesa se encuentran más próximos evolutivamente que el resto de aislados de pez, que permanecen en una rama independiente del árbol filogenético.



## Variabilidad intraespecífica de cepas de la especie *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* aisladas de peces marinos cultivados

A. Labella<sup>1</sup>, J.L. Romalde<sup>2</sup>, M.C. Alonso<sup>1</sup>, M. Manchado<sup>3</sup>, D. Castro<sup>1</sup> y J.J. Borrego<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

<sup>3</sup>IFAPA Centro El Toruño, Junta de Andalucía, El Puerto de Santa María, Cádiz.

Las técnicas basadas en la PCR están siendo ampliamente utilizadas para el tipado molecular de diversas especies bacterianas (Magariños *et al.*, 2000; Maluping *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006). El objetivo de este trabajo es estudiar la variabilidad intraespecífica de aislados de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, tanto a nivel fenotípico como genético. Para determinar la variabilidad a nivel genético se utilizaron 3 tres técnicas basadas en la PCR: el polimorfismo de ADN por amplificación aleatoria (RAPD), la presencia de secuencias intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC-PCR) y de elementos extragénicos palindrómicos repetitivos (REP-PCR).

Se analizaron un total de 20 cepas, 4 de referencia y 16 aisladas de diferentes peces marinos cultivados. La caracterización fenotípica de los aislados se realizó usando métodos estándares en tubo y placa y los sistemas miniaturizados API 20NE y API 20E. Para la extracción de ADN cromosómico se usó el kit comercial Instagene Matrix (Bio-Rad). Las técnicas RAPD, ERIC-PCR y REP-PCR se llevaron a cabo usando los kit comerciales Ready-to-Go RAPD analysis beads y Ready-to-Go PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech). Las imágenes capturadas de los productos de amplificación se analizaron con el software Diversity Database (Bio-Rad). El porcentaje de similitud entre los aislados se estimó utilizando el coeficiente de Dice. Para la construcción de los dendrogramas y análisis de los clusters se utilizó el método UPGMA (unweighted average pair group method).

A nivel fenotípico, los aislados analizados presentaron 7 perfiles diferentes, que no pudieron relacionarse ni con la especie piscícola hospedadora, el área geográfica o el brote de enfermedad. Con la técnica RAPD, utilizando los cebadores 5 y 4, los aislados se agruparon en 9 y 10 clusters, respectivamente. En ambos casos, el cluster principal agrupaba al 45% de las cepas. Las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR presentaron mayor poder discriminatorio, obteniéndose perfiles que agrupaban como máximo al 15-20% de los aislados, llegando a presentar 14 y 17 clusters diferentes, respectivamente.

Atendiendo a los resultados obtenidos queda patente la existencia de una gran variabilidad intraespecífica entre los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela*, tanto a nivel fenotípico como genético, coincidiendo con los resultados descritos por Botella *et al.* (2002), que sugerían la existencia de líneas clonales diferentes coexistiendo en diferentes piscifactorías de una misma área geográfica, en un corto periodo de tiempo (2-3 años). Estos resultados contrastan con los estudios realizados en la subespecie *piscicida* (Thyssen *et al.*, 2000), que describen una mayor homogeneidad entre aislados de esta subespecie.

Botella *et al.* 2002. *J. Appl. Microbiol.*, **93**: 681-8.

Magariños *et al.* 2000. *Epidemiol. Infect.*, **125**: 213-9.

Maluping *et al.* 2005. *J. Appl. Microbiol.*, **99**: 383-91.

Rodríguez *et al.* 2006. *Dis. Aquat. Organ.*, **69**: 175-83.

Thyssen *et al.* 2000. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 1013-9.





PREMIO A LA MEJOR TESIS DOCTORAL  
DE LA ESPECIALIDAD 2006-2007  
Dra. A. I. Mata



VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

---



## Desarrollo y estandarización de técnicas de PCR múltiple para la detección de patógenos bacterianos de importancia en acuicultura

A.I. Mata

Directores: J.F. Fernández-Garayzábal y A. Gibello

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

El presente estudio se ha basado en el diseño de diferentes ensayos de PCR múltiple, como técnica de diagnóstico alternativa a los métodos microbiológicos tradicionales, para la detección simultánea de varios patógenos bacterianos de peces.

En una primera parte, se ha desarrollado un ensayo de PCR múltiple para los principales patógenos bacterianos causantes de las estreptocosis de agua templada en peces (*Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus difficilis*), enfermedades que causan cada vez mayores pérdidas económicas en la acuicultura española. En la puesta a punto de este ensayo de PCR se comprobó, en primer lugar, la especificidad de los oligonucleótidos seleccionados, descritos en la bibliografía, a partir de lo cual se procedió al diseño de nuevos iniciadores para *S. iniae*, tomando como diana molecular el gen *lctO* de este patógeno, que codifica para la enzima lactato oxidasa. Los oligonucleótidos diseñados (denominados LOX-1 y LOX-2) amplifican de forma específica un fragmento de 870 pb del gen *lctO* de *S. iniae*. El límite de detección de esta PCR individual para la identificación de *S. iniae*, partiendo de ADN purificado, fue de 25 pg de ADN, y de 62-31 células por mezcla de reacción, partiendo de cultivos puros bacterianos. La PCR se ensayó también sobre tejidos de peces inoculados artificialmente, obteniéndose, en este caso, un límite de detección de  $4 \times 10^3$  células/g de riñón y de  $5 \times 10^3$  células/g de hígado o cerebro.

Las cuatro parejas de oligonucleótidos iniciadores que finalmente se emplearon en la PCR múltiple desarrollada para la detección simultánea de los principales patógenos productores de estreptocosis, fueron: pLG-1/pLG-2 para *L. garvieae*, LOX-1/LOX-2, diseñados en este estudio, para *S. iniae*, Spa-2152/Spa-2870 para *S. parauberis* y Sdi-61/Sdi-252 para *S. difficilis*. La combinación de estas cuatro parejas de oligonucleótidos en un mismo tubo de reacción dio lugar a la amplificación simultánea y específica de los patógenos bacterianos seleccionados, obteniéndose los fragmentos de tamaños esperados (1100, 870, 718 y 192 pb, respectivamente). El límite de detección de este ensayo de PCR empleando ADN purificado de las distintas cepas bacterianas tipo, fue de 25 pg para *S. iniae*, 12,5 pg para *S. difficilis*, 30 pg para *S. parauberis* y 50 pg en el caso de *L. garvieae*. Partiendo de cultivos puros bacterianos, los límites de detección hallados por reacción fueron de 62 a 31 células de *S. iniae*, *S. parauberis* y *L. garvieae*, y de 250 a 125 células de *S. difficilis*. La efectividad de esta PCR se comprobó mediante la detección de los patógenos en tejidos de peces inoculados artificialmente, obteniéndose unos límites de detección de  $5 \times 10^3$  células/g para *S. iniae*,  $1,2 \times 10^4$  células/g para *S. difficilis*,  $1 \times 10^4$  células/g para *S. parauberis* y  $2,5 \times 10^3$  células/g para *L. garvieae*. Además, la PCR se aplicó con éxito al diagnóstico de estreptocosis en peces enfermos de forma natural. La concentración de *L. garvieae* existente en tejidos de peces infectados naturalmente se determinó comprendida en un rango entre  $5 \times 10^3$  y  $1,5 \times 10^7$  células/g de tejido.

Se ha realizado también la identificación y caracterización de nueve aislados de *Streptococcus phocae*, obtenidos a partir de muestras de salmón atlántico (*Salmo salar*), procedentes de Chile, tratándose del primer caso descrito de aislamiento de este patógeno a partir de salmón atlántico.



En una segunda parte de este estudio, se ha desarrollado una PCR múltiple para la detección simultánea de patógenos bacterianos de peces potencialmente zoonóticos: *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae* y *Mycobacterium marinum* (y otras micobacterias no tuberculosas), que pueden transmitirse al hombre a través de la manipulación de peces infectados, vivos o muertos y, en el caso de *V. vulnificus*, también a través del consumo de marisco contaminado crudo o mal cocinado. Por tanto, esta PCR podría ser, desde el punto de vista de la salud pública, una herramienta importante para el control microbiológico de los peces y el marisco.

Las tres parejas de oligonucleótidos que, tras las pruebas de especificidad, se seleccionaron para esta PCR fueron Dvu9V/Dvu45R para *V. vulnificus*, Sin-1/Sin-2 para *S. iniae* y M-5/RM-3 para las micobacterias pertenecientes al complejo micobacteriano no tuberculoso (NTM). Su combinación, en un mismo tubo de reacción, dio lugar a la obtención específica y simultánea de los fragmentos de tamaño esperado correspondientes a cada patógeno (978, 300 y 136 pb, respectivamente). El límite de detección de este ensayo de PCR múltiple, partiendo de ADN purificado, fue de 50 pg para *V. vulnificus*, 0,19 pg para *S. iniae* y 50 pg para *M. marinum*. En tejidos de peces que fueron inoculados artificialmente con los patógenos bacterianos objeto de estudio se obtuvieron límites de detección de  $1,2 \times 10^4$  células/g para *V. vulnificus*,  $9,5 \times 10^3$  células/g para *S. iniae* y  $1,3 \times 10^4$  células/g para *M. marinum*, obteniéndose los mismos resultados con independencia de la especie de pez o el tipo de tejido utilizado. La efectividad de esta PCR se comprobó mediante su aplicación sobre tejidos de tencas europeas infectadas de forma natural con *Mycobacterium peregrinum*, para confirmar los resultados obtenidos mediante la realización de análisis microbiológicos, obteniéndose, en todos los casos, el fragmento del tamaño esperado de 136 pb.



Sesión:  
**PATOLOGÍA DE ESPECIES ACUÍCOLAS**

Moderadores:  
**Sara Isabel Pérez**  
**Juan Luis Barja**

**Alicia Estévez**  
**M<sup>a</sup> Teresa Pérez**

**Jesús L. Romalde**  
**Juan José Borrego**



VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

---



## Estudios de transmisión del virus de linfocistis (LCDV) en larvas de doradas (*Sparus aurata*, L)

I. Cano<sup>1</sup>, E. García-Rosado<sup>2</sup>, J.B. Ortiz-Delgado<sup>1</sup>, B. López-Jimena<sup>2</sup>, M.C. Alonso<sup>2</sup>, D. Castro<sup>2</sup>, J.J. Borrego<sup>2</sup> y C. Sarasquete<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN), CSIC, Puerto Real, Cádiz

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Málaga

La enfermedad de linfocistis, cuyo agente etiológico es el iridovirus de linfocistis (LCDV) es la principal enfermedad de origen vírico detectada en casi todas las piscifactorías mediterráneas afectando principalmente a doradas (*Sparus aurata*, L.). Por ello es fundamental para el control de esta epizootia el determinar las posibles vías de transmisión vírica en larvas de doradas cultivadas en una piscifactoría con brotes reiterados de LCDV.

El ADN vírico se detectó en muestras de tanques de larvas de distintas edades, así como de huevos de distintas puestas recogidos directamente de los decantadores mediante un ensayo específico de PCR-hibridación (Cano et al. 2007). En todos los casos se confirmó la presencia de viriones infectivos mediante observación de efectos citopáticos en células SAF-1. El análisis de la sangre de los reproductores mediante nested-PCR permitió establecer que un 34% son portadores asintomáticos del virus. También se detectaron LCDV infectivos en los cultivos de rotíferos y nauplios de *Artemia* utilizados en el criadero.

Para evaluar las posibles vías de transmisión del LCDV se partió de una población de huevos de dorada, procedente de una misma puesta, que dieron un resultado positivo mediante PCR-hibridación. Estos huevos se eclosionaron en las instalaciones del ICMAN<sup>1</sup>, y las larvas se mantuvieron en tanques cónicos en circuito abierto. Mediante hibridación *in situ* (HIS) se detectó genoma vírico en larvas de 2 días post-eclosión, mientras que la detección de antígenos víricos mediante inmunohistoquímica (IHQ) fue posible a los 4 días post-eclosión. En ambos casos, la señal se observó en grupos de células localizadas en el tejido conectivo de la piel.

Una parte de los huevos LCDV-positivos se trató con un desinfectante comercial a base de yodo. Tras la desinfección, los análisis de PCR-hibridación fueron negativos. Tampoco fue posible detectar el virus mediante HIS ni IHQ en las larvas eclosionadas a partir de los huevos desinfectados. Estos resultados indican una localización superficial del virus en el corion del huevo, lo que parece descartar la transmisión vertical del mismo. Sin embargo, se requieren otros estudios para establecer el origen de la contaminación de los huevos.

Las larvas LCDV-negativas, procedentes de huevos desinfectados, se alimentaron con una mezcla de rotíferos y nauplios LCDV-positivos. Mediante IHQ se detectaron antígenos virales en el tubo digestivo de las larvas 3 días después de comenzar la alimentación, lo que indicaría una transmisión del virus vía alimentaria.

Cano et al. (2007). J. Appl. Microbiol. 102:32-40.



## Presencia de birnavirus acuáticos en peces procedentes de las rías de Galicia

J.M. Cutrin<sup>1</sup>, I. Bandín<sup>1</sup>, A. Silva<sup>1</sup>, E. Areoso<sup>2</sup>, J.L.Barja<sup>1</sup> y C.P. Dopazo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela*

<sup>2</sup>*Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Delegación de Coruña, Xunta de Galicia*

En el marco de un convenio entre nuestro laboratorio y Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia, y como complemento de un proyecto Jacumar paralelo, en noviembre de 2007 se realizó un muestreo de las poblaciones de peces existentes en las rías gallegas para evaluar la presencia en las mismas de birnavirus acuáticos. Se analizó un total de 213 peces de diferentes especies: múgel (57); lenguado (27); salmonete (21); lubina (17); boga (15); abadejo (13); besugo (12); acedía (11); coruxo (10); sargo (6); raya (5); jurel (5); corvina (4); rodaballo (4); palometa (3); pez aguja (1); caballa (1) y solla (1). La mayoría de estos peces procedían de pesca de bajura, principalmente de las lonjas de Vigo, Ribeira y Coruña pero también se capturaron y se analizaron dos especies “merodeadoras” de plantas de acuicultura como son el múgel y la boga.

Los individuos se trasladaron en hielo a las instalaciones del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela para proceder a su análisis virológico. Se procesaron por separado muestras de bazo y riñón y se inocularon en las líneas celulares CHSE-214, BF-2 y EPC. Los cultivos se observaron semanalmente durante al menos un mes, con el objeto de detectar el desarrollo de algún efecto citopático (ECP) producido por la multiplicación viral y se realizaron como mínimo dos subcultivos. Los aislados virales así obtenidos se identificaron mediante RT-PCR utilizando cebadores para los virus objeto de análisis.

Se detectó la presencia de aquabirnavirus en 29 peces (13.6% del total de peces analizados). Entre los peces infectados destacan especies que se cultivan actualmente como rodaballo (50%), abadejo (30%), lubina (29%), acedía (18%), besugo (16%) y lenguado (14%). En especies no cultivadas en la actualidad su presencia es variable. Parece no estar presente en salmonete, sargo, solla, raya, pez aguja, corvina y caballa pero sí en palometa (33%) y jurel (20%) aunque el número de peces muestreados es muy bajo (3 y 5 respectivamente) y en coruxo (10%), en este caso con un mayor número de capturas.

Por área geográfica no podemos determinar zonas con peces más infectados que otras. Se detectó la presencia de birnavirus acuáticos en las lonjas de Coruña (17%), Vigo (16%) y Ribeira (11%). Por otra parte su presencia en peces merodeadores no es de gran importancia, no estando presente en bogas aunque si en múgeles (10%).



## **El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa de salmónidos: Caracterización molecular de aislados españoles y chilenos**

A. I. de las Heras<sup>1</sup>, S. Rodríguez Saint-Jean<sup>1</sup>, A. Romero<sup>2</sup>, C. Ortega<sup>2</sup>, M. Monrras<sup>2</sup>, R. Enríquez<sup>2</sup> y S. I. Pérez Prieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Investigaciones Biológicas. (CIB) (CSIC). Dpto Microbiología Molecular. Madrid.*

<sup>2</sup>*Instituto de Patología Animal. Laboratorio de Iciopatología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia (Chile)*

En España, el cultivo de salmónidos tradicional y mas importante desde el punto de vista productivo es el de trucha arco iris, del que somos el 5º productor europeo. En Chile, el principal cultivo de salmónidos lo constituye el salmón Atlántico, de gran trascendencia socio-económica puesto que este país es el segundo productor mundial, con unas 285.000 Tm anuales. Durante mucho tiempo, Chile se había visto libre de los virus que afectan habitualmente a los salmónidos, pero en los últimos años la descripción y aislamiento del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es frecuente, y se ha convertido en motivo de preocupación para el sector.

En un proyecto conjunto hemos realizado un estudio de caracterización de 20 aislados del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) chilenos y españoles que han presentado diversos grados de virulencia en poblaciones cultivadas de salmón y trucha. La caracterización se ha basado en aspectos serológicos, de mortalidad acumulativa, títulos infectivos y variaciones genómicas, centrándonos en el gen que codifica la región hipervariable de la proteína VP2. Esta es la proteína mayoritaria de la cápsida, es antigénica y en ella pueden residir motivos correlacionados con la virulencia.

Junto a otras características virológicas, se han comparado las secuencias genómicas de la proteína VP2 y se ha analizado esta proteína mediante geles bidimensionales en los diferentes aislados. Estas primeras aproximaciones son novedosas en este virus y hemos correlacionado los patrones con los serotipos tradicionales. Se ha determinado que nuestros aislados españoles pertenecen a los dos serotipos mas abundantes en Europa, el serotipo A2 (Sp) y el A3 (Ab), no se ha detectado el serotipo A1 (VR-299 o West-Buston) que es el característico de Norte América, todo ello confirma anteriores observaciones de nuestro grupo y de otros. Sin embargo en Chile los serotipos encontrados son A2 y A1, incluso podemos hablar de aislados con mezcla A2/A1. La virulencia de las cepas no siempre sigue el patrón conocido en el que los serotipos 1 y 2 producen mayores mortalidades y el serotipo 3 es menos virulento.

Este tipo de estudios de caracterización molecular del IPNV tiene interés para la evaluación de vacunas específicas y la aplicación de nuevos métodos de diagnóstico.

Estos experimentos se han realizado con financiación del Plan Nacional de I+D del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) proyectos AGL2004-1937 y Accion Complementaria AGL2004-0382E). A I de las Heras es becaria predoctoral del MEC.



## **Infección experimental de juveniles de rodaballo, lenguado y trucha común con cepas del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) aisladas de peces salvajes de origen marino**

M. Lago, J.G. Oliveira, M. Conde, C.P. Dopazo e I. Bandín

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

En este trabajo se ha evaluado la susceptibilidad de juveniles de rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lenguado (*Solea senegalensis*) y trucha común (*Salmo trutta fario*) a la infección experimental con cinco cepas del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) aisladas de peces salvajes capturados en el banco pesquero Flemish Cap (Terranova). Para ello, se utilizaron tres cepas aisladas de gallineta (*Sebastes mentella*), una cepa aislada de fletán (*Reinhardtius hippoglossoides*) y una de coreano (*Glyptocephalus cynoglossus*) que se inocularon vía inyección intraperitoneal en una dosis de  $10^5$  TCDI<sub>50</sub>/ml.

Los peces se mantuvieron a 15°C durante un período de tiempo máximo de 20-30 días y se observaron diariamente para detectar signos de enfermedad y retirar los posibles muertos. Debido a la baja mortalidad observada en experimentos previos, se procedió al sacrificio de un grupo de supervivientes al cabo de diez días, repitiendo esta operación en intervalos de 5 días.

A partir de cada pez muerto o sacrificado se extrajeron en condiciones asépticas muestras de riñón y bazo que se mantuvieron congelados hasta su uso. Al final de cada experimento se procedió al análisis virológico (mediante aislamiento en cultivo celular y RT-PCR) de todos los peces en lotes de aproximadamente 5 individuos.

Los mayores niveles de mortalidad se dieron en rodaballos y lenguados de pequeña talla, siendo en general bajos para todos los experimentos. A pesar de ello, el virus se aisló en cultivo celular de todos los lotes infectados y se identificó por RT-PCR.

Con el objetivo de confirmar la replicación viral en cada individuo infectado, se realizaron dos experimentos con las tres cepas aisladas de gallineta en las condiciones descritas, pero en los que los peces se analizaron individualmente, siendo el resultado positivo en todos los individuos tanto por cultivo celular como por RT-PCR.



## Secuenciación del genoma del primer virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) aislado de anguila europea (*Anguilla anguilla*)

A. Montesinos<sup>1</sup>, K. Hodneland<sup>2</sup>, C. Sexton<sup>1</sup>, E. Sanjuán<sup>1</sup> y C. Amaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia. <sup>2</sup> Unidad de Zoología Marina, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva.

La anguila europea (*Anguilla anguilla*) es un pez que se cultiva en ciertas piscifactorías españolas, las cuales llevan a cabo un proceso de engorde de alevines hasta alcanzar un tamaño óptimo. Puesto que no se ha podido reconstruir el ciclo vital de la anguila en cautividad, la introducción de angulas procedentes del medio natural resulta imprescindible para una producción en continuo. Sin embargo, este hecho constituye una importante vía de entrada de patógenos, que pueden mermar la población cultivada.

Años atrás, los cultivos de anguila se veían azotados por brotes de infecciones bacterianas, como la vibriosis causada por *Vibrio vulnificus*, que alcanzaban mortalidades muy elevadas. Puesto que ciertas terapias, como la vacunación, han surtido efecto y se ha conseguido controlar la incidencia de estos brotes, en la actualidad empiezan a adquirir relevancia patologías emergentes que en el pasado eran minoritarias, pero que ahora se detectan con mayor frecuencia

En este trabajo se describe el proceso de aislamiento y cultivo de un virus muy virulento para angulas en proceso de pre-engorde, que ocasiona pérdidas importantes en empresas de la Comunidad Valenciana. A su vez, también se ha realizado la secuenciación del genoma vírico para identificar el agente etiológico de estos brotes, concluyendo que se trata de un virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

Por último, este aislado se ha situado en el conjunto de genogrupos que constituyen el taxón mediante la elaboración de un árbol filogenético, situándose cerca del genogrupo II.



## Detección de herpesvirus en anguilas procedentes de la albufera de Valencia

S. Souto<sup>1</sup>, J.M. Cutrín<sup>1</sup>, C. Esteve<sup>2</sup>, E. Alcaide<sup>2</sup>, C. López-Vázquez e I. Bandín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Acuicultura. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela. A Coruña.*

<sup>2</sup>*Departamento de Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia.*

En el mes de octubre de 2007 se recibieron en el laboratorio de Ictiopatología del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela un total de 63 muestras de bazo de anguilas procedentes de la albufera de Valencia. Todas ellas se sometieron a un examen virológico para detectar los virus de RNA más comunes en Europa: IPNV, VHSV y Betanodavirus. Debido a la escasez de muestra solo se pudo extraer DNA de 43 de ellas para detectar la presencia del *Anguillid herpesvirus*.

El DNA extraído de las muestras se sometió a análisis mediante PCR con los cebadores HVAPOLVPSD/ HVAPOLOOSN (Rijsewijk y col., 2005) diseñados específicamente para la detección del herpesvirus de la anguila a partir de una secuencia consenso de una región conservada del gen de la DNA polimerasa viral. Se obtuvo amplificación específica en once de las muestras, observándose una banda de aproximadamente 394 pb. Estos resultados se confirmaron mediante secuenciación.

La inoculación de las muestras en la línea celular BB (Brown bull head catfish) permitió el aislamiento del *Anguillid herpesvirus* a partir de dos de las once muestras y la identidad del aislado viral se confirmó mediante PCR.

### Referencias

Rijsewijk, F., Pritz-Verschuren, S., Kerkhoff S., Botter A., Willemsen, M., Van Nieuwstadt, T., Haenen O. (2005). *Development of a polymerase chain reaction for the detection of Anguillid herpesvirus DNA in eels based on the herpesvirus DNA polymerase gene*. Journal of Virological Methods 124, 87-94



## Vancrobactina vs. anguibactina: evolución de dos sistemas de biosíntesis y transporte de sideróforos en *Vibrio anguillarum*

M. Balado, M.C. Cerviño, A.J. Rivas, C.R. Osorio y M.L. Lemos

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

*Vibrio anguillarum* es el agente causal de la vibriosis en peces, una septicemia hemorrágica que causa importantes pérdidas en la acuicultura. En el proceso infeccioso los sistemas de captación de hierro mediados por sideróforos desempeñan un papel importante, y en *V. anguillarum* se han descrito dos sistemas diferentes. El de la anguibactina, ampliamente estudiado y asociado al serotipo O1, está codificado principalmente en el plásmido pJM1. Del de la vancrobactina, asociado al serotipo O2, se conocía únicamente su existencia y se suponía que estaba codificado en el cromosoma, dado que las cepas productoras de vancrobactina no contienen plásmidos de gran tamaño.

Nuestro grupo ha caracterizado una región cromosómica de 28 kb, que contiene once genes (genes *vab*) que forman el “cluster” responsable de la síntesis de vancrobactina, genes reguladores, genes implicados en la secreción del sideróforo una vez ha sido sintetizado, el gen de la esterasa indispensable para la utilización del ferri-sideróforo intracelular, así como el gen del receptor de membrana (*fvfA*). Al profundizar en el conocimiento del sistema que codifica la síntesis y transporte de vancrobactina, se ha puesto en evidencia que:

- 1- Los genes plasmídicos *angACEB*, que intervienen en la síntesis de anguibactina, son parálogos de los *vabACEB* (síntesis de vancrobactina). Además, para la síntesis de anguibactina es necesario tener una copia intacta del *vabA*, pues el gen homólogo codificado en el plásmido pJM1 (*angA*) está incompleto.
- 2- Hemos comprobado cómo todas las cepas que portan el pJM1 tienen una transposasa insertada en *vabF*, lo que inactiva la síntesis de vancrobactina. Los trabajos de Crosa y col. demostraron que la eliminación de esta transposasa reactiva la síntesis de vancrobactina, aunque cuando ambos sistemas están activos la anguibactina es predominante. Además, la transposasa parece tener origen plasmídico.
- 3- Nuestros resultados indican que existe una copia cromosómica de los genes *fatABCD*, que codifican proteínas de transporte del sideróforo anguibactina, y una ATPasa todavía no caracterizada, todos ellos presentes en el plásmido pJM1. Aunque la homología es cercana al 100%, estos genes están organizados de forma diferente. Este cluster está inactivado al tener una transposasa insertada en el inicio de *fatD*.

Todo lo que se conoce hasta ahora parece sugerir que el sideróforo ancestral es la vancrobactina, y se abren nuevos e interesantes interrogantes acerca del origen del plásmido pJM1.



## **Factores que controlan el crecimiento de bacterias autóctonas del medio marino en cultivos mixtos con *Vibrio anguillarum***

E.P. Lago, N.F. González, M. López, T.P. Nieto y R. Farto

*Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo, Vigo*

La investigación actual en acuicultura se centra en la aplicación de suplementos vivos de bacterias con capacidad de modificar la microbiota del entorno de un sistema de cultivo. Estos suplementos son considerados probióticos y su uso, dependiendo del caso, podrá favorecer la alimentación del organismo cultivado, mejorar la calidad de agua de cultivo y podría prevenir directamente el crecimiento o colonización de los patógenos, potenciando el desarrollo final del organismo cultivado. Este último aspecto define una estrategia de control biológico de gran utilidad para la producción acuícola.

Entre los factores que controlan el crecimiento de poblaciones bacterianas se encuentran la competencia por nutrientes y el acúmulo de sustancias inhibitorias. En este trabajo se han analizado estos dos aspectos “in vitro” midiendo las diferencias en las velocidades de crecimiento de las cepas a comparar, cuándo eran cultivadas por separado o introducidas juntas en un mismo sistema de cultivo cerrado. Para ello se representaron las curvas de crecimiento de cada una de las cepas estudiadas, se calculó su constante de velocidad (K) y se analizaron los resultados estadísticamente.

Se emplearon parejas de cepas formadas por una cepa potencialmente probiótica y una patógena de *V. anguillarum*. En un trabajo previo se analizó el potencial probiótico en medio sólido de cepas del género *Vibrio* asociadas al cultivo de organismos marinos, cultivados en las costas gallegas, caracterizados e identificados por nuestro equipo de investigación. Basándose en esos resultados se seleccionaron 3 cepas potencialmente probióticas que inhibían el crecimiento de *V. anguillarum* en placa.

Los resultados han demostrado que las velocidades de crecimiento no influyen en la respuesta inhibitoria de las cepas potencialmente probióticas, en los medios de cultivo ensayados, ya que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar las constantes de velocidad mediante el test de t Student. Sin embargo, una de las cepas disminuyó el tamaño final de población de *V. anguillarum* cuando se inocularon concentraciones similares de ambas cepas. Cuándo se inoculó una concentración mayor se obtuvo una inhibición total del patógeno.

Este análisis ha permitido determinar que una de las cepas potencialmente probióticas, podría controlar el crecimiento de *V. anguillarum* por el acúmulo de sustancias inhibitorias y no por competencia por nutrientes en los medios de cultivo ensayados. Estos resultados en medio líquido confirman la capacidad inhibitoria de la cepa potencialmente probiótica y que sea factible la realización de bioensayos.



## **Evolución de la infección experimental por dos biotipos de *Vibrio parahaemolyticus* (no diarreico y diarreico) en almejas *Ruditapes phillipinarum*, durante la post-cosecha**

C. López-Joven<sup>1,2</sup>, I. de Blas<sup>2</sup>, I. Ruiz-Zarzuela<sup>2</sup>, L. Elandaloussi<sup>1</sup>, D. Furones<sup>1</sup> y A. Roque<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IRTA, Sant Carles de la Ràpita. <sup>2</sup> Laboratorio de Ictiopatología, Universidad de Zaragoza, Zaragoza

Los moluscos son conocidos como potenciales portadores de *Vibrio parahaemolyticus*, tanto diarreico, como no diarreico. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio demostraron que las densidades máximas de incorporación de estos dos vibrios son muy similares en condiciones experimentales. Sin embargo, todavía se desconocen los mecanismos que utilizan para ello, y la cinética de crecimiento de estos vibrios en bivalvos de interés comercial, a diferentes temperaturas post-cosecha.

En el presente trabajo, se evaluó la cinética de crecimiento de dos biotipos de *Vibrio parahaemolyticus* en almejas (*Ruditapes phillipinarum*), durante el almacenamiento a 4, 15 y 28 °C, respectivamente. Un biotipo teóricamente no diarreico, demostrado por la ausencia de los genes *tdh* y *trh* (i747) y otro teóricamente diarreico, con los genes *tdh* y *Orf8* (i678). Las almejas, fueron previamente depuradas en un sistema de “raceways” de flujo abierto con agua filtrada e irradiada con luz UV. En un primer experimento las almejas se expusieron en un sistema cerrado, con aireación, a una densidad bacteriana de  $5 \times 10^8$  UFC/ml para i747 y  $2 \times 10^8$  UFC/ml para i678; mientras que en un segundo experimento las densidades de i747 fueron de  $1,48 \times 10^8$  UFC/ml e i678 de  $8,9 \times 10^7$  UFC/ml. Cada 24 horas, se tomaron muestras para el recuento microbiano, por conteo diferencial de unidades formadoras de colonias (UFC), en placas de medio Chromagar Vibrio, hasta las 96 horas.

Los resultados preliminares obtenidos indican que a una misma temperatura, ambos biotipos de *V. parahaemolyticus*, siguen una cinética de crecimiento bastante homogénea, observándose pequeñas diferencias significativas. Se observó un incremento inicial del crecimiento de estos dos biotipos de vibrio, directamente proporcional a la temperatura de almacenaje, que posteriormente disminuyó, para las almejas almacenadas a 15 y a 4 °C. Sin embargo, dicho incremento en la concentración de los biotipos inoculados, se mantuvo durante todo el periodo en estudio en el grupo de almejas almacenadas a 28°C.

Los resultados de ambos experimentos sugieren que estudios futuros se puedan llevar a cabo usando un biotipo no diarreico que es mas seguro para el experimentador y su laboratorio.



## Identificación de genes regulados por hierro en *Vibrio alginolyticus* TA15 mediante la realización de un ensayo de titulación de Fur (FURTA)

A.J. Rivas, M. Balado, M.C. Cerviño, M.L. Lemos y C.R. Osorio

*Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela*

La vibriosis es una de las enfermedades que causa grandes pérdidas económicas en cultivos de peces y moluscos tanto marinos como de agua dulce. *Vibrio alginolyticus* TA15 fue aislado como organismo causal primario en dos episodios de mortalidad en cultivos de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) en Galicia. Sabemos que esta cepa produce un sideróforo, el cual puede ser de tipo hidroxamato, pero no se conocen los genes involucrados en su biosíntesis y transporte, y tampoco se ha demostrado si este patógeno puede utilizar otro tipo de fuentes de hierro. En este estudio realizamos un ensayo de titulación del represor Fur (ferric uptake regulator) con el fin de identificar genes regulados por hierro en *Vibrio alginolyticus* TA15. Algunos de los clones identificados contenían genes relacionados con la síntesis y transporte de un sideróforo. Estos genes forman parte de un operón muy similar al descrito en *Vibrio alginolyticus* MVP01, el cual está involucrado en la síntesis y captación de un sideróforo altamente similar a la vibrioferrina. Es interesante señalar que encontramos genes que codifican tres receptores diferentes de membrana externa TonB-dependientes, que presentaron homología con FepA, IutA y FhuE respectivamente. Estos datos sugieren la potencialidad de esta bacteria para utilizar sideróforos exógenos de otras especies microbianas. También identificamos genes englobados en un operón que presentaban similitud con genes implicados en la utilización de hemina como fuente de hierro, así como también genes pertenecientes a dos sistemas TonB diferentes regulados por Fur. Para realizar un análisis funcional de ambos sistemas, mediante la técnica de intercambio alélico, generamos mutantes de dos genes, *hutA* y *pvsA*, involucrados en la captación de hemina y síntesis de sideróforos respectivamente. El mutante del gen *pvsA* es incapaz de crecer en condiciones limitantes de hierro y no produce sideróforos. La secuencia del gen *pvsA* mostró ser prácticamente idéntica a la de su homólogo de *Vibrio alginolyticus* MVP01, lo cual sugiere que ambas cepas producen el mismo tipo de sideróforo. La cepa mutante en el gen *hutA* no mostró un fenotipo claro, estando su capacidad de utilizar hemina poco afectada. Ello sugería la posibilidad de la existencia de un segundo receptor. Tras una búsqueda de genes candidatos en el genoma de la cepa *Vibrio alginolyticus* 12G01 identificamos el gen de un posible receptor de grupos hemo. En este momento estamos construyendo mutantes simples para este gen, así como mutantes dobles para ambos receptores. Nuestros resultados sugieren que *Vibrio alginolyticus* TA15 puede utilizar al menos dos sistemas distintos para la captación de hierro: un sistema dependiente de sideróforos y un sistema basado en la utilización de grupos hemo, en el que estarían implicados diferentes receptores alternativos.



## Comparación de la composición de vibrios en almejón de sangre (*Callista chione*) de dos poblaciones de Cataluña

A. Roque<sup>1</sup>, B. Gómez-Gil<sup>2</sup>, B. Lacuesta<sup>1</sup>, J. Perez<sup>1</sup>, L. Elandaloussi<sup>1</sup> y M. Delgado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IRTA-Sant Carles de la Ràpita, Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentaries, España

<sup>2</sup>Unidad Mazatlán, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Sinaloa, México

Los bancos naturales del almejón de sangre *Callista chione*, están actualmente sobreexplotados. La investigación dirigida a poder cultivar esta especie ha detectado sólo con enfermedades bacterianas. Los vibrios están frecuentemente asociados a enfermedades en animales acuáticos cultivados. Para poder interpretar resultados y apoyar al diagnóstico de estas enfermedades, es importante contar con información sobre el número y las especies bacterianas que colonizan a individuos sanos. Para lograr este objetivo, se obtuvieron almejones del medio natural (Arenys de Mar) y cultivados en sistemas cerrados en el Delta del Ebro (IRTA). De cada localidad, se analizaron diez ejemplares adultos de los cuales se obtuvieron un promedio de diez colonias bacterianas seleccionadas al azar a partir de agar TCBS. En total se preservaron para análisis 209 aislados (124 de Arenys y 85 del IRTA), de éstos, se extrajo ADN y se han caracterizado molecularmente mediante rep-PCR (cebador GTG<sub>5</sub>) a la fecha, 101 aislados. Para la identificación, el patrón de bandas obtenido se comparó contra todas las cepas tipo y de referencia pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* y si se agrupan con alguna de las especies conocidas, se obtiene una identificación positiva. En caso contrario, se secuenciará el gen 16S rARN.

Preliminarmente, se han identificado 95 aislados (94,06% de los caracterizados); de éstos, sólo se encontraron *Pseudoalteromonas* sp. (2 aislados) y *V. kanaloe* (15) en las muestras de Arenys del Mar. Mientras que una potencial nueva especie de *Vibrio* (6) solo se encontró en el IRTA, , la cual ya está en proceso su descripción. En ambas localidades, se detectó *Vibrio campbellii* (4), *V. cyclitrophicus* (13), *V. harveyi* (8), *V. parahaemolyticus* (21) y *V. rotiferianus* (26). De las almejas obtenidas del medio natural, *V. kanaloe* se ha encontrado en todos los organismos analizados, *V. rotiferianus* en cuatro organismos, y el resto sólo en uno. Por el contrario, en los almejones cultivados, *V. cyclitrophicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. rotiferianus* se encontraron en casi todos los organismos y *V. campbellii* y *V. harveyi* sólo en dos y tres organismos respectivamente. Se puede concluir, que los almejones de Arenys del Mar presentan, hasta el momento, una menor diversidad que los del IRTA.



## **Análisis de vibrios aislados del lenguado (*Solea senegalensis*) obtenidos de tres localidades en España**

B. Gómez-Gil<sup>1</sup>, L. Dongankaya<sup>2</sup>, D. Furones<sup>3</sup>, N. Duncan<sup>3</sup>, E. Salas<sup>4</sup>, I. García de la Banda<sup>5</sup>, J.P. Cañavate<sup>4</sup>, C. Lobo<sup>5</sup> y A. Roque<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad Mazatlán, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, México

<sup>2</sup>Department of Fisheries and Aquaculture, Ankara University, Turkia

<sup>3</sup>IRTA-Sant Carles de la Ràpita, Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentaries, España

<sup>4</sup>Departamento de Cultivos Marinos y Recursos Pesqueros, IFAPA Centro el Toruño, España

<sup>5</sup>Planta Experimental de Cultivos Marinos, Santander, Instituto Español de Oceanografía, España

Se caracterizaron por medio de rep-PCR con el cebador (GTG)<sub>5</sub>, 334 aislados de lenguados (*Solea senegalensis*) obtenidos en agar TCBS. 212 de El Toruño, Cádiz (77 aislados del sistema de cultivo externo y 135 del interno, todos de organismos sanos), 71 del IRTA, Delta del Ebro (33 aislados de organismos enfermos y 38 de sanos) y 51 del IEO Santander a partir de organismos sanos. La identificación fue mediante comparación de genotipos con cepas tipo y de referencia y de aquellos aislados que no mostraban similitud con especies conocidas por éste métodos, se secuenció el primer tercio del gen 16S rARN.

Dos aislados se identificaron solo a nivel de género y 89.22% de los aislados se han podido identificar a nivel especie. Se han identificado nueve géneros, *Pseudoalteromonas* (6 aislados), *Shewanella* (6), *Acinetobacter* (1), *Marinomonas* (1), *Photobacterium* (1), *Psychrobacter* (4), *Salinivibrio* (1), *Staphylococcus* (4) y *Vibrio* (260). De *Vibrio*, se identificaron 18 especies; *V. parahaemolyticus* fue la especie mas común (23.5 % de los aislados identificados) seguida de *V. scophthalmi* (15.8%) y *V. ponticus* (12.7%). *Shewanella fidelis*, *V. cyclitrophicus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. ponticus*, *V. rotiferianus* y *V. scophthalmi* se encontraron en todas las localidades.

La única especie encontrada en un organismo enfermo fue *V. fortis*, pero sólo fue un aislado; *V. chagasii*, *V. crassostreae*, *V. fischeri*, *V. lentus*, *V. pacinii*, *V. pectenecida*, *V. penaeicida* y *V. ponticus* (28.1% del total de identificados), sólo se aislaron de organismos sanos. El resto de las especies encontradas se localizaron tanto en peces sanos como en enfermos.

Se identificaron dos potenciales nuevas especies, una relacionada a *V. wodanis* presente en muestras del IEO Santander y la otra relacionada a *V. ponticus* y sólo presente en las muestras del IRTA.



## Competencia “in vitro” entre bacterias autóctonas y especies patógenas asociadas a la acuicultura gallega

M. López, N.F. González, E.P. Lago, T.P. Nieto y R. Farto

*Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo, Vigo*

La competencia “in vitro” entre dos especies bacterianas puede ser evaluada midiendo la capacidad que tiene una cepa de inhibir el crecimiento de otra cepa. Esta propiedad se emplea para la selección preliminar de cepas potencialmente probióticas mediante siembra en placa y ha permitido la obtención de probióticos muy valiosos para la acuicultura.

El término probiótico en Acuicultura define a un suplemento microbiano vivo con capacidad para modificar la microbiota del entorno que puede beneficiar o fortalecer al organismo cultivado, haciéndolo más resistente a las enfermedades. Esta sería una alternativa al uso masivo de antibióticos, que mejora la salud en la población cultivada y contribuye a mantener altos beneficios de producción.

En este trabajo se analizó el potencial probiótico de las cepas autóctonas más abundantes (*Vibrio* spp.) asociadas al cultivo de organismos marinos de las costas gallegas, caracterizados e identificados por nuestro equipo de investigación. Se evaluó la capacidad de los aislados de inhibir el crecimiento de cepas patógenas habituales en acuicultura (*Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp.) empleando el método de difusión en agar.

Se usaron medios de cultivo de composición diferente (agar marino y medio mínimo M9) y concentraciones diferentes de las cepas (potencialmente probiótica y patógena). El medio AM fue el medio más adecuado para seleccionar cepas potencialmente probióticas ya que se obtuvo un mayor nº de halos de inhibición que con M9. La respuesta inhibitoria de las cepas potencialmente probióticas se obtuvo con concentraciones similares de ambas cepas, la potencialmente probiótica y la patógena. Aún así se pudo fijar una concentración mínima inhibitoria de la cepa potencialmente probiótica de hasta 4 unidades logarítmicas menor que la de la patógena en algunos de los experimentos realizados

Este método ha permitido la selección de cepas potencialmente probióticas asociadas a la acuicultura gallega rastreando en poco tiempo un gran número de cepas. Este tipo de selección “in vitro” nos facilita afrontar el siguiente paso, la selección “in vivo”.



## ***Lactococcus garvieae*, patógeno emergente en la acuicultura mediterránea, estudios genéticos mediante microarrays de ADN y herramientas bioinformáticas**

M. Aguado, J.F. Fernández-Garayzábal, A. Gibello, M.T. Cutuli y M.M. Blanco

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

*Lactococcus garvieae* es el agente causal de la lactococosis, una enfermedad emergente en acuicultura, con especial incidencia en la trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*). *L. garvieae* también se ha asociado a infecciones en animales domésticos e incluso en el hombre. Estos hechos convierten a *L. garvieae* en una bacteria de importancia creciente tanto en medicina veterinaria como humana. Aunque recientemente se viene realizando diferentes estudios sobre esta bacteria, el conocimiento a nivel genético de *L. garvieae* es aún muy limitado.

En este trabajo se ha abordado de forma global el estudio a nivel molecular del contenido genético de *L. garvieae* mediante un enfoque basado en Genómica Comparativa, y utilizando microarrays de ADN y herramientas bioinformáticas. El análisis pretende comparar el contenido genético de *L. garvieae* con bacterias secuenciadas completamente y filogenéticamente próximas, e implica dos tipos de estudios: *in silico*, o de comparación de secuencias mediante herramientas bioinformáticas; e *in vitro*, o de hibridación genómica comparada mediante microarrays de ADN. Los microorganismos de referencia elegidos para las comparaciones genómicas fueron: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Streptococcus pneumoniae*.

Tomando los resultados de los análisis *in silico* como referencia para la puesta a punto de los análisis *in vitro*, se han logrado identificar en *L. garvieae* (CECT 4531) 197 genes en común con *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, y 150 genes en común con *S. pneumoniae* TIGR4. Los genes identificados en *L. garvieae* poseen un 75% o más de similitud a nivel de secuencia nucleotídica con sus homólogos en el microorganismo de referencia correspondiente. La identificación de estos nuevos genes constituye un paso importante en el conocimiento a nivel genético de en *L. garvieae*.



## Identificación mediante IVET (*In Vivo Expression Technology*) de genes de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* inducidos específicamente durante la infección en rodaballo

M.C. Cerviño, M. Balado, A.J. Rivas, C.R. Osorio y M.L. Lemos

*Departamento Microbiología y Parasitología. Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela*

*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* es un patógeno bacteriano con gran distribución geográfica y un amplio rango de especies hospedadoras, siendo uno de los organismos infecciosos más importantes en la acuicultura mundial, causante de epizootias tanto en salmónidos como en otras especies.

El conocimiento de los factores responsables de la virulencia de los microorganismos patógenos se ve limitado por nuestra capacidad para simular las condiciones de la infección en experimentos *in vitro*. Debido a esta dificultad, resulta de gran interés la “tecnología de expresión *in vivo*” (IVET), que parte de la base de que si un gen se expresa específicamente en un huésped, ha de ser importante en el proceso de la infección.

En este trabajo hemos tratado de identificar genes de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* cuya expresión se induce específicamente al infectar rodaballo (*Scophthalmus maximus*), tras determinar las condiciones necesarias para su selección y aislamiento en ejemplares juveniles de esta especie. Utilizando una cepa virulenta de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (VT45.1), aislada de un brote de furunculosis en trucha, hemos generado una biblioteca génica de esta especie en el vector suicida pIVET-1, que contiene un gen *purA* (imprescindible para la síntesis de purinas) sin promotor. Al integrarse este plásmido en un mutante  $\Delta purA$  de VT45.1, sólo en el caso de que porte un promotor activo complementará la auxotrofia de la bacteria y permitirá su crecimiento. De esta forma, al inocular en el hospedador las bacterias que contienen las fusiones, sólo es posible recuperar aquellos clones que contienen promotores activos *in vivo*. Tras dos rondas de selección en el hospedador, y una vez descartados aquellos promotores que también se activan *in vitro*, hemos analizado los genes bacterianos expresados únicamente durante la infección.

Los resultados preliminares han demostrado la eficacia de este sistema para determinar la expresión específica *in vivo* de diferentes genes de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*; entre ellos, se encuentra el gen plasmídico que codifica la toxina AopP, que podría afectar a la respuesta inflamatoria del hospedador mediante la inhibición de la cascada de señalización del NF- $\kappa$ B. Además, se han identificado genes que codifican proteínas de función desconocida, lo que sugiere que en el genoma de *A. salmonicida* deben existir más genes implicados en su virulencia cuya expresión se induce específicamente *in vivo* y que resultan de gran interés para conocer en detalle los mecanismos de los que dispone esta bacteria para llevar a cabo la infección. Nuestro trabajo actual se dirige a la identificación de dichos genes.



## Estudio histopatológico y bacteriológico de almejas cultivadas (*Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*) en Galicia

A. Doce<sup>1</sup>, C. López<sup>2</sup>, A.L. Diéguez<sup>1</sup>, A. González<sup>2</sup>, S. Balboa<sup>1</sup> y J.L. Romalde<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS-Facultad de Biología.

Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Mariñas, Apdo 13, 36620, Vilanova de Arousa. Pontevedra.

El estudio de la microbiota asociada a las poblaciones de almeja, *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*, en cultivo es importante para determinar el estado sanitario de las mismas, así como para conocer las bases patobiológicas de los brotes de enfermedad periódicos que sufren estas poblaciones, en especial las de almeja fina. En trabajos previos hemos estudiado las comunidades de bacterias fermentativas asociadas a estos bivalvos, encontrando una gran predominancia del género *Vibrio*. Sin embargo, son escasos los estudios enfocados a bacterias oxidativas, a pesar de que algunas especies de *Pseudomonas* han sido descritas como patógenas para moluscos.

Durante el año 2007, hemos llevado a cabo un estudio de poblaciones de almeja fina y japonesa de tres rías gallegas (Vigo, Arosa y Camariñas). Las muestras se tomaron de zonas intermareales con periodicidad bimensual, y se procesaron utilizando técnicas estándar histopatológicas y bacteriológicas.

Los parásitos y condiciones patológicas encontradas más frecuentemente fueron: a) bolsas bacterianas en los tubos de agua branquiales ( $\approx 100 \mu\text{m}$ ) incluidas dentro de una cubierta fibrosa derivada del tejido conjuntivo; b) colonias intracelulares de tipo *Rickettsia*-en el epitelio branquial y digestivo; c) plasmodios de tipo *Haplosporidium* en el epitelio digestivo; d) *Perkinsus atlanticus* en distintos órganos; e) ciliados libres en la superficie y los canales de agua de las branquias; f) turbelarios de tipo *Paravortex* en el lumen digestivo y tipo *Urastoma* en branquia y cavidad paleal. Es interesante destacar que, en general, la almeja fina presentó más parásitos y prevalencias más altas que la almeja japonesa.

El estudio bacteriológico mostró, como era de esperar, un aumento del número de bacterias durante los meses de verano, si bien la proporción entre aislados fermentativos (64%) y oxidativos (36%) se mantuvo más o menos constante a lo largo del año, con excepción de la localidad de la ría de Arosa donde el porcentaje de bacterias oxidativas se redujo a un 6% en verano. La caracterización fenotípica no resultó muy útil para la identificación de los aislados, por lo que se realizó una secuenciación parcial del gen 16S rRNA. Los géneros predominantes fueron *Pseudoalteromonas* (55,6%), *Alteromonas* (14,8%) y *Shewanella* (7,4%).



## Implicación del operón *traHIJKCLMN* en la virulencia de *Yersinia ruckeri*

J. Méndez, L. Fernández y J.A. Guijarro

*Departamento de Biología Funcional. Microbiología. Universidad de Oviedo. Asturias.*

*Yersinia ruckeri* es el agente etiológico de la Enfermedad Entérica de la Boca Roja (ERM) o yersiniosis, que afecta fundamentalmente a salmónidos. Debido al desarrollo temprano de una vacuna relativamente eficaz contra esta enfermedad, existen pocos datos acerca de la virulencia de este patógeno. La tecnología IVET, cuyo fundamento es la detección de genes que se expresan exclusivamente durante el proceso infeccioso, ha permitido la identificación en *Y. ruckeri* (Fernández et al., 2004) de un cluster de ocho genes, los cuales presentan similitud significativa con el cluster *traHIJKCLMN* del plásmido de virulencia pADAP de *Serratia entomophila* (Hurst et al., 2003). Curiosamente, en *Y. ruckeri*, estos genes se encuentran codificados en el ADN cromosómico de la bacteria y, hasta la fecha, no ha sido encontrado un cluster semejante en el genoma de ninguna de las tres especies de *Yersinia* patógenas de humanos. Estudios de RT-PCR, muestran que estos genes se transcriben como un operón, a partir de una posible secuencia promotora localizada delante del gen *traH*. Con el fin de analizar la función del operón *traHIJKCLMN* en *Y. ruckeri*, se ha llevado a cabo la inactivación del gen *traI* mediante mutagénesis insercional. Experimentos de competencia *in vivo*, así como determinación de DL<sub>50</sub>, reflejaron la implicación de estos genes en la virulencia de la bacteria, probablemente al codificar un sistema de secreción de tipo IV. Por último, el análisis mediante PCR, reveló la presencia de este cluster en las 15 cepas de *Y. ruckeri* utilizadas y procedentes de diferentes lugares geográficos.

Fernández, L., I. Márquez, and J.A. Guijarro. 2004. Identification of specific *in vivo*-induced (*ivi*) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5199-5207.

Hurst, M.R.K., O' Callaghan, M., and Glare, T.R. 2003. Peripheral sequences of the *Serratia entomophila* pADAP virulence-associated region. *Plasmid* 50: 213-229.



## La aplicación del modelo animal pez cebra en el estudio de patologías de especies acuícolas

U. Oyarbide<sup>1</sup>, M. Olasagasti<sup>1</sup>, S. Rainieri<sup>1</sup>, A. Estonba<sup>2</sup> y M.A. Pardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AZTI- Tecnalia, Food Research Unit, Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo Bidea, Edificio 609 E-48160 Derio, Bizkaia, Spain.

e-mail: [mpardo@azti.es](mailto:mpardo@azti.es), web: <http://www.azti.es>

<sup>2</sup> Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, Faculty of Sciences, University of the Basque Country, E- 48080 Bilbao, Spain

Las enfermedades infecciosas son una fuente de importantes pérdidas económicas en el sector acuícola. Un método potencial para reducir su impacto es aumentar la resistencia del hospedador a la infección, pero nuestro conocimiento sobre la base genética y fisiológica de dicha resistencia es muy limitado. Durante los últimos años se han puesto en marcha varias iniciativas que pretenden identificar genes implicados en la respuesta inmune de diversas especies marinas con el objeto de clarificar la base molecular de esta resistencia. Pero los recursos genómicos de las especies acuícolas de interés comercial son muy escasos y esto está coartando la expansión de esta estrategia.

El objetivo principal de este trabajo es potenciar la utilización del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal para profundizar en la genómica de especies acuícolas. Diversos trabajos recientes se han centrado en el estudio de niveles de expresión de genes implicados en el sistema inmune. Sin embargo, todos ellos están limitados por el escaso conocimiento de sus genomas. A fin de superar este handicap, en el estudio que presentamos utilizamos el modelo pez cebra debido a la gran cantidad de información disponible de su genoma ([www.sanger.ac.uk/Projects/D\\_rerio/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/)). Además, este modelo debido a su pequeño tamaño lo hacen extremadamente manejable en condiciones de laboratorio a la hora de, por ejemplo, realizar ensayos de asociación.

Específicamente, este proyecto pretende realizar una aproximación mediante el uso del pez cebra - *V. anguillarum* como modelo para identificar genes de resistencia a infecciones que luego podrán ser extrapolados por homología a especies de interés acuícola.



## Motilidad como posible factor de virulencia de *Flavobacterium psychrophilum*

D. Pérez-Pascual, A. Menéndez, B. Álvarez, y J. A. Guijarro

Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo

*Flavobacterium psychrophilum* es una bacteria gram negativa y agente causal de la enfermedad del agua fría (CWD), que afecta principalmente a alevines de salmónidos, provocando grandes pérdidas económicas en su producción intensiva. A día de hoy, no existe ninguna vacuna comercializada que resulte efectiva para prevenir la enfermedad y, actualmente, la única vía de control es la utilización de antibióticos (Nematollahi *et al* 2003).

Una de las características de esta bacteria es su motilidad mediante un sistema que se denomina “gliding” del cual se desconocen aún sus fundamentos. Sin embargo, en los últimos años se han aislado en la especie *Flavobacterium johnsoniae* una serie de mutantes no motiles y el estudio de los genes interrumpidos esta permitiendo empezar a entender alguno de los procesos implicados en el “gliding”.

En el presente estudio y con el fin de conocer la implicación de la motilidad de *F. psychrophilum* en su virulencia se seleccionaron en una genoteca de mutantes obtenida mediante mutagénesis insercional utilizando el transposón Tn4351, colonias con una capacidad de desplazarse mayor que la cepa parental. Se identificaron así dos mutantes considerados hipermotiles (FP1468 y FP1495). Tras identificar mediante secuenciación los genes interrumpidos por el transposón y los contiguos a estos, se analizaron diferentes caracteres fenotípicos como las características del crecimiento, su actividad proteolítica extracelular entre otros. Finalmente, se realizó un análisis comparativo de DL<sub>50</sub> y se pudo observar que el mutante FP1495 presentaba un grado de atenuación 10 veces mayor que la cepa parental.

### Bibliografía

Álvarez, B. y J. A. Guijarro. 2007. Recovery of *Flavobacterium psychrophilum* viable cells using a charcoal-based solid medium. Letters in Appl. Microbiol. 44: 569-572.

Álvarez, B., P.Secades, M. J. McBride y J. A. Guijarro. 2004. Development of genetic techniques for the psychrotrophic fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Appl. Environ. Microbiol. 70:581-587.

Michel, C., D. Antonio, and R. P. Hedrick. 1999. Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum* approach and control. Res. Microbiol. 150: 351-358.

Nematollahi, A., A. Decostere, F. Pasmás, y F. Haesebrouck. 2003. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. J. Fish Dis. 26: 563-574.



## Virulencia en *Lactococcus garvieae* y genes implicados en la D-alanilación de los ácidos teicoicos (genes *dlt*)

P. Reimundo, A. Menéndez y J.A. Guijarro

Departamento de Biología Funcional. Microbiología. Universidad de Oviedo. Asturias.

*Lactococcus garvieae* es el agente causal de la lactococosis, una forma de estreptococosis que puede afectar al cultivo de numerosas especies de agua dulce, salobre y salada y de amplia distribución geográfica. No obstante, los conocimientos sobre los mecanismos de patogenicidad de *L. garvieae* son aún limitados.

La técnica de “mutagénesis de marcaje” permite seleccionar, en un modelo infeccioso de interacción bacteria-hospedador, cepas mutantes en genes que son esenciales durante el desarrollo del proceso infeccioso. Esta técnica se ha aplicado con éxito por nuestro equipo en *L. garvieae* empleando el transposón Tn917 y obteniendo como resultado 29 mutantes con un crecimiento claramente limitado en la trucha iris como hospedador (Menéndez y col., 2007).

El estudio de uno de estos mutantes, el denominado XVIII, reveló que éste presenta interrumpido el gen *dltA*, perteneciente al operón *dlt*, encargado de incorporar D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular bacteriana (para revisión ver Neuhaus y Baddiley, 2003). La secuencia de la región de ADN que flanquea la inserción del transposón en este mutante, presenta semejanzas con los genes *dltX*, *dltA*, *dltB*, *dltC* y *dltD* de otras bacterias gram positivas. La caracterización fenotípica de esta cepa mutante en relación a la cepa parental indicó que la interrupción del gen *dltA* no altera de forma drástica sus características fisiológicas ni de tipo morfológico. Sin embargo, se comprobó mediante cromatografía líquida de alta resolución que el mutante XVIII presenta un descenso de aproximadamente un 35% en la cantidad de D-alanina presente en su pared celular. Esta circunstancia conlleva un aumento de la carga neta polianiónica de su pared celular y por ello, este mutante tiene una mayor susceptibilidad que la cepa parental al antimicrobiano de tipo catiónico nisina, y sus células tienen una mayor capacidad de unión al colorante catiónico azul alcian.

El estudio de la virulencia de la cepa mutante XVIII en truchas arco iris indicó que la incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos ejerce un papel importante en la virulencia de *L. garvieae* ya que esta cepa presenta un valor de DL<sub>50</sub> aproximadamente 1000 veces mayor que la cepa parental así como un bajo índice de competencia *in vivo*.

### Bibliografía

Menéndez, A., Fernández, L., Reimundo, P., y Guijarro, J. A. (2007). Genes required for *Lactococcus garvieae* survival in a fish host. *Microbiology* 153, 3286-94.

Neuhaus, F. C., y Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67, 686-723.



Sesión:  
**AVANCES METODOLÓGICOS Y  
NORMALIZACIÓN DE MÉTODOS**

Moderadores:  
**Esperanza Garay  
Francisco Lucena**





## **Evaluación de la UNE-EN 12780 para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* en agua de manantial mediante análisis fenotípicos y genotípicos**

A. Casanovas, F. Lucena y A. Blanch

*Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Barcelona.*

*Pseudomonas aeruginosa* es un organismo oportunista patógeno para el hombre, capaz de crecer en el agua con concentraciones de nutrientes muy bajas. Por lo tanto, es conveniente que las aguas minerales naturales y las aguas de manantial estén exentas de *P. aeruginosa* al examinar 250 ml de muestra (Directivas 80/777/CE y 96/70/CE). La norma UNE-EN 12780 especifica un método que permite el aislamiento y el recuento de *P. aeruginosa* en muestras de agua embotellada. Sin embargo, se ha observado cierta incertidumbre en la identificación confirmativa mediante los ensayos básicos de la norma.

El objetivo de este estudio fue identificar confirmativamente 41 cepas presuntamente pertenecientes a la especie *P. aeruginosa* aisladas en manantiales de plantas embotelladoras. Las cepas se aislaron y analizaron de acuerdo con la UNE-EN 12780. Adicionalmente, se realizaron ensayos complementarios para su identificación taxonómica, así como los perfiles bioquímicos que presentan para la galería API 20NE. Se realizó un estudio de clonalidad poblacional mediante las microplacas PhP-48 para establecer relaciones entre orígenes o puntos de muestreo. Posteriormente, se procedió a la caracterización genotípica mediante la secuenciación del gen que codifica el 16S rRNA.

Se observó que 27 de las 41 cepas se identificarían como *P. aeruginosa* basándose exclusivamente en los análisis básicos indicados en la UNE-EN 12780. No obstante, deben realizarse los ensayos complementarios indicados en esta normativa (crecimiento a 4°C y a 42°C) para confirmar las cepas como *P. aeruginosa*. Se identificó una diversidad de patrones bioquímicos para los perfiles API 20NE dentro de la especie que deberían considerarse en futuras aplicaciones rutinarias de este kit. Estos perfiles pueden ser un soporte complementario en caso de incertidumbre después de aplicar las pruebas completas de la UNE-EN 12780.

El estudio de clonalidad poblacional mediante fenotipado bioquímico indica que existen tres clones poblacionales pertenecientes a la especie *P. aeruginosa* entre las 41 cepas analizadas. El análisis de la caracterización bioquímica confirma la existencia de una variabilidad en la expresión fenotípica de las cepas de esta especie aisladas en aguas de manantial respecto a las pruebas de la microplaca PhP-48. La secuencia del gen que codifica el 16S rRNA confirmó que estos clones pertenecen a la especie *P. aeruginosa*.

En conclusión, debería considerarse la aplicación de los ensayos complementarios propuestos por la UNE-EN 12780 (crecimiento a 4°C y a 42°C) para evitar la incertidumbre observada cuando se aplican exclusivamente los ensayos básicos de la norma.



## Evaluación de cebadores para la detección de *Edwardsiella tarda*

N. Castro, A.E. Toranzo, S. Núñez y B. Magariños

*Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-CIBUS e Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela*

La edwardsiellosis causada por *Edwardsiella tarda*, es una enfermedad bacteriana que puede afectar tanto a anfibios, reptiles, mamíferos marinos como a otros animales de sangre caliente, incluido el hombre. En los últimos años se han detectado diferentes brotes de edwardsiellosis en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) convirtiéndose en un problema importante para el cultivo de esta especie piscícola. El objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar una técnica de PCR eficaz para la detección precoz de *E. tarda* en acuicultura.

Para ello, se evaluó la especificidad de un total de 3 parejas de cebadores: 2 parejas descritas por Sakai et al. (2007) para la detección de genes precursores de fimbrias (A y D) y 1 pareja de cebadores descrita por Chen & Lai (1998) a partir del gen de síntesis de hemolisina (*tardaF* y *tardaR*), empleando para ello tanto cultivos puros como mixtos de *E. tarda* y otras especies causantes de importantes mortalidades en los cultivos de peces. Además, se determinó la sensibilidad de los cebadores seleccionados así como su aplicación en muestras de peces y agua de cultivo.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la pareja de cebadores D que permitió la detección de todas las cepas de *E. tarda* estudiadas y no mostró amplificación de ninguna de las otras bacterias analizadas.

El límite de detección obtenido con esta pareja de cebadores para *E. tarda* fue de 1-100 células por tubo de reacción para cultivos puros y cultivos mixtos respectivamente. Asimismo, se consiguió la detección de *E. tarda* a partir de tejidos infectados (hígado, riñón y bazo) tanto natural como artificialmente y del agua de cultivo.

La aplicación de esta técnica de PCR para la detección de *E. tarda*, permitirá el diagnóstico precoz de la enfermedad y, por lo tanto, será de gran utilidad a la hora de prevenir la edwardsiellosis en los cultivos de rodaballo.

### Bibliografía:

- Chen J. & Lai S. (1998). PCR for Direct Detection of *Edwardsiella tarda* from Infected Fish and Environmental Water by Application of the Hemolysin Gene. *Zoological Studies* 37 (3): 169-176
- Sakai T., Iida T., Osatomi K. & Kanai K. Detection of Type 1 Fimbrial Genes in Fish Pathogenic and Non-pathogenic *Edwardsiella tarda* Strains by PCR. *Fish Pathology* 42(2): 115-117



## Detecci3n de micobacterias no tuberculosas en torres de refrigeraci3n mediante pcr real time

B. Adrados<sup>1</sup>, E. Juli3n<sup>2</sup>, F. Codony<sup>1</sup>, E. Torrents<sup>3</sup>, M. Luquin<sup>2</sup> y J. Morat3<sup>1</sup>

1. *Laboratori de Microbiologia Sanitat3ria i Mediambiental. Departament d'3ptica i Optometria, Universitat Polit3cnica de Catalunya, Terrassa, Barcelona*

2. *Departament de Gen3tica i de Microbiologia, Facultat de Bioci3ncies, Universitat Aut3noma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona*

3. *Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), Scientific Park of Barcelona, Barcelona,*

Las micobacterias no tuberculosas (NTM) est3n ampliamente distribuidas en el medio ambiente, se encuentran en suelo y agua (incluyendo fuentes naturales y tratadas). Muchas especies han sido aisladas de muestras patol3gicas humanas, donde causan infecciones oportunistas.

En estudios retrospectivos recientes se observa un incremento en las tasas de enfermedades causadas por NTM en todo el mundo. Esta tendencia global, ha incitado a la revisi3n de las directrices internacionales de diagn3stico y tratamiento de las enfermedades causadas por NTM, y estas son ahora consideradas como un grupo pat3geno emergente en aguas.

La manifestaci3n cl3nica m3s com3n de una infecci3n por NTM es una enfermedad pulmonar, debido probablemente a inhalaci3n de aerosoles que contienen el microorganismo. Las torres de refrigeraci3n, se presentan como un reservorio potencial de NTM. Diferentes cuestiones deben tenerse en cuenta para esta consideraci3n: las caracter3sticas fisiol3gicas de las micobacterias, que las hacen consistentes con su transmisi3n por aerosoles, a3adido a la propia naturaleza de las torres de refrigeraci3n que diseminan bacterias en forma de aerosoles. Adem3s, en librer3as de clones de muestras de aire hay una gran abundancia de *Mycobacterium* spp rRNA, lo que evidencia su presencia real en aerosoles y por tanto una v3a de adquisici3n de enfermedades pulmonares. Por 3ltimo, las micobacterias suelen ser resistentes a los desinfectantes m3s com3nmente utilizados en torres de refrigeraci3n, por lo que puede verse favorecido su crecimiento selectivo. Otro dato a considerar, es que numerosos brotes de *Legionella pneumophila* que se han dado en 3reas urbanas, tienen su origen en estos sistemas.

En el presente estudio, se demuestra la aplicabilidad y las ventajas de un ensayo de PCR en tiempo real, como t3cnica de detecci3n r3pida de micobacterias en aguas de torres de refrigeraci3n, que permite adem3s de ahorrar tiempo (sobretudo comparado con los m3todos convencionales de cultivo), cuantificar los niveles detectados.

Se analizaron muestras de agua de 53 torres de refrigeraci3n diferentes del 3rea urbana de la ciudad de Barcelona. De 3stas, un 56% resultaron positivas, con concentraciones de entre  $4.6 \times 10^3$  cels/L y  $1.34 \times 10^7$  cels/L. Teniendo en cuenta, que algunos de los brotes de legionelosis relacionados con torres de refrigeraci3n han sido producido con niveles (detectados mediante cultivo) de m3nimo  $10^5$  CFU/L, y a pesar de que no se ha visto correlaci3n entre presencia de legionella y presencia de micobacterias, parece que las concentraciones obtenidas de micobacterias son suficientemente altas como para tener en consideraci3n el riesgo sanitario que pueden representar las torres de refrigeraci3n.



## Utilidad del MALDI-TOF para la identificación-caracterización de bacterias acuáticas

J. L. Barja<sup>1</sup>, N. Castro<sup>1</sup>, E. Guitián<sup>2</sup>, A. E. Toranzo y B. Magariños<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-CIBUS. <sup>2</sup>Unidad de Espectrometría de Masas, RIADT. Universidad de Santiago de Compostela, A Coruña.

La identificación y caracterización de bacterias causantes de importantes mortalidades en los cultivos continentales y marinos tanto de peces como moluscos se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante métodos fenotípicos y en los últimos años usando métodos moleculares basados en la PCR. Recientemente la técnica MALDI-TOF-MS, Espectrometría de Masas que utiliza como método de Ionización la Desorción Láser asistida por Matriz y un analizador de Tiempo de Vuelo (TOF), ha sido descrita como una metodología útil para caracterizar microorganismos.

El objetivo de este trabajo ha sido poner a punto la metodología MALDI, utilizando para ello el equipo MALDI-TOF (Modelo AUTOFLEX, BRUKER DALTONICS, Alemania) que se encuentra disponible en la Unidad de Espectrometría de Masas de la USC, con el fin de construir una base de datos de bacterias acuáticas, ampliando la actualmente disponible, y así poder disponer en un futuro próximo de un método de identificación/caracterización rápido y fiable basado en el análisis de los diferentes espectros de proteínas. La información obtenida usando esta metodología podría ayudar a discriminar especies complementando así la información aportada por los caracteres fenotípicos y genotípicos.

Hasta el momento se han evaluado diferentes bacterias acuáticas gram negativas principalmente del grupo de las  $\gamma$  y  $\alpha$  proteobacterias (*Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* y *Photobacterium damsela* subespecie *damsela*, diferentes especies del género *Vibrio*, *Allivibrio*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Phaeobacter*) así como diferentes especies del género *Tenacibaculum*. Para calibrar el equipo MALDI-TOF se ha utilizado una cepa de *E. coli* que a su vez sirve como control interno de funcionamiento. Las cepas analizadas se han procesado con etanol y acetonitrilo y la matriz de solución empleada ha sido ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA). Para la puesta a punto de la técnica se han utilizado un número mínimo de 4-6 cepas por especie y se han procesado entre 6 y 12 replicas de cada cepa.

Hasta el momento, esta técnica ha generado patrones discriminativos muy consistentes para todos los microorganismos evaluados resultando una técnica robusta. Por otro lado, esta metodología se ha mostrado como un buen método de identificación permitiendo llegar a diferenciar a nivel de subespecies e incluso a establecer líneas clonales relacionadas con el hospedador dentro de una especie bacteriana.

Otra de las utilidades de los espectros MALDI-TOF de los microorganismos será la de su aplicabilidad en la autenticación de las cepas de colecciones de cultivo.



## Desarrollo de un dispositivo miniaturizado basado en microfluídica y biosensores para la detección rápida y simultánea por PCR de múltiples patógenos de transmisión hídrica

E. Soria<sup>1</sup>, M.A. Yáñez<sup>1</sup>, R. Múrtula<sup>1</sup>, J. Alonso<sup>2</sup> y V. Catalán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LABAQUA, S.A., Alicante

<sup>2</sup> Grup de Sensors i Biosensors. Universitat Autònoma de Barcelona

La creciente demanda de metodologías rápidas y fiables para los análisis de rutina en microbiología obliga a la búsqueda de tecnologías automatizadas orientadas al análisis de un gran número de muestras frente a múltiples microorganismos. Los métodos moleculares, en especial la técnica de amplificación de DNA mediante PCR, destacan por permitir la detección y cuantificación rápida y específica de microorganismos en muestras de agua, suelos, lodos, alimentación, y clínica, por lo que se perfilan como candidatos para el desarrollo de nuevas aplicaciones analíticas.

El objetivo de este trabajo es el diseño y validación de una colección de cebadores y sondas fluorescentes para la detección específica, rápida y simultánea de microorganismos de transmisión hídrica mediante PCR cuantitativa o “a tiempo real”. Concretamente, se pretende la detección de microorganismos, por un lado, patógenos humanos (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*) y, por otro lado, indicadores de contaminación fecal en aguas (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp.). La detección rápida de estos microorganismos permitirá mejorar los métodos tradicionales (aislamiento en cultivo, diagnóstico serológico, etc) que, en muchos casos, son cualitativos, poco sensibles, laboriosos y requieren un tiempo prolongado para la obtención de resultados.

El trabajo realizado se estructura en las siguientes fases: a) búsqueda de regiones o genes específicos de los microorganismos propuestos, b) diseño de cebadores y sondas fluorescentes para la PCR a tiempo real, c) estudio experimental de la especificidad de estos cebadores y sondas empleando un gran número de cepas de distintos géneros y especies bacterianas, d) optimización de las condiciones de amplificación para la detección simultánea de varias dianas, y e) diseño y construcción de patrones internos de amplificación para detectar la presencia de inhibidores de la PCR y evitar falsos negativos. Queda pendiente, como última etapa de este trabajo, la validación del método.

Una vez desarrollado y validado, este sistema de detección múltiple por PCR se empleará para el diseño de una plataforma miniaturizada, basada en dispositivos microfluídicos, que, junto con un módulo de extracción y purificación de DNA, supondrá una solución integrada para los laboratorios de diagnóstico microbiológico.



## Desarrollo de métodos moleculares para la detección de IPNV en peces asintomáticos

B. López-Jimena<sup>1</sup>, E. García-Rosado<sup>1</sup>, C. Infante<sup>3</sup>, M.C. Alonso<sup>1</sup>, I. Cano<sup>1,2</sup>, M. Manchado<sup>3</sup>, D. Castro<sup>1</sup> y J.J. Borrego<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga

<sup>2</sup>Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía. CSIC, Puerto Real (Cádiz)

<sup>3</sup>IFAPA Centro El Toruño, Junta de Andalucía. El Puerto de Santa María (Cádiz)

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es el agente etiológico de una enfermedad sistémica contagiosa aguda, la necrosis infecciosa, que afecta tanto a peces cultivados como salvajes, del ambiente marino y dulceacuícola. Muy frecuentemente y como resultado de las infecciones de IPNV aparecen portadores asintomáticos que liberan partículas víricas al medio ambiente durante largos periodos de tiempo. El desarrollo y aplicación de técnicas que permitan la detección de dichos portadores resulta fundamental como medida de prevención de enfermedades víricas en las instalaciones de cultivo. Por este motivo, el objetivo de este estudio es el desarrollo de una metodología sensible y rápida que permita la detección de IPNV en peces portadores asintomáticos.

La detección del genoma vírico se realizó mediante RT-PCR y nested-PCR, seguidas de hibridación en blot. La RT-PCR se realizó en un solo paso, utilizando cebadores que amplifican un fragmento de 599 pb del gen que codifica la proteína pVP2. Los cebadores utilizados en la nested-PCR amplifican un fragmento de 191 pb. La hibridación en blot se realizó según el protocolo descrito por Cano *et al.* (2007) utilizándose como sonda el fragmento del genoma viral amplificado mediante nested-PCR marcado con digoxigenina.

Para evaluar la especificidad de las técnicas desarrolladas se utilizaron aislados de IPNV pertenecientes a diferentes serotipos. La sensibilidad se determinó atendiendo al título vírico y al número de copias de ARN viral transcrito *in vitro*. La RT-PCR y la hibridación en blot permiten la detección específica de aislados del serotipo A2 (cepa tipo IPNV Sp), mientras que la nested-PCR permite, además, la detección de aislados del serotipo A1 (cepa VR-299).

Con respecto a la sensibilidad, el límite de detección de la RT-PCR a partir de cultivos celulares fue 10 a 10<sup>2</sup> ufp/ml, incrementándose 10 veces (1-10 ufp/ml) con la aplicación de la nested-PCR o hibridación en blot. El límite de detección de la RT-PCR evaluado según al número de copias de ARN viral transcrito *in vitro* fue de 10<sup>4</sup> copias. La aplicación de la nested-PCR e hibridación en blot no supuso un incremento de este límite de detección.

Estas técnicas se han aplicado con éxito para la detección en sangre de portadores asintomáticos de IPNV en ejemplares de urta (*Pagrus auriga*) y pargo (*Pagrus pagrus*) capturados del medio natural.

Cano et al. 2007. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 32-40.



## Optimización de un método para la detección de las microcistinas en aguas superficiales

H. Smienk<sup>1</sup>, E. Sevilla<sup>2</sup>, M. Peleato<sup>2</sup> y L. Mata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento I+D, ZEU-INMUNOTEC, Zaragoza. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza

La creciente eutrofización de los ríos y embalses esta provocando con una frecuencia cada vez mayor proliferaciones incontroladas de fitoplancton con las consecuencias medioambientales que ello conlleva. Además, algunas de las especies de cianobacterias que se desarrollan en los “blooms” son capaces de producir toxinas muy nocivas para la salud humana y animal pudiendo provocar incluso la muerte (Carmichael, 1997). Se estima que en nuestro país entre el 25-35% de las proliferaciones pueden ser tóxicas (Quesada et al. 2004). Por todo ello, las cianotoxinas deben ser consideradas como un problema importante para las autoridades sanitarias.

Recientemente, un test de inhibición enzimática, específico para las microcistinas, ha sido validado y comercializado (Smienk, H. et al. 2007). Este método se basa en el mecanismo de acción real de las microcistinas y nodularinas y valora la potencial toxicidad de las microcistinas presentes (MacKintosh et al. 1990) ya que las microcistinas inhiben los enzimas responsables de la defosforilación intracelular de las proteínas (PP1 y PP2A). De esta forma, el grado de inhibición de la fosfatasa puede ser usado como una medida de la concentración de la toxina, mediante el uso de un sustrato fosforilado que libere un producto coloreado tras la hidrólisis.

Para poder determinar la potencial toxicidad de los aguas, un aspecto importante a considerar es que la microcistina no se excreta al exterior de la célula, a no ser que esta se lise. Esto implica que si se quiere conocer la concentración total de microcistinas en un agua de “origen natural” será necesaria una etapa previa de preparación de la muestra antes de ser analizada con cualquiera de las metodologías disponibles.

Muchos de los procedimientos han sido optimizados para su utilización con métodos instrumentales como HPLC y por lo tanto no tienen porque funcionar adecuadamente con métodos biológicos como los ensayos de inhibición de la fosfatasa (PPIA) o ELISA. Por otra parte, algunos métodos propuestos son excesivamente complejos al requerir de etapas de concentración de la muestra no necesarias en el caso de los métodos biológicos. Por ello, parece necesario optimizar un protocolo de preparación de las muestras que se adapte perfectamente a los métodos de tipo biológico y que por otra parte requieran un equipamiento sencillo.

En este trabajo se presenta la optimización de un método de lisis celular para la extracción de microcistinas intracelulares y su posterior análisis mediante el método de inhibición de la fosfatasa (Microcystest). Se evalúa los diferentes parámetros que podían afectar a la recuperación de las microcistinas y en la eliminación de interferencias que podrían estar presentes en las aguas superficiales.



## Validación de los nuevos protocolos de análisis microbiológico de aguas mediante servicios intercolaborativos y servicios intercomparativos

J. Sanchis

*Departamento de Control de Calidad, Laboratorios MICROKIT, S.L., Madrid*

Durante 6 años se han ido comparando los resultados analíticos de los 70 participantes en las 24 ediciones del servicio intercomparativo SEILAGUA® que utilizaban los métodos derivados del Real Decreto 140/2003 de aguas de consumo humano, Real Decreto 1074/2002 de aguas de bebida envasadas y la Norma ISO 11731 sobre *Legionella pneumophila*, comparados con los resultados obtenidos por participantes que utilizaban los diversos protocolos MICROKIT® derivados de aquéllos (tanto en el método Presencia/Ausencia como en el de Filtración de membrana) para optimización en los análisis microbiológicos de aguas. La comparación engloba 14 parámetros microbiológicos y un total de 584 muestras intercomparadas.

Los resultados obtenidos y sus conclusiones son tan trascendentales, que deben hacer plantearse al lector si la validación que haya realizado de los métodos oficiales en sus instalaciones, justifica seguir con ellos de forma estricta, o bien si necesita implantar las mejoras que proponemos en dichos protocolos, convirtiendo así éstos en un método de referencia.

La conclusión más importante es que el método P/A utilizando los kits P/A de MICROKIT® obtiene una sensibilidad real del 100%, aunque se requiera confirmar las muestras presuntamente positivas porque la especificidad resulte sólo similar a la que obtienen estos laboratorios con el método oficial estricto. Sin embargo la sensibilidad media para todos los parámetros con los métodos oficiales es sólo del 80%, al obtenerse globalmente un 20% de falsos negativos.

Los parámetros más críticos son, por orden decreciente de importancia: *Clostridium perfringens*, con una eficiencia de sólo el 29%, *Legionella pneumophila*, con sólo un 54%, *Staphylococcus aureus*, con un 62%, *Vibrio cholerae*, con un 60%, *Pseudomonas aeruginosa*, con un 79%, *E.coli*, con sólo un 78% y Coliformes con un 80% de eficiencia.

Sin embargo, los Enterococos fecales obtienen en el método P/A MICROKIT® un 100% de eficiencia y en el método oficial, un 99% de eficiencia, lo que debe hacer replantearse la necesidad de implantar de rutina este indicador de contaminación fecal por encima del actual protagonismo de *E.coli* y demás coliformes, al resultar éstos dos mal detectados en nada menos que un 20-22% de las muestras intercomparadas, algo inaceptable en el parámetro más vital.

En los métodos de recuento, existen diferencias importantes de exactitud, precisión y rango inferior de cuantificación entre varios medios de cultivo: para coliformes y *E.coli*, el MUGPLUS Cfs. Agar MICROKIT® funciona mucho mejor y da mucho menos trabajo confirmativo que el Tergitol TTC; en *Clostridium perfringens* el TSC funciona mucho mejor que el m-CP; en *Staphylococcus aureus* el Mannitol Salt Agar funciona tan mejor que el Baird Parker, que llegamos al punto de invalidar a éste en análisis de aguas. También se observa que el medio YEA-cromogénico de MICROKIT® detecta sistemáticamente más aerobios que su homólogo Agar Nutriente al extracto de levadura (YEA), ya que el recuento de colonias rojas sobre medio color crema permite detectar las más pequeñas, que pasan desapercibidas en el medio oficial.

También apuntamos que las Compact-Dry-Plates® TC están obteniendo en los últimos SEILAGUA®, resultados equivalentes a los del YEA, con la ventaja de no tener que fundir medios, ni sufrir el punto crítico de la temperatura letal de adición del medio sobre la muestra.



## Ejercicios europeos de equivalencia entre métodos de sustrato definido para *E.coli* y enterococos y los respectivos métodos ISO para aguas de baño

F. Ribas<sup>1</sup>, C. Allaert<sup>2</sup>, H. Gu<sup>2</sup>, A. Isern<sup>3</sup>, S. Niemela<sup>4</sup> y C. Fricker<sup>5</sup>

1, Barcelona; 2, IDEXX, USA; 3, Agència Salut Pública Barcelona; 4, Helsinki, Finlandia; 5, CRF Consulting, Reino Unido

La Directiva 2006/7/EC de aguas de baño define como metodología para el examen bacteriológico la norma ISO 9308-3 para *E.coli* y la ISO 7899-1 para enterococos. Aunque la Directiva recomienda el uso de las microplacas de 96 pocillos, se permite el uso de metodologías alternativas con tal que sean equivalentes o presenten recuperaciones significativamente superiores. De acuerdo con las recomendaciones del Grupo Experto en Microbiología (EGM) asesor de la UE, los métodos alternativos deben cumplir con los requisitos del procedimiento ISO 17994:2004.

En el presente estudio, se han comparado con los respectivos métodos ISO de microplacas dos métodos de sustrato definido: uno para *E.coli* (Colilert Quantitray®) y otro para enterococos (Enterolert E Quantitray®). Cada una de esas comparaciones se ha efectuado de modo independiente para aguas continentales y marinas. En los distintos ejercicios participaron como mínimo 6 laboratorios de distintos países europeos. Únicamente dos laboratorios (Agència Salut Pública, Barcelona y IDHESA, Plouzane, Francia) y cuatro países (España, Francia, Italia y Reino Unido) participaron en todos los ejercicios. Otros países participantes fueron Dinamarca, Alemania, Bélgica, Irlanda y Malta.

Los protocolos presentaron ligeras diferencias según los microorganismos y tipos de agua, pero básicamente se usaron aguas continentales o marinas de alta calidad fortificadas con efluente de aguas residuales para dar recuentos en los intervalos 200-500 NMP/100 mL. Previamente al estudio, los analistas fueron adiestrados en la manipulación de los dos métodos a comparar. Todos los laboratorios participantes están acreditados por sus entidades nacionales de acreditación.

En el total de los cuatro ejercicios se analizaron con dos métodos 1065 muestras. De cada muestra y método se repicaron para su verificación cuatro pocillos. Las tasas de verificación son muy altas, entre un 97,8 y 98,7 % para los métodos de sustrato definido y entre un 95,7 y 98,2 % para los métodos de microplaca.

En tres de los cuatro ejercicios el método basado en el sustrato definido recupera un número significativamente superior de bacterias diana que el método ISO: un 9% más el Colilert en aguas continentales, un 11,3 % más el Enterolert en aguas continentales y un 22,8 % más el Enterolert en aguas marinas. En cambio, para *E.coli* en aguas marinas el Colilert y el método ISO son equivalentes, recuperando este último por término medio un 1,6% más *E.coli*. En consecuencia, los métodos alternativos basados en un sustrato definido pueden ser utilizados para el análisis de *E.coli* y enterococos en todo tipo de aguas de baño.





## LISTA DE PARTICIPANTES





**Aguado Mart3nez, Alejandra**  
Dpt. Inmunolog3a, Microbiolog3a y  
Parasitolog3a  
Universidad del Pa3s Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnolog3a  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
jani\_am@hotmail.com

**Aguado Urda, M3nica**  
Dpt. Sanidad Animal  
Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Veterinaria  
Avenida Puerta de Hierro s/n  
28040 Madrid  
magur@vet.ucm.es

**Agull3 Barcel3, Miriam**  
Dpt. Microbiolog3a  
Universidad de Barcelona  
Facultad de Biolog3a  
Avda/ Diagonal, 645, Edificio Anexo,  
Planta 0, Laboratorio 9, 08028  
Barcelona  
miriam\_agullo@ub.edu

**Alonso Sanchez, Maria del Carmen**  
Dpt. Microbiolog3a  
Universidad de M3laga  
Facultad de Ciencias  
Campus Teatinos  
29071 M3laga  
mdalonso@uma.es

**Alperi Vega, Anabel**  
Ciencias M3dicas B3sicas  
Universidad Rovira i Virgili  
Facultad de Medicina  
c/ Sant Llorenç 21,  
43201 Reus, Tarragona  
anabel.alperi@urv.cat

**Allaert Vandevenne, Corrie**  
Dpt. Waters  
IDEXX Laboratories  
Avda/ Acaci3s 4, 08328 Alella,  
Barcelona  
corrie-allaert@idexx.com

**Amaro Gonz3lez, Carmen**  
Dpt. Microbiolog3a y Ecolog3a  
Universidad de Valencia  
c/ Dr. Moliner 50  
46100 Valencia  
carmen.amaro@uv.es

**Amo, Laura**  
Dpt. Inmunolog3a, Microbiolog3a y  
Parasitolog3a  
Universidad del Pa3s Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnolog3a  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
Laura\_tpo@hotmail.com

**Arana Basabe, In3s**  
Dpt. Inmunolog3a, Microbiolog3a y  
Parasitolog3a  
Universidad del Pa3s Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnolog3a  
Apdo 644  
48080 Bilbao  
ines.arana@ehu.es

**Araujo Boira, Rosa Mar3a**  
Dpt. Microbiolog3a  
Universitat de Barcelona  
Facultad de Biolog3a  
Avda/ Diagonal 645, Edificio Anexo,  
Planta 0,  
Laboratorio 8, 08028 Barcelona  
raraujo@ub.edu

**Arias Pe3alver, Jos3 Mar3a**  
Dpt. Microbiolog3a  
Universidad de Granada  
Facultad de Ciencias  
Avda/ Fuentenueva s/n, 18002 Granada  
jmarias@ugr.es

**Artolozaga Bengoetxea, Itxaso**  
Dpt. Inmunolog3a, Microbiolog3a y  
Parasitolog3a  
Universidad del Pa3s Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnolog3a  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
itxaso.artolozaga@ehu.es



**Arzubalde Cilleruelo, Mikel**  
Itsas Natura S.L.  
Astigarragako bidea, 2, 2ª planta,  
Oficina 10, 20180 Oiartzun, Gipuzkoa  
mikel@itsasnatura.com

**Ayo Millán, Begoña**  
Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
begona.ayo@ehu.es

**Azúa Pérez, Iñigo**  
Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
inigo.azua@ehu.es

**Balado Dacosta, Miguel**  
Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Instituto de Acuicultura  
Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela  
mbalado@usc.es

**Balboa Méndez, Sabela**  
Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Biología/CIBUS  
Campus Universitario Sur, s/n  
15782 Santiago de Compostela  
sabela.balboa@rai.usc.es

**Baña García, Zuriñe**  
Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
zurine.bana@ehu.es

**Barcina López, Isabel**  
Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo 644, 48080 Bilbao  
isabel.barcina@ehu.es

**Barja Pérez, Juan L.**  
Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Biología/CIBUS  
Campus Universitario Sur, s/n  
15782 Santiago de Compostela  
juanluis.barja@usc.es

**Blanco Gutiérrez, María del Mar**  
Dpt. Sanidad Animal  
Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Veterinaria  
Avenida Puerta de Hierro s/n  
28040 Madrid  
mblanco@vet.ucm.es

**Blanch Gisbert, Anicet**  
Dpt. Microbiología  
Universidad de Barcelona  
Facultad de Biología  
Avda/ Diagonal, 645, Edificio Anexo,  
Planta 0, Laboratorio 9, 08028  
Barcelona  
ablanch@ub.edu

**Borrego García, Juan José**  
Dpt. Microbiología  
Universidad de Málaga  
Facultad de Ciencias  
Campus Teatinos  
29071 Málaga  
jjborrego@uma.es

**Bosch Navarro, Albert**  
Dpt. Microbiología  
Universidad de Barcelona  
Avda/ Diagonal 645  
08028 Barcelona  
abosch@ub.edu



**Bravo del Hoyo, Zaloa**

Dpt. Inmunolog3a, Microbiolog3a y  
Parasitolog3a  
Universidad del Pa3s Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnolog3a  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
2bravo001@ikasle.ehu.es

**Cabria Bravo, Luc3a**

Dpt. Inmunolog3a, Microbiolog3a y  
Parasitolog3a  
Universidad del Pa3s Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnolog3a  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
lucimona\_4@hotmail.com

**Cano Cejas, Irene**

Dpt. Biolog3a Marina y Acuicultura  
Instituto de Ciencias Marinas de  
Andaluc3a, CSIC  
Campus Universitario R3o San Pedro s/n  
Puerto Real, C3diz  
ireca@uma.es

**Ca3nigral C3rcel, Irene**

Dpt. Biotecnolog3a Microbiolog3a  
Universidad Polit3cnica de Valencia  
Escuela T3cnica Superior de Ingenieros  
Agr3nomos  
Camino Vera s/n  
46022 Valencia  
ircacar1000@hotmail.com

**Casanovas Massana, Arnau**

Dpt. Microbiolog3a  
Universitat de Barcelona  
Facultat de Biolog3a  
Avda/ Diagonal 645, Edifici Annex  
08028 Barcelona  
arnaucasanovas@ub.edu

**Castro Iglesias, Nuria**

Dpt. Microbiolog3a y Parasitolog3a  
Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Biolog3a/CIBUS  
Campus Universitario Sur, s/n  
15782 Santiago de Compostela  
iacubact@usc.es

**Castro L3pez, Mar3a Dolores**

Dpt. Microbiolog3a  
Universidad de M3laga  
Facultad de Ciencias  
Campus Teatinos  
29071 M3laga  
dcastro@uma.es

**Cervero Arag3, Silvia**

Dpt. Microbiolog3a  
Universitat de Barcelona  
Facultad de Biolog3a  
Avda/ Diagonal 645, Edificio Anexo,  
Planta 0,  
08028 Barcelona  
silviacervero@gmail.com

**Cervi3o G3mez, M<sup>a</sup> del Carmen**

Dpt. Microbiolog3a y Parasitolog3a  
Universidad de Santiago de Compostela  
Instituto de Acuicultura  
Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela  
macacg@usc.es

**Codony Iglesias, Francesc**

BUDOT - UPC  
Universitat Polit3cnica Catalunya  
c/ Violinista Velrsola 37  
08222 Terrasa  
CODONY@OO.UPC.EDU

**Collado Gonz3lez, Luis**

Ciencias M3dicas B3sicas  
Universitat Rovira i Virgili  
Facultad de Medicina  
c/San Lorenzo, 21, 43201 Reus,  
Tarragona  
luis.collado@urv.cat

**Costan Longares, Ana**

Dpt. Microbiolog3a  
Universidad de Barcelona  
Facultad de Biolog3a  
Avda/ Diagonal, 645, Edificio Anexo,  
Planta 0, Laboratorio 9, 08028  
Barcelona  
acostanlo@ub.edu



**Cuesta Durán, Estíbaliz**

Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
e\_shine85@hotmail.com

**Cutrin Lobato, Juan Manuel**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Instituto de Acuicultura  
Instituto de Acuicultura  
15706 Santiago de Compostela  
jmcutrin@usc.es

**De La Rosa Jorge, M<sup>a</sup> del Carmen**

Dpt. Microbiología II  
Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Farmacia  
Pl/ Ramón y Cajal s/n  
28040 Madrid  
delarosa@farm.ucm.es

**De La Sota Zubillaga, Alejandro**

Consorcio de Aguas Bilbao Bizkaia  
Edificio Albia,  
San Vicente nº 8  
Bilbao

**De Las Heras Sánchez, Ana Isabel**

Dpt. Microbiología Molecular  
Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas  
C/ Ramiro de Maeztu, 9  
28034 Madrid  
aiheras@cib.csic.es

**Del Cerro Arrieta, Ana**

Dpt. Sanidad Animal  
SERIDA (Servicio regional de  
investigación y desarrollo  
agroalimentario)  
Travesía del Hospital, 96 Jove del  
Medio  
33299 Gijón  
anadelcerro@rocketmail.com

**Estévez Toranzo, Alicia**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Biología/CIBUS  
Campus Universitario Sur, s/n  
15782 Santiago de Compostela  
alicia.estevez.toranzo@usc.es

**Figuera Salvat, María José**

Ciencias Médicas Básicas  
Universidad Rovira i Virgili  
Facultad de Medicina  
c/ Sant Llorenç 21,  
43201 Reus, Tarragona  
mariajose.figuera@urv.cat

**Garaizabal Ruiz, Idoia**

Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo 644  
48080 Bilbao  
chocolat666@hotmail.com

**Garay Auban, Esperanza**

Dpt. Microbiología  
Colección Española de Cultivos Tipo  
Edificio de Investigación, Campus  
Burjassot  
46100 Valencia  
esperanza.garay@uv.es

**García Martínez, Francisca**

Dpt. Gen. Y Microbiología  
Universidad de Murcia  
Facultad de Biología  
Campus de Espinardo  
30100 Murcia  
francisca.garcia4@alu.um.es

**García Rosado, María Esther**

Dpt. Microbiología  
Universidad de Málaga  
Facultad de Ciencias  
Campus Teatinos  
29071 Málaga  
megarcia@uma.es



**Gasol Piqué, Josep M.**  
Departament de Biologia Marina i  
Oceanografia  
Institut de Ciències del Mar ICM-CMIMA,  
CSIC  
Pg/ Marítim de la Barceloneta 37-49  
08003 Barcelona  
pepgasol@icm.csic.es

**Goiriena Boyra, Itziar**  
Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo 644  
48080 Bilbao  
bcpgoboi@ehu.es

**Gomez-Gil Rodriguez-Sala, Bruno**  
Unidad Mazatlan  
Centro de Investigación en  
Alimentación y Desarrollo  
Avda/ Sabalo Cerritos s/n, 82010  
Mazatlan, Sinaloa, Mexico  
bruno@ciad.mx

**González Muñoz, María Teresa**  
Dpt. Microbiología  
Universidad de Granada  
Facultad de Ciencias  
Avda/ Fuentenueva s/n, 18002 Granada  
mgonzale@ugr.es

**Guijarro Atienza, Jose Agustín**  
Dpt. Biología Funcional, Microbiología  
Universidad de Oviedo  
Facultad de Medicina  
c/ Julián Clavería s/n  
33006 Oviedo  
jaga@fq.uniovi.es

**Iriberry Ramalle, Juan**  
Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo 644  
48080 Bilbao  
juan.iriberri@ehu.es

**Jofre Torroella, Juan**  
Dpt. Microbiología  
Universidad de Barcelona  
Avda/ Diagonal, 645  
08028 Barcelona  
jjofre@ub.edu

**Juez Prieto, Leire**  
Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
lilady87@hotmail.com

**Labella Vera, Alejandro Manuel**  
Dpt. Microbiología  
Universidad de Málaga  
Facultad de Ciencias  
Campus Teatinos  
29071 Málaga  
amlabella@uma.es

**Lago Lorenzo, Maria Del Carmen**  
Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Instituto de Acuicultura  
Institutos Universitarios, Bloque C,  
Campus Sur, 15706 Santiago de  
Compostela  
MLAGO\_L@HOTMAIL.COM

**Lopez Dieguez, Ana Belen**  
Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Biología/CIBUS  
Campus Universitario Sur, s/n  
15782 Santiago de Compostela  
belendieguez@hotmail.com

**López Jimena, Benjamín**  
Dpt. Microbiología  
Universidad de Málaga  
Facultad de Ciencias  
Campus Teatinos  
29071 Málaga  
beloji@uma.es



**López Joven, María Carmen**

Irta Aqüicultura  
Carretera de Poble Nou, Km 5,5  
43540 Sant Carles de la Ràpita,  
Tarragona  
mccarmen.lopez@irta.es

**López Romalde, Jesus**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Biología/CIBUS  
Campus Universitario Sur, s/n  
15782 Santiago de Compostela  
mpromald@usc.es

**López Sanmartín, Monserrat**

Dpt. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
Edificio de Ciencias Experimentais,  
Lagoas c/ Marcosende s/n, 36210 Vigo  
mlopez@iim.csic.es

**Lucena Gutiérrez, Francisco**

Dpt. Microbiología  
Universidad de Barcelona  
Diagonal 645, Anexo,  
08028 Barcelona  
flucena@ub.edu

**Marquez Marcos, M<sup>a</sup> Del Carmen**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Sevilla  
c/ Profesor García Gonzalez, 2  
Sevilla  
cmarquez@us.es

**Martínez Peinado, José**

Dpt. Microbiología III  
Universidad Complutense  
Facultad de Biología  
Dpt. Microbiología. Facultad de Biología  
UCM. 28040 Madrid  
peinado@bio.ucm.es

**Mata Martín, Ana Isabel**

Dpt. Microbiología Industrial  
Biomérieux España, S.A.  
c/ Manuel Tovar 45-47, 28034 Madrid  
aimatamartin@gmail.com

**Méndez Sotorrió, María Jessica**

Dpt. Biología Funcional  
Universidad de Oviedo  
c/ Julián Clavería, 6  
33006 Oviedo  
yekamendez@yahoo.es

**Montesinos Paes, Alejandro**

Dpt. Microbiología i Ecología  
Universitat de València  
c/ Dr. Moliner 50  
46100 Burjassot, Valencia  
amonpa@alumni.uv.es

**Morcillo De Amuedo, Fernando**

Dpt. Microbiología  
Universidad de Granada  
Facultad de Ciencias  
Avda/ Fuentenueva s/n, 18002 Granada  
morcillo@ugr.es

**Mosso Romeo, María Ángeles**

Dpt. Microbiología  
Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Farmacia  
Pz/ Ramón y Cajal s/n, Ciudad  
Universitaria  
28040 Madrid  
a.mossoromeo@farm.ucm.es

**Muela Blazquez, Alicia**

Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
alicia.muela@ehu.es

**Muniesa Perez, Maite**

Dpt. Microbiología  
Universidad de Barcelona  
Facultad de Biología  
Avda/ Diagonal, 645, Edificio Anexo,  
Planta 0, Laboratorio 9, 08028  
Barcelona  
mmuniesa@ub.edu



**Murillo, Sara**

Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
Saramurillo610@hotmail.com

**Orruño Beltrán, Maite**

Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
maite.orruno@ehu.es

**Oyarbide Cuevas-Mons, Usua**

Dpt. Investigación Alimentaria  
AZTI-TECNALIA  
Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo  
Bidea-Edificio 609, 46160 Derio, Bizkaia  
uoyarbide@azti.es

**Parada Morais, Claudia**

Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
brunita\_64@hotmail.com

**Pardo Gonzalez, Miguel Angel**

Dpt. Investigación Alimentaria  
AZTI-TECNALIA  
Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo  
Bidea-Edificio 609, 46160 Derio, Bizkaia  
mpardo@azti.es

**Parrilla Santos, Elisa**

Dpt. Marketing  
Oxoid S.A.  
Vía de los Poblados, 17 Nave 3-B  
28033 Madrid  
elisa.parrilla@thermofisher.com

**Pérez Lago, Estela**

Dpt. Biología Funcional e Ciencias da  
Saúde  
Universidad de Vigo  
Edificio de Ciencias Experimentais,  
Lagoas c/ Marcosende s/n, 36210 Vigo  
eplago@uvigo.es

**Pérez Nieto, Teresa**

Dpt. Biología Funcional y Ciencias de la  
Salud  
Universidad de Vigo  
Edificio Ciencias Experimentales  
Lagoas Marcosende s/n  
36210 Vigo  
mtpererez@uvigo.es

**Perez Pascual, David**

Dpt. Biología Funcional. Area de  
Microbiología  
Universidad de Oviedo  
Facultad de Medicina  
c/ Julián Clavería s/n  
33006 Oviedo  
uo199747@uniovi.es

**Pérez Prieto, Sara Isabel**

Dpt. Microbiología Molecular  
Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas  
c/ Ramiro de Maeztu, 9  
28034 Madrid  
saraip@cib.csic.es

**Perez Sautu, Unai**

Dpt. Microbiología, Grupo de Virus  
Entéricos  
Universidad de Barcelona  
Avda/ Diagonal 645  
08028 Barcelona  
uperez@ub.edu

**Pintó Solé, Rosa M.**

Dpt. Microbiología  
Universidad de Barcelona  
Avda/ Diagonal 645  
08028 Barcelona  
rpinto@ub.edu



**Polo Montero, David**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Biología/CIBUS  
Campus Universitario Sur, s/n  
15782 Santiago de Compostela  
david\_polo\_montero@hotmail.com

**Pujalte Domarco, María Jesús**

Dpt. Microbiología y Ecología  
Universidad de Valencia  
Edificio Investigación, 2-81, Campus de  
Burjasot, 46100 Burjasot, Valencia  
Maria.J.Pujalte@uv.es

**Rainieri, Sandra**

Dpt. Investigación Alimentaria  
AZTI-TECNALIA  
Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo  
Bidea-Edificio 609, 46160 Derio, Bizkaia  
srainieri@azti.es

**Reimundo Diaz-Fierros, Pilar**

Dpt. Biología Funcional  
Universidad de Oviedo  
Facultad de Medicina  
c/ Julian Clavería 6  
33006 Oviedo  
ribadense@hotmail.com

**Ribas Soler, Ferran**

Barcelona  
fribsol@hotmail.com

**Rivas Fontenla, Amable**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Instituto de Acuicultura  
Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela  
amablejrf@hotmail.com

**Rodríguez Fernandez, Carmina**

Dpt. Microbiología II  
Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Farmacia  
Pl/ Ramón y Cajal s/n  
28040 Madrid  
carmina@farm.ucm.es

**Rodríguez Martínez, Sara**

Dpt. Microbiología  
Universitat de Barcelona  
Facultad de Biología  
Avda/ Diagonal 645, Edificio Anexo,  
Planta 0,  
Laboratorio 8, 08028 Barcelona  
sarahrodriguez@ub.edu

**Romero Bernárdez, Manuel**

Dpt. Microbiología  
Universidad de Santiago de Compostela  
CIBUS  
Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela  
bernard@usc.es

**Rubiano Saavedra, María Eugenia**

Dpt. Microbiología  
Universidad de Barcelona  
Facultad de Biología  
Avda/ Diagonal, 645, Edificio Anexo,  
Planta 0, Laboratorio 9, 08028  
Barcelona  
maeuru@hotmail.com;  
marucolumbia@gmail.com

**Ruiz Berraquero, Francisco**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Sevilla  
c/ Profesor García González, 2  
pacoruiz@us.es

**Sánchez López, Pedro Francisco**

Dpt. Gen y Microbiología  
Universidad de Murcia  
Facultad de Biología  
Campus de Espinardo  
30100 Murcia  
pedrof.sanchez2@carm.es

**Sanchez Porro, Cristina**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Sevilla  
c/ Profesor García Gonzalez, 2  
Sevilla  
sanpor@us.es



**Sanchis Solera, Jorge**

Control de calidad  
Laboratorios Microkit, SL  
Apdo. 44, 28210 Valdemorillo, Madrid  
jsanchis@laboratoriosmicrokit.com

**Serrano Suárez, Alejandra**

Dpt. Microbiología  
Universitat de Barcelona  
Facultad de Biología  
Avda/ Diagonal 645, Edificio Anexo,  
Planta 0,  
08028 Barcelona  
alejandra.serrano

**Simon Zabala, Olaia**

Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
olaiasimon@hotmail.com

**Smienk, Henry**

Dpt. I+D  
ZEU-INMUNOTEC  
c/ Maria de luna 11, nave 19,  
50018 Zaragoza  
hsmienk@zeu-inmunotec.com

**Solís Andrés, Inmaculada**

Dpt. Microbiología  
Iproma S.L.  
Apdo. 8106  
12080 Castellón  
isolis@iproma.com

**Soria Soria, Elena**

Microbiología I+D+i  
Labaqua S.A.  
c/ Dracma 16-18, Pol. Ind. Atalayas,  
03114 Alicante  
elena.soria@labaqua.com

**Souto Pereira, Sandra**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Instituto de Acuicultura  
Institutos Universitarios, Bloque C,  
Campus Sur, 15706 Santiago de  
Compostela  
sandra.souto@usc.es

**Torrella Mateu, Francisco**

Dpt. Gen. Y Microbiología  
Universidad de Murcia  
Facultad de Biología  
Campus de Espinardo  
30100 Murcia  
torrella@um.es

**Trigo de Sousa Roque, Ana**

IRTA-San Carles de la Rapita  
Instituto de Recerca i Tecnologia  
Agroalimentaries  
C/ al Poblenou s/n Km 5,5, 43540 Sant  
Carles de la Rapita, Tarragona  
Ana.Roque@irta.es

**Unanue Vivanco, Marian**

Dpt. Inmunología, Microbiología y  
Parasitología  
Universidad del País Vasco  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Apdo. 644  
48080 Bilbao  
marian.unanue@ehu.es

**Urmeneta Masó, Jordi**

Dpt. Microbiología  
Universidad de Barcelona  
Avda/ Diagonal 645, Edificio Anexo,  
08028 Barcelona  
jurmeneta@ub.edu

**Valera Parra, María Dolores**

Dpt. Gen. Y Microbiología  
Universidad de Murcia  
Facultad de Biología  
Campus de Espinardo  
30100 Murcia  
mdolores.valera@alu.um.es



**Ventosa Ucero, Antonio**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Sevilla  
c/ Profesor García González, 2  
Sevilla  
ventosa@us.es

**Vilariño Becerra, Maria Luz**

Dpt. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Biología/CIBUS  
Campus Universitario Sur, s/n  
15782 Santiago de Compostela  
marivb@usc.es



## INDICE DE AUTORES





Adrados B.	91	Cañavate J.P.	78
Aguado M.	80	Cañigral I.	46
Alberici E.	57	Casanovas A.	89
Alcaide E.	72	Castro D.	59, 67, 94
Alonso J.	93	Castro N.	90, 92
Alonso M.C.	59, 67, 94	Catalán V.	93
Alperi A.	54	Cervero S.	49
Álvarez A.	85	Cerviño M.C.	73, 76, 81
Álvarez C.	38	Codony F.	91
Allaert C.	97	Collado L.	47
Amaro C.	29, 71	Conde M.	70
Amorós I.	46	Costan-Longares A.	39
Angulo M.	38	Cutrin J.M.	68, 72
Arahal D.R.	57	Cutuli M.T.	80
Arana I.	43		
Araujo R.	48, 49	Darriba S.	38
Areoso E.	68	de Blas I.	75
Arias J.M.	32, 33	De La Rosa M.C.	56
Artolozaga I.	27	De Las Heras A.I.	69
Avellón A.	39	De Linares C.	33
Ayo B.	27	de Silóniz, M.I.	42
Aznar R.	44	Delgado M.	77
Azúa I.	28	Dellundé J.	49
		Diéguez A.L.	55, 58, 82
Balado M.	73, 76, 81	Doce A.	58, 82
Balboa S.	58, 82	Dongankaya L.	78
Ballester S.	44	Dopazo C.P.	68, 70
Bandín A.	68	Duncan N.	78
Bandín I.	70, 72		
Baña Z.	27, 28	Elandaloussi L.	75, 77
Barcina I.	43	Elizaquivel P.	44
Barja J.L.	40, 68, 92	Enríquez R.	69
Beaz-Hidalgo R.	55	Esteve C.	72
Blanco M.M.	80	Estonba A.	84
Blanch A.R.	41, 89		
Borrego J.J.	59, 67, 94	Farto R.	74, 79
Bosch A.	37	Fernández L.	83
Bruhn J.B.	29	Fernández-Garayzábal J.F.	80
Bueno J.D.	32	Ferrús M.A.	46
Busse H.-J.	53	Figueras M.J.	47, 54
		Fricker C.	97
Cabello A.M.	30	Furones D.	75, 78
Cama J.	31		
Canals O.	49		
Cano I.	67, 94		



Gallego V.	53	López M.	74, 79
Garaizabal I.	43	Lopez-Jimena B.	67, 94
Garay E.	57	López-Joven C.	75
García D.	47	López-Vázquez C.	72
García de la Banda I.	78	Lucena F.	39, 89
García Martínez F.	45	Luquin M.	91
García-Rosado E.	67, 94		
Gasol J.M.	23	Macián M.C.	57
Gibello, A	80	Magariños B.	90, 92
Goiriena I.	27, 28	Manchado M.	59, 94
Gómez-Gil B.	77, 78	Martínez-Murcia A.	54
González A.	82	Martínez-Ruiz F.	33
González M.T.	32	Martin-Ramos J.D.	33
González N.F.	74, 79	Mata A.I.	63
González-Muñoz M.T.	33	Mata L.	95
Gram L.	29	Mendez J.	49, 83
Gu H.	97	Menéndez A.	85, 86
Guerrero R.	31	Merroun M.L.	32
Guijarro J.A.	83, 85, 86	Mocé-Llivina L.	39
Gutián E.	92	Monera A.	54
		Monrras M.	69
Hernández C.	33	Montesinos A.	71
Hodneland K.	71	Morató J.	91
Huguet J.M.	37	Morcillo F.	32, 33
		Moreno Y.	46
Infante C.	94	Mosso M.A.	56
Iriberry J.	27, 28	Muela A.	43
Isern A.	97	Muniesa M.	41
		Múrtula R.	93
Jofre J.	39, 41		
Julián E.	91	Nielsen K.F.	29
		Niemela S.	97
Kämpfer P.	53	Nieto T.P.	74, 79
		Núñez S.	90
Labella A.	59	Olasagasti M.	84
Lacuesta B.	77	Olveira J.G.	70
Lago E.P.	74, 79	Orruño M.	43
Lago M.	70	Ortega C.	69
Lemos M.L.	73, 76, 81	Ortiz-Delgado J.B.	67
Lobo C.	78	Osorio C.R.	73, 76, 81
Longa A.	38	Otero A.	30
López C.	82	Oyarbide U.	84



Pardo M.A.	84	Sevilla E.	95
Pascual J.	57	Sexton C.	71
Payán A.	41	Silva A.	68
Peinado J.M.	42	Smienk H.	95
Peleato M.	95	Solís I.	44
Pérez J.	77	Soria E.	93
Pérez U.	37	Souto S.	72
Pérez-Pascual D.	85		
Pérez Prieto S.I.	69		
Pintado M.C.	56	Toranzo A.E.	55, 90, 92
Pintó R.M.	37	Torrella F.	34, 45
Polo D.	38, 40	Torrentó C.	31
Prado S.	55	Torrens E.	91
Pujalte M.J.	57	Trallero G.	39
Quintela M.	40	Unanue M.	28
		Urmeneta J.	31
Rabella N.	39		
Rainieri S.	84	Valera M.D.	45
Reimundo P.	86	Valiente E.	29
Ribas F.	37, 97	Ventosa A.	53
Rivas A.J.	73, 76, 81	Vilariño M.L.	38, 40
Roca A.	30		
Rodríguez C.	56		
Rodríguez G.	39	Wrent P.	42
Rodríguez S.	48		
Rodríguez Saint-Jean S.	69		
Romalde J.L.	38, 40, 55, 58	Yáñez M.A.	93
	59, 82		
Romero A.	69		
Romero M.	30		
Roque A.	75, 77, 78		
Ruiz-Zarzueta I.	75		
Salas E.	78		
Salvadó H.	49		
Sánchez López P.F.	34		
Sánchez-Porro C.	53		
Sanchis J.	96		
Sanjuan E.	71		
Sano D.	37		
Sarasquete C.	67		
Seco C.	43		
Serrano A.	49		





VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

---

NOTAS



VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

---

NOTAS



VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

---

NOTAS





VII reunión Microbiología del Medio Acuático ♦ Bilbao 2008

---

NOTAS





## organiza



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

## colaboran



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



EUSKO JAURLARITZA  
GOBIERNO VASCO



Bizkaiko Foru Aldundia  
Diputación Foral de Bizkaia



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACIÓN



Bilbao Bizkaia Ur Partzuergoa  
Consortio de Aguas Bilbao Bizkaia



CAJA LABORAL  
EUSKADIKO KUTXA



SUMINISTRO URGENTE  
AL LABORATORIO



PROQUINORTE, S. A.

