



**VIII MMA**

Vigo, 14-16 septiembre 2010

# **VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático**

**Grupo especializado de Microbiología del Medio Acuático**

**Sociedad Española de Microbiología**

Programa y comunicaciones

Universida<sub>de</sub>Vigo





**VIII MMA**

Vigo, 14-16 septiembre 2010

# **VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático**

**Grupo especializado de Microbiología del Medio Acuático**

**Sociedad Española de Microbiología**

Programa y comunicaciones





Universida<sub>d</sub>eVigo

**Vigo, 14-16 de septiembre de 2010**

ISBN: 978-84-8158-505-6

DLG: VG 716-2010

Editado por: T. P. Nieto; L. A. Rodríguez; M. J. Pérez y R. Farto.  
Servicio de Publicaciones de la Universidad de Vigo



## Índice

Comités .....	7
Agradecimientos .....	9
Presentación .....	11
Información general.....	13
Programa .....	15
Biografía de la Dra. D. Milton .....	35
Ponencias:.....	37
Conferencia inaugural.....	39
Sesión: Contaminación microbiana.....	41
Sesión: Ecología y Fisiología.....	63
Sesión: Patología de especies acuícolas.....	89
Sesión: Biodiversidad microbiana de los sistemas acuáticos .....	121
Sesión: Avances metodológicos .....	149
Lista de participantes.....	167
Índice de autores .....	183
Fe de erratas.....	187







### **Comité científico:**

Presidente:

Dr. Juan José Borrego García (Universidad de Málaga)

Miembros:

Dra. Alicia Estévez Toranzo (Universidad de Santiago de Compostela)

Dr. Juan Iriberry Ramalle (Universidad del País Vasco)

Dr. M<sup>a</sup> Carmen Márquez Marcos (Universidad de Sevilla)

Dra. M<sup>a</sup> José Figueras Salvat (Universidad Rovira i Virgili)

Dr. Francisco Lucena Gutiérrez (Universidad de Barcelona)

Dr. Antonio Figueras Huerta (Instituto de Investigaciones Pesqueras, CSIC, Vigo)

Dr. Carles Borrego Moré (Universidad de Girona)

Dr. Jesús Ángel López Romalde (Universidad de Santiago de Compostela)

Dr. Luis Alfonso Rodríguez López (Universidad de Vigo)

Dra. M<sup>a</sup> José Pérez Álvarez (Universidad de Vigo)

### **Comité organizador:**

Presidenta: Dra. María Teresa Pérez Nieto

Secretaria: Dra. María José Pérez Álvarez

Miembros:

Dr. Luis Alfonso Rodríguez López

Dra. Julia Carballo Rodríguez

Dra. Elisa Longo González

Dra. Pilar Combarro Combarro

Dra. Carmen Sieiro Vázquez

Dra. Rosa Farto Seguí

Área de Microbiología.

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud

Universidad de Vigo

Campus Lagoas-Marcosende

36310 Vigo





## **Agradecimientos**

Sociedad Española de Microbiología  
Universidad de Vigo  
Ayuntamiento de Vigo  
Centro Cultural Caixanova  
Diputación de Pontevedra  
Parque Natural Marítimo-Terrestre das Illas Atlánticas de Galicia.  
FRINSA  
Boente  
Aguas de Barcelona  
Empresa Municipal Aguas de Málaga (EMASA)  
IPROMA  
AFORA





## Presentación

El comité organizador de esta VIII Reunión del Grupo especializado de Microbiología del Medio Acuático de la SEM estamos encantados de recibirlos en la ciudad de Vigo a todos los participantes y esperamos poder haceros pasar unos días de encuentro agradables que nos ayuden al intercambio de experiencias y conocimiento del medio acuático en sus múltiples vertientes microbiológicas.

Las sesiones se desarrollarán en la sala de conferencias del Centro Social Caixanova y en sus jardines disfrutaremos de los descansos entre sesiones. Su perfecta ubicación en el centro de la ciudad y su hospitalidad al acceder a acogernos es algo que queremos destacar.

El Ayuntamiento de Vigo nos recibirá a todos los participantes con el fin de que podamos disfrutar de una velada de ocio en los magníficos jardines del parque Quiñones de León, y la Diputación de Pontevedra se ha encargado de resolvernos la logística de traslados.

La Universidad de Vigo ha hecho posible la presencia entre nosotros de la Prof. D. Milton y a través de su servicio de publicaciones hemos editado el libro de resúmenes y comunicaciones, cuya publicación viene siendo habitual en estas reuniones, y que en esta ocasión ha sido financiado en su totalidad por la empresa de conservas de pescado FRINSA. Esta empresa ha tenido además la gentileza de obsequiarnos con una selección de sus productos así como con el maletín.

No quiero dejar de agradecer a la Sociedad Española de Microbiología y particularmente al Grupo especializado, representado por el presidente actual y anteriores, toda la colaboración prestada, así como también a las empresas que nos han ayudado.

La Reunión, que está estructurada en las sesiones habituales incluyendo el premio a la mejor Tesis Doctoral, ha tenido una acogida que permite predecir un notable éxito dada la calidad de las contribuciones recibidas. A través de la fórmula del premio a las comunicaciones mejor presentadas se pretende brindar un aliciente a los jóvenes que se inician en la defensa de los resultados de su trabajo científico.

No quiero terminar sin invitaros a participar activamente en la reunión y a disfrutar del programa social reiterando nuestro agradecimiento a todos por vuestro interés.

Teresa Pérez Nieto  
Presidenta del comité organizador





## Información general

Sede del congreso: Sala de conferencias del Centro Social Caixanova de Vigo

Conferencia inaugural: Dra. D. Milton.

Duración de las sesiones:

Mañana de 9:00 a 1:30h

Tarde de 15:30 a 18:30h

Café entre sesiones en el Jardín del Centro Social Caixanova de Vigo a las 11:00h y 17:00h

Comidas en el Hotel Ciudad de Vigo a las 14:00h

Miércoles 15 de septiembre a las 18:15h: Entrega del Premio a la mejor Tesis doctoral en Microbiología del Medio Acuático 2008/2009. Presentación del trabajo a cargo del galardonado.

Miércoles 15 de septiembre a las 19:15h: Asamblea plenaria del Grupo de Microbiología del Medio Acuático - Sociedad Española de Microbiología.

Actos sociales

Recepción de Bienvenida día 14 de septiembre a las 19:00h ofrecida por el Excmo. Ayuntamiento de Vigo en el Parque Quiñones de León.

Cena de Congreso en el Museo del Mar el día 15 de septiembre a las 21:30h.

Visita guiada a las Islas Cíes (Parque Nacional Illas Atlánticas) día 16 de septiembre de 14:00a 18:00h.





## Programa

14 septiembre	15 septiembre	16 septiembre
9,00 - 10,30 Entrega documentación	9,00 - 11,00 sesión: Patología de especies acuícolas	9,00 - 11,00 sesión: Avances metodológicos
9,30 Sesión de apertura. Conferencia inaugural (Prof. D. Milton)		
11,00 café	11,00 café	11,00 café
11,15 - 13,30 sesión: Contaminación microbiana	11,15 - 13,30 sesión: Diversidad microbiana de los sistemas acuáticos	11,15 - 13,30 Acto clausura: Prof. Dr. Ruiz Berraquero. Premios a las mejores comunicaciones. Entrega de diplomas a las entidades colaboradoras
13,30 comida	13,30 comida	14,00 Excursión en barco a las islas Cíes y visita guiada
15,30-17,00 sesión: Ecología y Fisiología	15,30-17,00 sesión: Patología de especies acuícolas	
17,00 café	17,00 café	
17,15 -18,30 sesión: Ecología y Fisiología	17,15- 18,15 sesión: Diversidad microbiana de los sistemas acuáticos	
	18,15 Premio a la mejor Tesis Doctoral de los años 2008 y 2009 y exposición del trabajo. Reunión del grupo de Microbiología del medio acuático	
	21,30 Cena de Congreso	
19,00 Recepción ofrecida por el Excmo. Ayuntamiento de Vigo en el Parque Quiñones de León		18,00 Regreso al centro de la ciudad
21,00 Regreso		





## Martes 14 de septiembre

9:00-10:30h. Entrega de documentación

9:30-10:00h. Inauguración:

- Dra. Teresa Pérez Nieto, Presidenta del Comité Organizador
- Dr. Juan José Borrego García, Presidente del grupo MMA
- Ilmo. Sr Alcalde del Excmo. Ayuntamiento de Vigo
- Rector Mgfc. Universidad de Vigo

10:00-11:00h. Conferencia inaugural: "Mechanisms of Virulence and Quorum Sensing. in *Vibro anguillarum*". Dra. D. Milton. Universidad de Umeå (Suecia).



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

11:15-13:30h. Sesión: Contaminación microbiana.

Moderadores: Juan Iriberry y Juan José Borrego.

**DETECCIÓN, VIABILIDAD E INFECTIVIDAD DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* spp EN AGUAS REGENERADAS**

Agulló-Barceló, M, Huguet, Josep Maria, Jofre, J, Lucena, F

**CUANTIFICACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE *E. coli* EN EFLUENTES SECUNDARIOS POR PROTOZOOS BACTERIVOROS**

Benítez G.A.; Vargas, L.P; Wrent, P.; Silóniz, M.I. y Peinado, J.M.

**DESTINO DE *Escherichia coli* DURANTE EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE FANGOS ACTIVADOS.**

Garaizabal, I., Arana, I., Orruño, M., Barcina, I.

**ESTABILIDAD DE LAS POBLACIONES DE DESNITRIFICANTES EN SEDIMENTOS DE HUMEDALES DE TRATAMIENTO**

García-Lledó, A., Vilar-Sanz, A., Trias, R., Hallin, S., Bañeras, L.

**RESPUESTA AL AMBIENTE MARINO DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN SISTEMAS DE FILTROS SUMERGIDOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

Cortés-Lorenzo, C., Juárez-Jiménez, B., Reboleiro-Rivas, P., Uad, I. y González-López, J..

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE UNA EDAR DE REFINERÍA**

Infante, P., Rodríguez E.

**PREVALENCIA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Arcobacter* spp EN AGUAS RESIDUALES PROCEDENTES DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO.**

Levicán A, Collado L, Figueras M.J.

**CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA EN BIOFILMS DESARROLLADOS SOBRE FILTROS DE ARENA Y CARBÓN ACTIVO GRANULAR UTILIZADOS EN POTABILIZACIÓN DE AGUAS**

Noguerola, I., Borrego, C.

**OXIDACIÓN ANAERÓBICA DE LA PIRITA POR *Thiobacillus denitrificans*: ADHESIÓN A LA SUPERFICIE DEL MINERAL**

Urmeneta, J., Torrentó, C., Cama, J., Guerrero, R.

**VALORACIONES DE RIESGO (QMRA) EN JARDINES PRIVADOS CON AGUA REGENERADA**

Rubiano, M. E.; Céspedes-Sánchez, R. ; Burguera, M.; Jofre, J.; Lucena, F.



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

15:30- 17:00h. Sesión: Ecología y Fisiología.

Moderadores: M<sup>a</sup> José Figueras y Jesús López Romalde.



**ESTUDIO DE LOS MICROPERFILES DE OXÍGENO Y POTENCIAL REDOX EN TAPETES MICROBIANOS APLICADOS A ENSAYOS DE ACTUOTAFONOMÍA**

Iniesto, M.; Laguna, C., Chicote, A., Peñin, I., Guerrero, M.C., Florín, M., Delgado, A. y López-Archilla, A.I.

**PRECIPITACIÓN DE FOSFATOS POR BACTERIAS DE UN AGUAS RESIDUALES URBANA**

Rivadeneira, A. , Martinez-Toledo, V., González-López, J. , Sánchez- Ruiz Jiménez, C. , Martín-Ramos, D. y Rivadeneira, M.A.

**PRECIPITACIÓN DE CARBONATOS POR MICROORGANISMOS DE AGUAS RESIDUALES URBANAS**

Rivadeneira, M.A. ; Rivadeneira, A. ; González-López, J. ; Sánchez- Ruiz Jiménez, C. ; Martín-Ramos, D. y Martinez-Toledo, V.

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA MATERIA ORGANICA EN LA PRECIPITACION BACTERIANA DE CARBONATOS**

Silva-Castro, G.A.; Uad, I.; Sánchez-Ruiz Jiménez, C. y Rivadeneira, M.A..

**ESTUDIO DE PRECIPITACIÓN DE CARBONATOS EN BACTERIAS AISLADAS DEL FONDO MARINO: INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CALCIO**

Uad, I.; Silva-Castro, G.A.; Calvo, C.; Sánchez-Ruiz Jiménez; C. y Rivadeneira, M.A.,

**BACTERIAS DESNITRIFICANTES AUTOTRÓFICAS EN PILAS MICROBIANAS “PRODUCTORAS DE ELECTRICIDAD”**

Vilar-Sanz, A., Puig, S., Balaguer, M.D. , Colprim, J., Bañeras, L.



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

17:15 - 18:30h. Sesión: Ecología y Fisiología.

Moderadores: Alicia Estévez-Toranzo y Francisco Lucena





**COMPOSICIÓN ESPECÍFICA DEL BACTERIOPLANCTON COMO FACTOR REGULADOR DE LA RESPIRACIÓN DE LA COMUNIDAD: APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL**

Abad, N., Baña, Z. , Uranga, A., Ayo, B., Iriberry, J.

**EFICIENCIA DE CRECIMIENTO DEL BACTERIOPLANCTON MARINO COSTERO Y ADAPTACIÓN DE LA COMUNIDAD A LO LARGO DEL CICLO ESTACIONAL**

Uranga, A., Baña, Z., Abad, N., Ayo, B., Iriberry, J.

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA SUPERVIVENCIA DE *Edwardsiella tarda* EN AGUA NATURAL DE L'ALBUFERA**

Alcaide, E., Esteve, C.

**DISTRIBUCIÓN TEMPORAL Y RESERVORIOS DE *Edwardsiella tarda* EN EL LAGO DE L'ALBUFERA**

Esteve, C., Alcaide, Elena

**INTERCEPTACIÓN DE SEÑALES DE QUORUM SENSING TIPO N-ACILHOMOSERÍN LACTONAS EN AISLADOS DE AGUA DE MAR**

Romero, M., Casero Bustos, V., Otero, A.

**CAMBIOS ESTACIONALES EN EL BACTERIOPLANCTON DE LA "RÍA DE VIGO", NO-ESPAÑA**

Novoa, Beatriz, Alonso-Gutiérrez Jorge, Lekunberri Itziar, Teira Eva, Gasol Josep M., Figueras Antonio



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

### **Miércoles 15 de septiembre**

9:00-11:00h. Sesión: Patología de especies acuícolas.

Moderadores: Carmen Márquez Marcos y Anicet Blanch.

**VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA DE CEPAS DE *Yersinia ruckeri* CAUSANTES DE RECIENTES EPIZOOTIAS DE ERM EN CULTIVOS DE SALMÓNIDOS.**

Bastardo, A\*, Ravelo, C, Toranzo A., Romalde J. L.

**EVALUACION DE DIFERENTES TECNICAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACION INTRAESPECIFICA DE *Edwardsiella tarda***

Castro, N., Magariños, B., Toranzo A.E.

**COLONIZACIÓN DE RODABALLO POR CEPAS VIRULENTAS Y AVIRULENTAS DE *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* DURANTE LA INFECCIÓN**

Bobo, M. , Rivera, L., Lago, E.P., Milton, D.L., Nieto, T.P. , Farto, R.

**PRIMER AISLAMIENTO DE *Tenacibaculum mesophilum* EN POBLACIONES DE ALMEJA CULTIVADA.**

Diéguez, A.L., Labella, A. , Balboa, S., Castro, D. , Borrego, J.J. , Romalde, J.L.

**EFFECTOS FENOTÍPICOS DE LA MUTACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS PROTEASAS EXTRACELULARES FPP1 Y FPP2 DE *Flavobacterium psychrophilum*.**

Gómez, E., Pérez-Pascual, D., Álvarez, B., Guijarro J.A.

**ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE “QUORUM SENSING” DE *Aeromonas salmonicida*, ASAR/I, EN LA VIRULENCIA DE ESTA ESPECIE EN RODABALLO**

Lago, E.P., Bobo, M., Rivera, L., Nieto, T.P., Farto, R.

**IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO TRANSPORTADOR DE CISTEÍNA EN BACTERIAS IMPLICADO EN LA VIRULENCIA DE *Yersinia ruckeri*.**

Méndez, J., Navais, R., Reimundo, P., Guijarro, J.A.

**LA CAPACIDAD HEMOLÍTICA DE *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* RESIDE EN DOS HEMOLISINAS, DLY Y HLYA, CODIFICADAS EN UN NUEVO PLÁSMIDO**

Rivas, A.J., Puentes, B., Osorio, C.R., Lemos, M.L.



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

11:15-13:30h. Sesión: Biodiversidad microbiana de los sistemas acuáticos.

Moderadores: José Manuel Martínez Peinado y María José Pérez Álvarez.

**HUEVOS DE MOSQUITOS *Chironomus* sp., UN NUEVO HÁBITAT PARA *Aeromonas aquariorum*, UNA BACTERIA POTENCIALMENTE PATÓGENA**

Beaz-Hidalgo R., Figueras M.J., Senderovich Y, Laviad S., Halpern M.

**MICROBIOTA ASOCIADA A HUEVOS DE PULPO (*Octopus vulgaris*) EN CULTIVO**

Combarro, M. P., Míguez, B., Sestelo, A.B.S, Sieiro, C.

***Joostella ponsvetera* sp. NOV. AISLADA DE ALMEJA FINA (*Ruditapes decussatus*) CULTIVADA EN LA RÍA DE PONTEVEDRA.**

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

***Janthinobacterium lividum* AISLADA EN UN MANANTIAL MINEROMEDICINAL**

De la Rosa, M C., Platero, L., Navarro-García, F. y Mosso, M. A.

**DIVERSIDAD Y NOVEDAD TAXONÓMICA ENTRE BACTERIAS QUIMIOHETEROTROFAS MARINAS AISLADAS DE LA MALVARROSA**

Lucena, T., Macián, M.C., Pujalte, M.J., Arahal, D.R.

**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL CULTIVO LARVARIO DEL PULPO (*Octopus vulgaris*)**

Míguez, B., Sestelo, A.B.S, Sieiro, C., Combarro, M. P.

**ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVABLE DE LA LAGUNA DE LA CALDERA DEL PARQUE NACIONAL DE SIERRA NEVADA (GRANADA)**

Reboleiro-Rivas, P., Rodelas-González, B., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J., Fenice, M., Cortés-Lorenzo, C., Andrade, L., Juárez-Jiménez, B.

**VIBRIOS ASOCIADOS A REPRODUCTORES DE OSTRA PLANA (*Ostrea edulis*) DURANTE EL ACONDICIONAMIENTO EN CRIADERO.**

Dubert Pérez, J., Barja Pérez, J.L., Prado Plana, S.

**UNA NUEVA PROTEOBACTERIA MARINA CERCANA A *Shimianautella* - *Phaeobacter***

Pujalte, M.J., Lucena, T., Ruvira, A., Macián, M.C., Arahal, D.R.



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

15:30-17:00h. Sesión: Patología de especies acuícolas.

Moderadores: Carles Borrego Moré y Luis Alfonso Rodríguez López.

**ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LA PROTEÍNA MX DE LENGUADO SENEGALÉS**

Álvarez-Torres, D., García-Rosado, E., Fernández-Trujillo, M.A., Castro, D., Béjar, J., Borrego, J.J., Alonso, M.C.

**ACTIVIDAD ANTIVÍRICA DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS ALIMENTARIOS FRENTE A VIRUS DE SALMÓNIDOS.**

De las Heras, A., Carrillo, W., Recio, I., Ortiz-Delgado, O., Sarasquete, C., Pérez-Prieto, S., Rodríguez Saint-Jean, S.

**EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MX EN CÉLULAS DE DORADA (SAF-1) Y ACTIVIDAD ANTIVIRAL CONTRA LINFOCISTIVIRUS (LCDV)**

Jimenez-Valverde, E., Cano, I., Garcia-Rosado, E., Alonso, M.C., Borrego, J.J., Castro, D.

**ANÁLISIS DE FACTORES DE VIRULENCIA DE BIRNAVIRUS ACUÁTICOS AISLADOS DE PECES SALVAJES**

Lago, M., Bandín, I., Rodríguez, J.F. y Dopazo, C. P.

**DETECCIÓN DE NODAVIRUS EN TEJIDOS DE LUBINAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE**

Lopez-Jimena, B., Infante, C., Lopez-Sanchez, I.M., Manchado, M., Castro, D., Borrego, J.J., Alonso, M.C., Garcia-Rosado, E.

**INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE BETANODAVIRUS RECOMBINANTES EN LENGUADO (*Solea senegalensis*)**

Souto, S. , Olveira, J. G., Dopazo, C. P., Barja, J. L. & Bandín I.

**EL PEZ CEBRA (*Danio rerio*) COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y LA RESPUESTA INMUNE.**

Figueras, Antonio, Rodríguez, Iván, Dios, Sonia, Romero, Alejandro y Novoa, Beatriz



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

17:15- 18:15h. Sesión: Biodiversidad microbiana de los sistemas acuáticos.

Moderadores: M<sup>a</sup> Angustias Rivadeneyra Ruiz y Antonio Figueras





**CARACTERIZACIÓN DE TRES NUEVOS ELEMENTOS INTEGRATIVOS Y CONJUGATIVOS (ICES) EN VIBRIOS AISLADOS DE PECES**

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

**DIVERSOS GENOTIPOS DE *Aeromonas veronii* ESTAN PRESENTES EN UN ACUARIO DE PECES TROPICALES DE AGUA DULCE Y EN LOS CARACOLES QUE LO INFESTAN.**

Paredes K., Beaz-Hidalgo R., Figueras M. J.

**DIVERSIDAD DE ARCHAEA EN LAGOS CÁRSTICOS ESTRATIFICADOS CON ANOXIA ESTACIONAL ¿QUIÉN ANDA AHÍ?**

Fillol, M., Plasencia, A., Llirós, M., Gich, F., Borrego, C.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE CEPAS DE *Streptococcus phocae* AISLADAS DE SALMÓN Y FOCA**

Ruben Avendaño-Herrera, Sabela Balboa, Alberto Contreras-González, Beatriz Magariños, Jorge Fernández, Alicia E. Toranzo, Jesús L. Romalde



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

## **Jueves 16 de septiembre**

9:00-11:00h. Sesión: Avances metodológicos.

Moderadores: M<sup>a</sup> Jesús Pujalte y Manuel Lemos Ramos

**COMPARACIÓN DE TRES PAREJAS DE CEBADORES PARA LA DETECCIÓN DEL PATÓGENO DE ALMEJA *Vibrio tapetis***

Balboa, S., Doce, A., López-Diéguez, A., Romalde, J.L.

**UTILIDAD DEL CHROMagar™ VIBRIO PARA SU USO EN ACUICULTURA**

Buján, N., Bastardo, A., Diéguez, A .L., Romalde, J. L. y Barja, J. L.

**VALORACIÓN DE MÉTODOS MINIATURIZADOS PARA LA DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA DE *Bacteroides spp.* Y *Bifidobacterium spp.***

Casanovas-Massana, A. y Blanch, A.R.

**COMPARACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL Y LA ISO 21872-1:2007 PARA LA DETECCIÓN DE *Vibrio parahaemolyticus* PATÓGENO**

Garrido, A., Chapela M.J., Lago J., Ferreira M., Atanassova M., Vieites J.M., Cabado A.G.

**DISCRIMINACIÓN DE BACTERIOFAGO T4 INFECTIVO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL Y PROPIDIO MONOAZIDO (PMA)**

Fittipaldi, M, Pino Rodriguez, N, Codony, F, Adrados, B, Agusti, G, Peñuela, G, Morató, J

**ELIMINACIÓN VIRAL DURANTE PROCESOS DE DEPURACIÓN EN ALMEJAS CONTAMINADAS ARTIFICIALMENTE CON VIRUS ENTÉRICOS**

Polo, D., Álvarez, C., Díez, J., Manso, C.F., Angulo, M., Vilariño, M.L., Darriba, S.2, Longa, A., Romalde, J.L.

**CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN *Aeromonas salmonicida subsp. Salmonicida* MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL**

Rivera, L., Bobo, M., Lago, E.P, Nieto, T.P., Farto, R.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE *Legionella pneumophila* (CULTIVO, VIABLES, PCR REAL TIME Y PMA PCR)**

Saucedo, G., Terradillos, A., Codony, F. Huguet, J.M.





## Biografía de la Dr. D. Milton

Debra Milton es actualmente Associate Professor (University Lecturer) del Departamento de Biología Molecular, interfacultativo de las facultades de Ciencia y Tecnología y Medicina de la Universidad de Umeå.

De nacionalidad estadounidense, realizó sus estudios de Microbiología y se doctoró en Bioquímica en la Universidad de Alabama. Actualmente lleva más de 10 años en la ciudad sueca de Umeå, donde dirige el centro de Estudios Postdoctorales de Microbiología de su Universidad.

La profesora Milton se define como una amante de las bacterias, a las cuales gusta “escuchar cómo se hablan unas a otras”, y es una de las investigadoras más prestigiosas en el campo de las enfermedades infecciosas.

Sus investigaciones más recientes se centran en un proyecto postdoctoral sobre “*Quorum Sensing* and Type VI Secretion System of *Vibrios*” del Umeå Center for Microbial Research.

Trabaja en la supervivencia y los mecanismos de virulencia de *Vibrio anguillarum*, bacteria marina que forma parte de la microbiota de peces y otros organismos acuáticos. Esta bacteria puede comportarse como un patógeno oportunista que produce una septicemia mortal en los individuos inmunodeprimidos o con mucosas dañadas. La Dra. Milton ha estudiado la forma de colonización y la puerta de entrada de este patógeno en los distintos hospedadores. Sus estudios más recientes se refieren a la comunicación entre bacterias, mecanismo conocido como “*Quorum Sensing*”, que sirve a las bacterias para detectar la densidad poblacional bacteriana, entre otras muchas funciones, mediante la excreción de moléculas-señal que son recibidas por otras bacterias de la misma especie para realizar una función común. Este mecanismo se ha demostrado implicado en la regulación de funciones ecológicas, fisiológicas y de patogenicidad bacteriana.

El objetivo de su actual trabajo es conocer y bloquear estas señales de comunicación entre bacterias para poder desarrollar una alternativa a los antibióticos en el tratamiento de enfermedades bacterianas.

Un gran número de publicaciones, revisiones, conferencias, proyectos y colaboraciones internacionales avalan su categoría científica. El grupo de investigadores de la Universidad de Umeå al que ella pertenece ha sido financiado con 77,5 millones de coronas suecas por el Swedish Research Council para investigaciones en enfermedades infecciosas.

Su correo electrónico es: [debra.milton@molbiol.umu.se](mailto:debra.milton@molbiol.umu.se)

Tel +46-90-785-0815 | Mob 0730-418551



# **Ponencias**







## MECHANISMS OF VIRULENCE AND QUORUM SENSING IN *Vibrio anguillarum*

Debra Milton  
Department of Molecular Biology  
Umeå University, Sweden

*Vibrio anguillarum* causes a fatal haemorrhagic septicaemia in marine fish. During initial stages of infection, bacteria must attach to and colonize host tissues. For fish bacterial pathogens, few virulence factors required for colonization of fish tissues have been identified. Using in vivo bioluminescent imaging, the temporal and spatial spread of *V. anguillarum* during an infection in rainbow trout was investigated. The wild type rapidly colonized both the skin and the intestines within 24 h after infection. Interestingly, bacterial numbers on the skin were significantly higher than in the intestines. Mutants defective for the anguibactin iron uptake system, exopolysaccharide transport, and Hfq, an RNA chaperone, could not colonize the skin or cause disease 96 h after infection but did proliferate in the intestines. Each of these virulence factors increased resistance to antimicrobial components found in skin mucus, such as antimicrobial peptides and lysozyme. Thus, *V. anguillarum* encodes several mechanisms to protect against the immune response of the skin mucus enabling an abundant growth on the skin enhancing its opportunity to cause disease.

To understand further host-pathogen interactions, we identified an antimicrobial role for keratocyte cells, the main structural component of the fish skin epidermis. Using live-cell and confocal microscopy, keratocytes were shown to internalize various species of bacteria; whereas, *V. anguillarum* evaded uptake by these cells. A transposon mutant was identified that could not evade internalization by the keratocytes. The transposon was localized to the *wzm-wzt-wbhA* operon, which encodes two ABC transporter proteins and a permease methyltransferase that are involved in the transport of O-antigen lipopolysaccharides. Mutants defective in lipopolysaccharide transport do not colonize the fish skin but do colonize the intestines. Taken together, these data suggest that the keratocytes are part of the immune response of the fish skin and *V. anguillarum* utilizes lipopolysaccharides to evade internalization by the keratocytes.

Bacteria coordinate activities as a population via a cell-cell communication called quorum sensing. Diffusible signal molecules, such as *N-acylhomoserine* lactones, are secreted by the bacteria and accumulate as the population grows. When a signal molecule reaches a threshold concentration, quorum-sensing systems induce or repress gene expression. Both pathogenic and environmental isolates of *V. anguillarum* produce *N-acylhomoserine* lactones suggesting that quorum sensing affects both the ecology/physiology and pathogenicity of this bacterium. In *V. anguillarum*, quorum sensing regulates extracellular protease activities, pigment production, catalase production, biofilm formation, and



VIII MMA

VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

type VI protein secretion. These activities may aid survival of *V. anguillarum* in the seawater or in the fish host. Although no direct correlation can be made yet between quorum-sensing and virulence, quorum sensing does modulate adaptation to stress response. Recently, we have identified novel aspects of the *V. anguillarum* phosphorelay signalling system that are not seen in other vibrio quorum-sensing systems. A summary of this new data will be presented. As *V. anguillarum* is widely distributed in the aquatic environment, quorum sensing may coordinate numerous physiological activities needed to survive as a population in the highly variable aquatic environment.

# **Contaminación microbiana**



## DETECCIÓN, VIABILIDAD E INFECTIVIDAD DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* SPP EN AGUAS REGENERADAS

Agulló-Barceló, M<sup>1</sup>, Huguet, Josep Maria<sup>2</sup>, Jofre, J<sup>1</sup>, Lucena, F<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona. <sup>2</sup> Aigües de Barcelona, C/ General Batet, 5-7, 08028- Barcelona.

La regeneración de agua residual nos permite dar nuevos usos al agua residual en escenarios en que no sea necesaria la calidad de agua potable. Así pues, el proceso de regeneración se muestra como una nueva fuente de agua sostenible. Los tratamientos de regeneración que tienen lugar en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARes), pueden variar enormemente, pero todos ellos deben garantizar que el efluente que va a ser reutilizado tenga la calidad adecuada debido al origen fecal de ésta y al riesgo sanitario que implica su uso. La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua regenerada es uno de los riesgos sanitarios con los que hay que tratar cuando se analiza la calidad microbiológica del efluente.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio sobre las concentraciones de estos ooquistes; su relación con las esporas de clostridios sulfito-reductores (SRC); la disminución a lo largo del tratamiento tanto de la concentración como de la viabilidad y la infectividad de éstos; y por último, el genotipado y subgenotipado de dichas poblaciones.

Para la realización del trabajo se cogieron muestras de agua residual cruda, de efluente secundario y de efluente terciario de 5 EDARes distintas de Cataluña. Para el estudio de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. la metodología fue la siguiente: La concentración y elución de las muestras de agua residual cruda y de efluente secundario se hizo mediante filtración por membrana (Montemayor, M. 2007. Tesis Doctoral). Para la concentración de muestras de efluente terciario, la purificación de ooquistes (IMS: *Immunomagnetic Separation*), el marcaje con anticuerpos para la detección y el marcaje con DAPI para viabilidad, se siguieron las indicaciones descritas en EPA *Methods* 1623 (2005). Para el recuento de los ooquistes de *Cryptosporidium* y la determinación de la viabilidad, se usó la citometría en fase sólida (LSC, *Laser Scanning Cytometry*). El análisis de la infectividad se realizó sembrando las muestras (ooquistes purificados) en una monocapa de cultivo celular (células HCT8) y el posterior recuento de focos de infección en dicho cultivo (FDM, *Focus Detection Method*) (Silfko et al, 1997). Las extracciones de DNA se hicieron con el QIAamp DNA blood mini kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se usaron las muestras de ooquistes previamente purificados (IMS). Para el genotipado de las muestras se realizó el protocolo PCR-RFLP (Xiao et al, 2001) basado en la amplificación del gen que codifica la subunidad pequeña del rRNA del 18S y su posterior digestión con enzimas de restricción. Para el subgenotipado de las muestras que fueron



*C. hominis*, se analizó la secuencia de DNA del gen gp60 de dichas muestras (Sulaiman et al, 2001; Peng et al, 2001; Chalmers et al, 2005).

Existe una correlación moderada entre las concentraciones de SRC (ufc/100mL) y las de ooquistes de *Cryptosporidium* (ooq/L) a lo largo del tratamiento. Estos resultados muestran que los SRC son buenos indicadores de proceso de los ooquistes de *Cryptosporidium*. De media, el porcentaje de muestras positivas fue de 92% en la entrada, 73% en efluente secundario y 87% en efluente terciario. Las concentraciones de ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua de entrada oscilan entre 1,46 y 3,87 uLog (ooq/L), en el efluente secundario de 0,2 a 3,6 uLog y en el efluente terciario de 0 a 1,3 uLog. Los porcentajes de infectividad de los ooquistes son de media 40%, 30% y 0,15% en agua de entrada, efluente secundario y terciario respectivamente. La disminución de estos parámetros a lo largo del tratamiento es estadísticamente significativa. La reducción media del número de ooquistes desde la entrada al efluente terciario es de 3 uLog; los ooquistes viables se reducen aproximadamente 0,6 uLog y los ooquistes infecciosos alrededor de 2,75 uLog. Cuando el tratamiento terciario dispone de luz UV, no se encuentran ooquistes infecciosos en el agua regenerada, en cambio, cuando el tratamiento no tiene luz UV sí que encontramos ooquistes infecciosos. En las plantas depuradoras 1 y 2, la distribución anual de ooquistes de *Cryptosporidium* muestra un marcado incremento en verano y una disminución en invierno, probablemente por el incremento de actividades relacionadas con el agua durante los meses de verano. Las poblaciones de *Cryptosporidium* encontradas en estas EDARes a lo largo del año han sido *C. hominis* de la familia IbA10G2, que causa el 92% de los casos de criptosporidiosis en la población.



## CUANTIFICACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE *E. coli* EN EFLUENTES SECUNDARIOS POR PROTOZOOS BACTERIVOROS

Benítez G.A.<sup>1\*</sup>; Vargas, L.P<sup>1</sup>; Wrent, P.<sup>1</sup>; Silóniz, M.I.<sup>1</sup> y Peinado, J.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid.

La autodepuración del agua, es decir, la eliminación de las bacterias patógenas por diversos mecanismos presentes en ella, sin intervención externa, es un sistema regenerador con numerosas ventajas. Es eficiente, muy barato y con bajo impacto ambiental. Sin embargo tiene como principal inconveniente su baja fiabilidad, por la fuerte dependencia de los mecanismos potenciales subyacentes (predación por protozoos, toxinas, fagos, competición nutricional con el resto de la microbiota, etc.) de los factores ambientales y también por la gran variabilidad en la composición de los propios efluentes. Nuestro objetivo, dentro del proyecto TRAGUA para la regeneración de aguas residuales tratadas, es desarrollar una metodología que permita evaluar cuantitativamente la capacidad de autodepuración de los efluentes secundarios y terciarios de las depuradoras urbanas e industriales. Para ello, hemos desarrollado un protocolo, basado en la inoculación de la muestra a evaluar con una cepa de *E. coli*, aislada de aguas residuales, que nos permite seguir su inactivación a lo largo del tiempo. También hemos validado un modelo matemático que sirve para describir, cuantificar y analizar la cinética de inactivación, tanto en efluentes naturales, como en efluentes tratados para conseguir que sólo funcione uno de los mecanismos potenciales de inactivación (1). En esta comunicación presentamos los resultados correspondientes a efluentes secundarios de una depuradora urbana en los que se han medido las cinéticas de inactivación a) en el efluente completo (control positivo), b) en el efluente tratado para eliminar todos los mecanismos de inactivación (control negativo) y c) en el efluente tratado reinoculado con sus propios protozoos que habían sido previamente separados por filtración. Pudimos observar que, como en otros casos anteriores, el protocolo diseñado para eliminar todos los mecanismos inactivantes (centrifugación, filtración y tratamiento térmico) fue totalmente eficaz, porque las bacterias inoculadas en ellos sobrevivieron sin pérdida aparente de viabilidad durante dos meses. Estos efluentes, cuando fueron reinoculados con sus protozoos endógenos, mostraron una inactivación bacteriana cuya cinética podía ser adecuadamente descrita por el modelo matemático que habíamos desarrollado previamente para efluentes completos. Comparando ambas cinéticas, a través de las ecuaciones correspondientes del modelo, hemos podido estimar cuantitativamente la aportación de los protozoos al proceso completo de inactivación. En ningún momento la predación por protozoos puede explicar la inactivación medida en el efluente completo y su aportación va disminuyendo con el tiempo hasta hacerse irrelevante. Nuestros resultados también confirman la hipótesis de que existe una población bacteriana crítica (entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>3</sup> UFC/ml) por debajo de la cual la predación se torna muy difícil. Concluimos por tanto que la presencia



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

de protozoos bacterívoros en la caracterización inicial del efluente no parece ser un criterio relevante para predecir la concentración final de bacterias que se puede alcanzar en el proceso de autodepuración. Es necesario identificar los mecanismos presentes en los efluentes completos, que inactivan *E. coli* hasta los niveles compatibles con la utilización de estos efluentes autodepurados en usos agrícolas e industriales.

(1) Benitez, J.A.; Arias, J.D.; Rivas, E.M.; Wrent, P; de Silóniz, M.I and Peinado, J.M. "Use of a predictive model to calculate *E. coli* survival in waste water after secondary and tertiary treatments" WIT Transactions on Ecology and the Environment" 125:139-45 (2009)





## RESPUESTA AL AMBIENTE MARINO DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN SISTEMAS DE FILTROS SUMERGIDOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Cortés-Lorenzo, C.<sup>1,2</sup>, Juárez-Jiménez, B.<sup>1,2</sup>, Reboleiro-Rivas, P.<sup>1,2</sup>, Uad, I.<sup>1,2</sup> y González-López, J.<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071, Granada, España.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología. Instituto del Agua. Universidad de Granada. 18071, Granada, España.

La ubicación en Andalucía y otras regiones españolas de depuradoras en zonas costeras presenta frecuentemente el problema de la intrusión marina. Ello determina la entrada en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) de influentes con valores de salinidad variable, hecho que dificulta el funcionamiento de las instalaciones y específicamente de los reactores biológicos. En dichos reactores biológicos, la salinidad puede afectar a la estructura y biodiversidad de las biopelículas microbianas responsables del proceso depurativo.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un biorreactor de filtro sumergido a escala de laboratorio que nos permita el estudio biológico del proceso de depuración de aguas residuales en condiciones de salinidad variable así como el efecto de la salinidad sobre los microorganismos implicados en el proceso depurativo.

Para conocer el efecto de la salinidad sobre la microbiota del filtro sumergido se ha desarrollado un biorreactor de filtro sumergido a escala de laboratorio y se han realizado estudios comparativos estableciéndose condiciones de salinidad variable de 3, 12 y 24 mS, manteniéndose constantes todos los demás parámetros de temperatura, caudal, tiempo de retención hidráulico y pH del sistema. Estos parámetros fueron inicialmente establecidos a la concentración de 3 mS (salinidad normal de un agua residual), siendo en consecuencia la única variable de proceso la concentración salina.

Para conocer la respuesta de la microbiota del filtro sumergido al ambiente marino se realizó un estudio biológico específico de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y alcalina, glucosidasa, esterasa y proteasa, bajo las distintas condiciones de salinidad. Además, se ha caracterizado la estructura de las biopelículas generadas en el sistema influido por la salinidad empleando técnicas basadas en la extracción de ácidos nucleídos (DNA) que nos han permitido conocer los perfiles de biodiversidad mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

Los resultados biológicos obtenidos en este estudio, ponen de manifiesto que, en general, a medida que aumenta la concentración salina, las actividades



enzimáticas disminuyen debido fundamentalmente a la plasmólisis de las células, siendo las actividades fosfatasa ácida y esterasa las que se ven más afectadas.

La filogenia basada en la secuencia parcial del gen codificante del ARNr 16S indica que las bacterias predominantes en el sistema de filtros sumergidos a altas concentraciones salinas están evolutivamente próximas a las bacterias marinas de la subclase Alfa-Proteobacteria. Otras secuencias identificadas a partir del ADN extraído y amplificado de las biopelículas del sistema objeto de estudio se encuadran en las clases Delta-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria y Nitrospira.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que pese a las alteraciones propias inducidas por la intrusión marina, los sistemas de biopelícula fija (sistemas de lechos sumergidos) presentan una importante capacidad de adaptación a estos cambios ambientales en cuanto a su actividad depurativa y a sus comunidades bacterianas, lo que les hace especialmente adecuados para el tratamiento de aguas residuales con salinidad variable.



## ESTABILIDAD DE LAS POBLACIONES DE DESNITRIFICANTES EN SEDIMENTOS DE HUMEDALES DE TRATAMIENTO

García-Lledó, A.<sup>1\*</sup>, Vilar-Sanz, A.<sup>1</sup>, Trias, R.<sup>1</sup>, Hallin, S.<sup>2</sup>, Bañeras, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grup d'Ecologia Microbiana Molecular (Institut d'Ecologia Aquàtica) Universitat de Girona. Facultat de Ciències Campus Montilivi s/n, 17071, Girona, Espanya.

<sup>2</sup>Departamento de Biología. Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7025, Uppsala 750 07, Suecia.

La eficiencia en la eliminación de nitrógeno es el aspecto más relevante en la aplicación de humedales para el tratamiento de aguas residuales (SHT). La completa eliminación de nitrógeno de las aguas es llevada a cabo casi exclusivamente por microorganismos mediante los procesos de nitrificación y desnitrificación. La desnitrificación incompleta puede suponer un perjuicio para el medio ambiente, debido a que tiende a la acumulación de gases (óxido nitroso y nítrico) de efecto invernadero. La presencia de vegetación es un aspecto clave en estos sistemas para asegurar una buena depuración del agua. Medidas de las tasas de reducción de nitrato llevadas a cabo por nuestro grupo muestran que la posición de la vegetación en el humedal es, además, un factor a tener en cuenta para determinar una buena eliminación de nitrógeno. Desafortunadamente, el efecto de la vegetación sobre la densidad de las poblaciones de bacterias nitrato reductoras y desnitrificantes no se ha estudiado con suficiente detalle para determinar si las variaciones en las tasas de desnitrificación pueden estar relacionadas con variaciones en las poblaciones bacterianas.

El presente estudio tiene como objetivo determinar la abundancia de los microorganismos implicados en el proceso de desnitrificación en el SHT de Empuriabrava en muestras de sedimento libres de vegetación y cubiertas con *Typha* sp. o *Phragmites* sp.

Con este fin, se realizaron 4 campañas de muestreo, en Mayo y Agosto 2008, y en Marzo y Julio 2009 coincidiendo con variaciones en los niveles de amonio en el agua de entrada. En cada una de las muestras se extrajeron los ácidos nucleicos siguiendo una modificación del método de Hurt *et al.* (2001). La cuantificación del ADN se realizó espectrofotométricamente (espectrofotómetro NanoVue™ Plus). La abundancia de las bacterias nitrato reductoras y desnitrificantes y su abundancia relativa se realizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) de los genes 16S rRNA, *narG* y *napA* (nitrato reductasas), *nirS* y *nirK* (nitrito reductasas) y *nosZ* (óxido nitroso reductasa).

Los resultados obtenidos demuestran que la abundancia de bacterias desnitrificantes en el sedimento es muy estable y oscila entre valores de 10<sup>9</sup> a 10<sup>10</sup> copias de *nosZ*/g peso fresco, independientemente del tipo de sedimento analizado. Las bacterias desnitrificantes (*nosZ*) representan del 59% al 79% del total (gen 16S rRNA), si consideramos una ratio de 1:1 entre ambos genes



por genoma bacteriano. Por otra parte, el porcentaje de bacterias capaces de reducir el nitrato era supuestamente superior ya que la abundancia de los genes *narG* y *napA* sobrepasaba los valores de *nirS* y *nirK*. Se estima que, en el SHT Empuriabrava, entre el 7% y el 22% de las células bacterianas son capaces de reducir el nitrato pero no completarían un proceso desnitrificativo. En todas las muestras estudiadas, el número de proteobacterias (copias del gen *narG*) es similar al de *napA*, como ya se había visto anteriormente en muestras de suelo (Bru *et al.* 2007, Carter *et al.* 1995, Roussel-Delif *et al.* 2005). Además, la correlación entre los genes que codifican para estas dos nitrato reductasas ( $R^2=0,8$ ) sugiere que el papel ecológico de *napA* sería similar o complementario al de *narG* (Bru *et al.* 2007).

Por otra parte, y teniendo en cuenta que las nitrito reductasas bacterianas se agrupan en dos clases perfectamente diferenciadas y excluyentes, *nirS* y *nirK*, se ha podido comprobar que el número de bacterias que contienen gen *nirK* es ligeramente superior al de las que contienen el gen *nirS* (0,85 copias *nirS*/copias *nirK*). La ratio entre *nosZ* y la suma de las enzimas Nir (*nirS+nirK*) da un valor de 0,45 ( $SD \pm 0,01$ ), hecho que indica que solo la mitad de las bacterias capaces de reducir el nitrito poseen la enzima necesaria para su total reducción a  $N_2$ , con lo que podrían aparecer gases de efecto invernadero.

En este estudio ponemos de manifiesto la elevada estabilidad de los sistemas de humedales de tratamiento en lo que a la abundancia de bacterias activas en el ciclo del nitrógeno se refiere. Además, el estudio cuantitativo revela la potencialidad de algunos procesos contraproducentes en el proceso de eliminación de nitrógeno como son la acumulación de nitrito y de gases de efecto invernadero.

## DESTINO DE *Escherichia coli* DURANTE EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE FANGOS ACTIVADOS.

Garaizabal, I., Arana, I., Orruño, M., Barcina, I.

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco, UPV/EHU. Apdo. 644, 48080 Bilbao.

La escasez de agua, agravada por el aumento social de su demanda, nos conduce a un planteamiento serio sobre su reutilización. En este escenario, el tratamiento de las aguas residuales es una herramienta cada vez más necesaria. La depuración mediante fangos activados es el método más extendido, debido a su bajo coste y a su eficacia en la reducción del contenido en materia orgánica y en microorganismos. Conocer los procesos microbianos que tienen lugar durante el tratamiento y cual es el destino de la biomasa bacteriana durante el mismo, nos permitirá establecer la eficacia real del proceso. El comportamiento y destino de *Escherichia coli* durante el tratamiento sirve de modelo para predecir el devenir de las bacterias intestinales, incluidas bacterias patógenas. En este trabajo, hemos utilizado la cepa *E. coli* ABCGFP, cepa aislada del agua residual a la que mediante conjugación se le ha insertado el gen *gfp* que codifica información para la expresión de la proteína fluorescente GFP. Estas cepas que expresan proteínas fluorescentes pueden distinguirse en el conjunto de una población heterogénea.

En este trabajo se comprobó la evolución de esta cepa durante su permanencia en microcosmos de agua residual decantada, en ausencia y presencia de la microbiota del agua residual. Posteriormente, el devenir de este microorganismo test se monitorizó en una planta de tratamiento miniaturizada.

En las experiencias realizadas, hemos obtenido una reducción de las densidades de células totales y cultivables de *E. coli* ABCGFP sin que se induzca la transición al estado viable no cultivable. Además, es de destacar la escasa importancia de los bacteriófagos en la eliminación de *E. coli* del sistema, resaltando el papel de los protozoos en el control de la densidad de las bacterias intestinales y su retirada de los efluentes. La reducción en la población de *E. coli* durante el tratamiento puede atribuirse tanto a procesos microbiológicos, relación de depredación por protozoos (eliminación real), como a procesos físico-químicos, adhesión y floculación (transvase de contaminantes bacterianos del agua al fango).

Los estudios realizados en la planta, mostraron como en el reactor biológico ocurre un trasvase de la cepa test desde la fase acuosa al flóculo donde va quedando retenida. Esta tendencia se observó igualmente en el decantador. Estos resultados confirman que los fangos generados en este tipo de tratamientos constituyen un reservorio de bacterias alóctonas.



## CONTROL MICROBIOLÓGICO DE UNA EDAR DE REFINERÍA

Infante, P.<sup>1</sup>, Rodríguez E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo Bioindicación de Sevilla (GBS). Barriada San José de Palmete. s/n. 41006. Sevilla.

### Introducción/objetivos

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones de GBS en Sevilla, donde se realizó un análisis de la macro y micro estructura de nueve muestras de fango activo de la EDAR de una refinería durante un periodo de dos meses. Para el estudio de las características macroscópicas, se realizó la prueba de la V30, a la vez que se analizaron las características microscópicas. Los resultados de estas pruebas permitieron dar un pronóstico del valor del índice de fago (Isac L. *et al.* 2007) que define la calidad del fango y cuyo valor oscila entre 0 y 100. También, se realizó un análisis de la población protozoaria, determinándose la densidad de microfauna, el número de especies detectadas, el índice de Madoni (SBI) (Pérez B. *et al.* 2005), el índice de Shannon (Estévez F.S. 2005), y finalmente el reparto porcentual de los grupos de protozoos presentes. Igualmente, se llevó a cabo la identificación y cuantificación de la población bacteriana dominante y secundaria mediante el empleo de diferentes técnicas de tinción (Gram, Neisser, PHB y Polifosfatos) y visualización al microscopio óptico.

### Métodos

El análisis macroscópico se lleva a cabo mediante la prueba de la V30, estudiándose cuatro parámetros: turbidez, flóculos en suspensión del clarificado, sedimentabilidad y olor.

Respecto al análisis microscópico, es necesario utilizar un microscopio óptico, visualizando a través del objetivo de 100x, sobre 25 microlitros de muestra. Se lleva a cabo un análisis de las características del flóculo y a continuación se estudia la diversidad de protozoos del fango a través de la identificación de las diferentes especies presentes.

Por último, realiza un estudio de la diversidad de las bacterias filamentosas. Previamente es necesaria una observación *in situ* de la muestra sin teñir a 1000x, para describir las especies más usuales en función de sus diferentes características morfológicas. Posteriormente se llevan a cabo las cuatro técnicas de tinción (Gram, Neisser, PHB y Polifosfatos), necesarias para la identificación definitiva de las especies bacterianas (Estévez F.S. 2005).

### Resultados

El estudio realizado, nos mostraba un sistema de depuración en el que tiene gran repercusión la gran variabilidad de influentes procedentes de las diferentes unidades de refino de la planta. Estos influentes tienen altas cargas de amonio, sulfuros, fenoles, hidrocarburos y aceite y grasas de tipo FAME, que



repercuten enormemente en las condiciones de formación flocular, oxidación del sistema y densidad y diversidad tanto de bacterias filamentosas como de protozoos. Se destaca la presencia de un morfotipo filamentosos (morfotipo 4 de *Thiotrix*), que está asociado a la presencia del vertido de FAME en el sistema y repercute negativamente en la formación flocular determinando así su capacidad de sedimentación. Esto se refleja en el rendimiento de depuración de la planta ocasionando los principales problemas.

### Conclusiones

Mediante este seguimiento, se ha realizado un examen microbiológico de la muestra del fango del reactor biológico del cual se extraen diversas conclusiones del estado flocular de la muestra y del desarrollo tanto de la población protista como de las bacterias filamentosas. Esto, acompañado del análisis de las características macroscópicas, nos ha ayudado a definir el índice del fango (IF), típico de la EDAR. Se determina una gran variabilidad de influentes contaminantes que aparecen en función de los crudos que se procesan, de la complejidad y tipos de procesos de cada planta. Cada vertido influye en la muestra de forma diferente, repercutiendo también en la comunidad de protozoos y filamentosas, estando asociados algunas especies a la presencia de éstos. Se ha determinado que el vertido que puede causar mayores problemas es el de FAME, ya que influye en una proliferación masiva del crecimiento filamentosos y es muy difícil de eliminar. Debido a esta problemática de vertidos continuados, se ha determinado que es un sistema que sufre continuamente problemas de falta de oxígeno en el reactor biológico y se considera necesario mantener unos niveles de oxigenación del reactor adecuados, que ayuden a establecer la estabilidad del sistema y poder mantener en unos valores adecuados la comunidad de protistas y filamentosas.



## PREVALENCIA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Arcobacter* spp EN AGUAS RESIDUALES PROCEDENTES DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO.

Levicán A<sup>1\*</sup>, Collado L<sup>2</sup>, Figueras M.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. IISPV. Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

**Introducción:** El género *Arcobacter* incluye bacterias consideradas patógenas emergentes, cuya principal vía de transmisión se considera que son alimentos de origen animal y las aguas contaminadas. Se ha demostrado una elevada prevalencia y diversidad de especies de *Arcobacter* en aguas de ríos, lagos, embalses y marinas contaminadas fecalmente, así como en plantas de tratamiento de aguas residuales y potables. La especie más aislada en aguas residuales es *Arcobacter butzleri* seguida de *Arcobacter cryaerophilus*. No obstante, se ha observado discrepancias en los resultados obtenidos en estudios que utilizan técnicas moleculares de detección en paralelo al cultivo.

**Objetivo:** Estudiar la prevalencia y diversidad genética de las especies de *Arcobacter* en una planta de tratamiento de aguas residuales, comparando los resultados obtenidos mediante detección directa en la muestra de agua por mPCR y tras el cultivo tanto directo como después del enriquecimiento en caldo CAT.

**Métodos:** Se realizó tres muestreos en los meses de abril, junio y octubre de 2009 en la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Reus. En cada muestreo se obtuvieron cinco muestras (agua de la entrada a la planta, decantador primario, tratamiento secundario o biológico, decantador secundario y agua de salida). Para cada muestra se realizó detección directa de especies de *Arcobacter* mediante mPCR y cultivo. Este último se realizó de dos formas, mediante siembra directa del agua por filtración pasiva en agar sangre de cordero y utilizando el mismo procedimiento pero tras realizar un enriquecimiento en caldo CAT, siempre incubando en aerobiosis 48 h a 30°C. Se repicaron ocho colonias con morfología típica de *Arcobacter* por placa que se confirmaron a nivel de género fenotípicamente. La identificación a nivel de especie se realizó en paralelo mediante mPCR y en base a los patrones de RFLP del gen 16S rDNA. Así mismo todos los aislados se genotiparon mediante ERIC-PCR para reconocer posibles clones y establecer la diversidad genética.

**Resultados:** Sólo en 6 muestras (40%) se detectó directamente *Arcobacter* spp. por mPCR, mientras que 13 de las 15 muestras (86.6%) resultaron positivas por cultivo directo y post enriquecimiento. Del total de 240 colonias investigadas solo 180 demostraron pertenecer a *Arcobacter*. Las especies predominantes



fueron *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* seguidas por la nueva especie *A. defluvii*, aislándose también una cepa que se identificó como otra posible nueva especie de *Arcobacter*. Respecto a la variabilidad genética detectada mediante el genotipado por ERIC-PCR, de los 180 aislados, 152 (84%) presentaron genotipos distintos, de los cuales 74 (49%) se obtuvieron por cultivo directo y 78 (51%) por cultivo post enriquecimiento. Además solo se recuperaron dos genotipos coincidentes mediante ambos procedimientos de cultivo en una misma muestra. Las especies predominantes por tipo de cultivo fueron *A. cryaerophilus* en el cultivo directo (50/74) y *A. butzleri* post enriquecimiento (58/78), las dos cepas coincidentes pertenecieron a *A. cryaerophilus* y *A. butzleri*.

Conclusiones: La detección directa de *Arcobacter* mediante mPCR mostró ser poco efectiva en muestras de aguas residuales al comparar los resultados con los obtenidos por cultivo.

La combinación de los dos tipos de cultivo (directo y post enriquecimiento) permitió una mayor recuperación tanto de especies como de cepas distintas que ambos procedimientos por separado, por lo tanto su utilización conjunta permitió establecer con mayor fiabilidad la incidencia de *Arcobacter* spp. en las muestras de aguas residuales.

Las aguas residuales parecen ser un reservorio importante de nuevas especies de *Arcobacter*.



## CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA EN BIOFILMS DESARROLLADOS SOBRE FILTROS DE ARENA Y CARBÓN ACTIVO GRANULAR UTILIZADOS EN POTABILIZACIÓN DE AGUAS

Noguerola, I., Borrego, C.

Grupo de Ecología Microbiana Molecular, Instituto de Ecología Acuática, Universitat de Girona. Campus de Montilivi, E-17071, Girona.

El proceso de potabilización engloba diferentes tratamientos que, aplicados en serie, eliminan contaminantes (físicos, químicos y biológicos) del agua y modifican sus características hasta hacerla apta para el consumo humano. Una de las etapas clave en este proceso es la filtración, que elimina gran parte del material inerte en suspensión y reduce la carga microbiana total. La filtración se realiza normalmente con filtros de arena o carbón activo granular (CAG). Estos materiales ofrecen una elevada relación entre superficie y unidad de peso (especialmente el CAG), lo que los convierte en buenos adsorbentes y, por tanto, en eficientes sistemas para la eliminación de microcontaminantes orgánicos y microorganismos. Sin embargo y debido a su uso continuado, la capacidad de adsorción de los filtros va disminuyendo progresivamente debido, entre otras causas, al recubrimiento de las partículas de arena y CAG por un biofilm bien desarrollado.

En el presente trabajo se ha estudiado la estructura de la comunidad procariota de estos biofilms mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y técnicas moleculares de "fingerprinting" genético con el objetivo de identificar los principales agentes biológicos responsables de su formación e intentar vincular su metabolismo potencial con la actividad del filtro "vivo". Aunque el estudio por TEM permitió observar diferencias cualitativas importantes entre los dos sustratos analizados y qué zonas eran las más susceptibles de ser colonizadas, no fue útil para conocer en detalle la composición de la comunidad procariota que formaba los biofilms. Con el posterior análisis molecular se pudieron identificar 50 filotipos dentro del Dominio *Bacteria* que se afiliaron en 10 fílums, siendo los más representativos las  $\alpha$ -*Proteobacteria*, los *Bacteroidetes* i las *Actinobacteria*. La riqueza dentro del Dominio *Archaea* fue inferior, destacando unos pocos filotipos, con carácter testimonial, de archaea metanógenas y halófilas (ambas *Euryarchaeota*), y una presencia destacada de *Crenarchaeota*. Dentro de este último reino, todos los filotipos identificados se afiliaron al *Marine Crenarchaeota Group* I.1a, un linaje formado por archaea nitrificantes que son ubicuas y muy abundantes en ecosistemas acuáticos tanto marinos como de agua dulce. Desafortunadamente, no ha sido posible aun relacionar de manera inequívoca la identidad de los filotipos recuperados con una actividad metabólica concreta dentro del sistema estudiado. Aun así, la presencia de filotipos de *Bacteria* y *Archaea* afiliados a fílums con representantes quimiolitotróficos capaces de oxidar amonio y de bacterias relacionadas con la degradación de contaminantes



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

VIII MMA

(ej. *Arthobacter* spp.) sugiere un papel destacado del biofilm en la eliminación de nutrientes y compuestos orgánicos del sistema y, por tanto, una contribución a tener en cuenta en el proceso de potabilización. Creemos que, bajo condiciones adecuadas de diseño y funcionamiento, la actividad biológica desarrollada por estos biofilms en los filtros de CAG y arena puede mejorar la eliminación de determinados componentes del agua y alargar el período recomendado para la regeneración del filtro.

## **OXIDACIÓN ANAERÓBICA DE LA PIRITA POR *Thiobacillus denitrificans*: ADHESIÓN A LA SUPERFÍCIE DEL MINERAL**

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

<sup>1</sup>Departament de Microbiologia y Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. 08028 Barcelona.

<sup>2</sup>Institut de Ciències de la Terra Jaume Almera, CSIC, Barcelona. 08028 Barcelona.

La contaminación de los acuíferos por nitratos supone, cada vez más, un serio problema. La desnitrificación es el proceso más importante para la atenuación de esta contaminación. La reducción del nitrato se puede producir mediante la oxidación de la materia orgánica y/o de distintos compuestos reducidos de azufre. No hay datos que indiquen que el nitrato pueda actuar como oxidante de la pirita en condiciones abióticas. En cambio, algunos estudios de campo aportan pruebas indirectas de la oxidación de la pirita, un reservorio muy importante de azufre reducido en muchas zonas. Esa oxidación se produciría mediante la respiración anaeróbica del nitrato por parte de bacterias desnitrificantes quimiolitotoautotróficas.

Experimentos previos en microcosmos de laboratorio han demostrado la capacidad de *Thiobacillus denitrificans* de reducir el nitrato creciendo autotróficamente utilizando la pirita como única fuente de electrones. También se ha podido observar que la reducción de nitrato es mayor en los experimentos con pirita de tamaño de partícula menor (es decir, con mayor superficie reactiva).

En acuíferos, la mayor proporción de la biomasa microbiana está adherida a los sólidos y sólo una pequeña parte vive de forma planctónica. Además, las bacterias adheridas muestran generalmente una mayor actividad metabólica, pero algunos experimentos muestran datos contradictorios. En este trabajo se ha estudiado el crecimiento anaeróbico y la capacidad de adhesión de la bacteria desnitrificante autotrófica *T. denitrificans* a la superficie de la pirita.

Se prepararon láminas de pirita pulidas (de 3×1×1 mm), que se depositaron en viales y se pusieron en contacto con una suspensión de 2 x 10<sup>7</sup> células de *T. denitrificans* durante 8 semanas. Cada semana se realizó el recuento de las bacterias en solución, diferenciando las viables de las no viables mediante el kit Live/Dead BacLight™ (Invitrogen, Live Technologies). Las muestras de láminas de pirita se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX) y por microscopía de fluorescencia, usando un microscopio confocal (Leica TCS SP2). Los resultados muestran, que *T. denitrificans* coloniza lentamente la superficie de la pirita. En primer lugar, se observan células individuales adheridas, después células en división formando microcolonias y finalmente las células individuales dejan de observarse porque las colonias se recubren de un grueso mucílago, formando una biopelícula. La colonización primaria de la superficie de la pirita se produce a la primera semana, y a las 3 semanas se observan las microcolonias.



Analizando un período de 4 semanas, se ha calculado una tasa de colonización aproximada de la pirita de  $25 \text{ cels mm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Los recuentos de la población adherida a la superficie de la pirita y la que se mantiene en solución muestran que, aunque el número de células adheridas a lo largo del tiempo va en aumento, el número de células planctónicas no varía de forma significativa. Analizando el porcentaje de células planctónicas viables se observa una ligera disminución con el tiempo, pero a las 8 semanas se detecta aún un 68% de células viables (a diferencia del 74–76% obtenido en las primeras 2 semanas).

Estos datos nos indican que la población de bacterias desnitrificantes planctónicas sobrevive a expensas del material solubilizado por parte de la población adherida. La gran cantidad de bacterias planctónicas viables favorece su dispersión y la colonización de nuevos nichos.

## VALORACIONES DE RIESGO (QMRA) EN JARDINES PRIVADOS CON AGUA REGENERADA

Rubiano, M. E.<sup>1</sup>; Céspedes-Sánchez, R. <sup>2</sup>; Burguera, M.<sup>1</sup>; Jofre, J.<sup>1</sup>; Lucena, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028, Barcelona, España.

<sup>2</sup>AGBAR: Aigües de Barcelona and CETaqua (Water Technology Center), Avda. Diagonal 211, 08018 - Barcelona, España.

Los problemas de disponibilidad de recursos hídricos para el consumo humano se han convertido en motivo de preocupación, debido a su creciente demanda, la escasez cada día mayor de las reservas existentes y el descenso paulatino de su calidad. En un marco de desarrollo sostenible, con el objetivo de paliar el déficit existente, se debe realizar una gestión integral de los recursos hídricos. Aquí aparece la reutilización de las aguas residuales, que dejan de ser consideradas un desecho y pasan a formar parte del ciclo del agua como un recurso más, el agua regenerada. Sin embargo, el uso de aguas regeneradas requiere valorar el riesgo asociado a la exposición de microorganismos patógenos que existe en la población a través del QMRA (Quantitative Microbiological Risk Assessment).

En el grupo de Investigación se han venido realizando estudios en diferentes tipos de agua, tales como agua de río, residual y de efluentes secundarios y terciarios de Estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), obteniendo una gran cantidad de datos cuantitativos y cualitativos de los microorganismos patógenos y el nivel de reducción de los mismos. Es por esto, que se planteó como objetivo del presente trabajo definir la probabilidad de infección por un microorganismo patógeno en concreto, enterovirus, asociada al uso de agua regenerada en un escenario específico como lo son los jardines privados.

El proceso de valoración de riesgo microbiológico incluye cuatro pasos: el primero de ellos consiste en la identificación del peligro. Puede haber cuatro clases de agentes patógenos de interés en las valoraciones microbiológicas: Bacterias, protozoos, virus y helmintos. En este estudio las valoraciones fueron realizadas únicamente con Enterovirus. El siguiente paso consiste en valorar la exposición, en donde se calcula la dosis de patógeno a la que el individuo se expone en un determinado evento. En este trabajo se definió una situación en la que una persona dispone de agua regenerada en su jardín y al regar o lavar el coche accidentalmente ingiere agua. El volumen de agua ingerido se ha definido en función de la cantidad de sorbos que ingiere el individuo. La valoración cuantitativa de riesgo microbiológico (QMRA) se realizó con el programa @Risk V5.5 (Paladise Corporation). Los valores que se generaron para el modelo son representativos de las concentraciones actuales de enterovirus en aguas de salida de los tratamientos terciarios. El tercer paso, consiste en determinar la relación dosis respuesta. Para este trabajo se analizó el riesgo con los dos modelos existentes; el modelo  $\beta$ -poisson seleccionado fue el de Soller (2004),



con constantes definidas que se aplican para el género de enterovirus en general y modelo exponencial de MENA (2003) donde no se contempló el peligro como el conjunto de enterovirus sino que se ajustó la relación a un serotipo concreto (CB4). Finalmente el último paso consistió en la caracterización del riesgo. Mediante el programa Risk se combinaron las variables mediante las llamadas simulaciones de Monte Carlo con la finalidad de obtener una distribución de la probabilidad de riesgo.

Con los datos obtenidos hemos podido hacer una valoración de riesgo asociado al uso de aguas regeneradas en un escenario en concreto en diferentes circunstancias, en donde se observaron niveles aceptables y otros no, dependiendo de la probabilidad de infección diaria (única exposición) ó acumulada (12 exposiciones anuales). Además de esto, observamos que el riesgo depende también de la concentración inicial de aguas regeneradas, si bien cumplen la norma del real decreto a nivel bacteriológico, dependiendo del tratamiento recibido, podemos encontrar mayor o menor número de virus infecciosos. Al comparar los distintos modelos (Exponencial y Beta-poisson) no se observaron diferencias relevantes en cuanto a la probabilidad de infección, ya que los valores se mantuvieron en el mismo orden de magnitud. En definitiva hemos podido establecer el riesgo asociado al uso de aguas regeneradas en jardines privados, teniendo en cuenta la concentración de enterovirus, la exposición a los mismos y la relación dosis-respuesta encontrada, a partir de esto se ha definido que en algunas situaciones el riesgo es aceptable mientras en otras no.



# **Ecología y Fisiología**



## ESTUDIO DE LOS MICROPERFILES DE OXÍGENO Y POTENCIAL REDOX EN TAPETES MICROBIANOS APLICADOS A ENSAYOS DE ACTUOTAFONOMÍA

Iniesto, M.<sup>1</sup>; Laguna, C.<sup>2</sup>, Chicote, A.<sup>2</sup>, Peñin, I.<sup>1</sup>, Guerrero, M.C.<sup>1</sup>, Florín, M.<sup>2</sup>, Delgado, A.<sup>3</sup> y López-Archilla, A.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ecología, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid. Campus Cantoblanco, 28049, Madrid

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Hidroecología, Facultad de Ingeniería, Universidad de Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real

<sup>3</sup> Departamento de Biología, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid. Campus Cantoblanco, 28049, Madrid

La extraordinaria preservación de ejemplares fósiles en yacimientos paleontológicos conocidos como Konservat-Lagerstätten, ha sido asociada a la presencia, en muchos de estos mismos yacimientos, de tapetes microbianos fósiles, hipotetizándose que es ésta comunidad microbiana bentónica la responsable del buen estado de conservación de los ejemplares. Para comprobar esta hipótesis e identificar las variables que controlan dicho proceso, se están llevando a cabo experimentos con cadáveres de peces que son depositados sobre tapetes microbianos reconstituidos, procedentes de la laguna salada de Chiprana (Zaragoza). Los primeros ensayos han demostrado que los peces colocados sobre los tapetes son recubiertos por la comunidad microbiana, lo que los protege y retarda su descomposición, frente a los peces colocados sobre sedimento y en oscuridad (Iniesto, 2009). Uno de los procesos esenciales en la buena fosilización de los cadáveres es la deposición de precipitados minerales como el CO<sub>3</sub>Ca<sub>2</sub>. Dicha deposición parece estar propiciada, en gran medida, por la actividad metabólica de la comunidad microbiana, que bioinduce la deposición de precipitados. Por otro lado la propia presencia de los cadáveres y el inicio de su descomposición, mediada por los microorganismos, podría cambiar las características ambientales alrededor de ellos. Para averiguarlo, se dispusieron tres peceras con tapetes microbianos, iluminadas en ciclos de 14 h luz/oscuridad, y una sólo con sedimento que se mantuvo siempre en oscuridad (control). En intervalos de tiempo de 4 y 400 días de permanencia del pez sobre el tapete, se realizaron perfiles de oxígeno disuelto y potencial redox (Eh), mediante microelectrodos, en tres ubicaciones por pecera: i) La zona de contacto entre los peces y los tapetes microbianos, ii) Entre éstos y el sedimento en oscuridad, y iii) En zonas de los tapetes o sedimentos situadas lejos de la influencia de los cadáveres. Se registraron diferencias significativas en los perfiles en profundidad de oxígeno y Eh entre las peceras con tapetes y las que sólo contenían sedimento. A pesar de la variabilidad entre medidas internas de cada una de las peceras con tapete (pez reciente, pez antiguo y zona alejada de los cadáveres), se registraron diferencias más significativas entre peceras. Los resultados muestran que los tapetes generan



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

condiciones ambientales muy diferentes a las encontradas en los sedimentos desnudos, si bien, al menos para los dos parámetros medidos, en las peceras con tapetes las diferencias encontradas se deben más a la heterogeneidad entre los tapetes que a las alteraciones producidas por la presencia de los cadáveres de peces.

- Iniesto, M. (2009). Implicación de los tapetes microbianos en procesos de tafonomía. Proyecto Fin de Carrera, Biología. Universidad Autónoma de Madrid

## PRECIPITACIÓN DE FOSFATOS POR BACTERIAS DE UN AGUAS RESIDUALES URBANA

Rivadeneira, A.<sup>2</sup>, Martínez-Toledo, V.<sup>2</sup>, González-López, J.<sup>1</sup> Sánchez-Ruiz Jiménez, C.<sup>1</sup>, Martín-Ramos, D.<sup>3</sup> y Rivadeneira, M.A.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Área de Microbiología. Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

<sup>3</sup>Departamento de Mineralogía. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

La precipitación de minerales por bacterias es un hecho conocido desde hace tiempo. La estruvita  $[(\text{NH}_4)\text{Mg}(\text{PO}_4)\cdot 6(\text{H}_2\text{O})]$  es un mineral frecuentemente precipitado en plantas de depuración de aguas residuales (AR), y su precipitación retira del agua iones  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , evitando problemas de eutrofización tras su vertido en lagos, ríos, etc. La estruvita puede ser usada como fertilizante ya que puede aportar iones  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  a las plantas.

Los biorreactores de membranas sumergidas, que combinan el proceso biológico de fangos activos y las tecnologías de membrana (ultrafiltración), se está mostrando como un sistema emergente que puede evitar los problemas de la tecnología convencional de fangos activos, pero estos sistemas no están exentos de problemas, siendo alguno de ellos el deterioro de las membranas, a lo que contribuyen las incrustaciones minerales, entre ellas los precipitados de estruvita.

Por todo ello, se han realizado gran cantidad de investigaciones sobre precipitación de estruvita en plantas de depuración de AR. Estas investigaciones contemplan distintos aspectos de la precipitación del mineral, pero la mayoría no contemplan su posible origen bacteriano y no se conoce prácticamente nada a cerca de las bacterias implicadas y como la microbiota de las plantas de depuración puede influenciar el proceso de precipitación.

El objetivo de esta investigación es estudiar la precipitación de estruvita por bacterias de aguas residuales urbanas. Para ello, hemos realizado el aislamiento y selección de bacterias de AR con capacidad de precipitar fosfatos en medios de cultivo específicos para tal fin. En estas cepas, investigamos la precipitación, realizamos un estudio cristalográfico y morfológico de los minerales formados y las cepas con mayor capacidad de precipitación se identificaron mediante secuenciación del ARN ribosómico 16S.

Un 75% de las cepas presentes en las AR estudiadas son capaces de precipitar estruvita y un 36% además de estruvita precipita tanto en el interior de las colonias como en sus alrededores, unos esferulitos de pequeño tamaño, que mediante difracción de rayos X, se comprueba que están compuestos mayoritariamente



de bobierrita ( $Mg_3 (PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ ) y  $Mg_3 (PO_4)_2 \cdot 2H_2O$ . En medios sólidos los porcentajes de estruvita, aunque variables según la cepa productora, son iguales o ligeramente superiores a los de esferulitos. Sin embargo en medios líquidos se produce mayoritariamente estruvita y pequeñas proporciones de esferulitos. La observación con SEM de cristales de estruvita y esferulitos no detecta huellas celulares, lo que junto a su formación dentro y fuera de la masa celular, nos hace pensar que las bacterias no actúan directamente en la nucleación mineral, aunque, de alguna forma, creen microambientes adecuados para la precipitación.

La estruvita es el mineral más frecuentemente precipitado en muchas plantas de depuración de aguas residuales. Nuestros resultados ratifican, una vez más, la asociación entre actividad bacteriana y precipitación de estruvita y nos hacen pensar que la estruvita formada en las plantas de depuración de AR es de origen bacteriano, a diferencia de lo referenciado en muchas de las publicaciones, donde se le atribuye un origen puramente inorgánico.

Destacamos también la elevada cantidad de bobierrita  $Mg_3 (PO_4)_2 \cdot 8H_2O$  y  $Mg_3 (PO_4)_2 \cdot 2H_2O$  precipitados junto a la estruvita por 36% de las bacterias del AR. La bobierrita es un mineral muy raro en la naturaleza. La capacidad de las bacterias para precipitar bobierrita, ha sido referenciada solamente en dos cepas de *Acinetobacter* y una de *Staphylococcus*. Además es importante comentar que el pequeño tamaño y contorno puntiagudo de estos fosfatos pueden causar importantes daños en las membranas de los sistemas de depuración de AR, por lo que consideramos importante profundizar en estos estudios, especialmente en las plantas donde se lleva a cabo la filtración por membrana.



## PRECIPITACIÓN DE CARBONATOS POR MICROORGANISMOS DE AGUAS RESIDUALES URBANAS

Rivadeneira, M.A.<sup>2</sup>; Rivadeneira, A.<sup>2</sup> González-López, J.<sup>1</sup> Sánchez-Ruiz Jiménez, C.<sup>1</sup>; Martín-Ramos, D.<sup>3</sup> y Martínez-Toledo, V.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Área de Microbiología. Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

<sup>3</sup>Departamento de Mineralogía. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

Desde la aparición en 1914 de la patente desarrollada por Arden y Locket los sistemas de fangos activos son empleados en la depuración de aguas residuales (AR). El sistema amplifica el proceso biológico natural de la biodegradación y la bioacumulación y la materia orgánica es mineralizada o asimilada por los diferentes grupos microbianos responsables del proceso depurador, para eliminarla posteriormente del agua mediante sedimentación.

Es un hecho conocido la capacidad de distintos grupos bacterianos para precipitar carbonatos y que parte del CO<sub>2</sub> generado en la respiración biológica puede fijarse en carbonatos insolubles. De hecho, una parte significativa de los carbonatos insolubles de la superficie terrestre tienen un origen biogénico. La actual problemática causada por el exceso atmosférico de CO<sub>2</sub>, hace que nos planteemos abordar el estudio de la posible retirada del CO<sub>2</sub> producido, como consecuencia de la degradación aeróbica de la materia orgánica de las aguas residuales, mediante su precipitación como carbonatos, evitando de esta forma nuevas emisiones a la atmósfera.

El objetivo de esta investigación es estudiar la formación de carbonatos por microorganismos aislados del agua residual analizando la viabilidad de este proceso y la influencia que esta precipitación puede tener sobre la eliminación de CO<sub>2</sub>.

Para ello, hemos estudiado la precipitación de carbonatos por bacterias de un AR en medios específicos para tal fin y medios de AR y. Se seleccionaron 37 cepas, donde investigamos la precipitación, realizamos un estudio cristalográfico y morfológico de los minerales formados.

El AR estudiada posee 23·10<sup>5</sup> (ufc/ml). La precipitación de carbonatos tuvo lugar solamente en el medio específico para ella, donde se observó que un 66% de colonias eran capaces de precipitarlos. La cantidad de precipitado obtenido es elevada en todos los casos, aunque en los actinomicetos se observan cantidades inferiores que en otros microorganismos.



Mediante difracción de rayos X se comprueba que los precipitados están compuestos principalmente por  $\text{CaCO}_3$ , precipitado como calcita y vaterita en diferentes proporciones según las cepas productoras. También se observa en todos los casos, pequeñas cantidades de fosfatos y de precipitados amorfos.

Los esferulitos de carbonato cálcico producidos por distintas bacterias y una levadura, muestran gran cantidad de huellas celulares, tanto en el interior como en su superficie, lo que confirma que están formados por acumulación de organismos calcificados. En los actinomicetos no siempre se observan huellas y es frecuente que engloben, en su parte más externa, filamentos calcificados.

Estos resultados nos llevan a concluir que:

1. El alto número de cepas capaces de precipitar y la formación de elevada cantidad de carbonatos, nos induce a pensar que este hábitat es adecuado para la precipitación de estos minerales.

2. La cantidad de calcio necesaria para una precipitación significativa de carbonato, es superior a la que está presente en el agua residual estudiada y probablemente en la mayoría de las aguas residuales.

3. Mediante la adición de concentraciones adecuadas de calcio u otros iones, podría producirse una retirada significativa del  $\text{CO}_2$  (emitido por las plantas de depuración) mediante su precipitación como carbonatos.



## ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA MATERIA ORGÁNICA EN LA PRECIPITACIÓN BACTERIANA DE CARBONATOS

Silva-Castro, G.A.<sup>2</sup>; Uad, I.<sup>2</sup>; Sánchez-Ruiz Jiménez, C.<sup>1</sup> y Rivadeneyra, M.A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071, Granada, España.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología. Instituto del Agua. Universidad de Granada. 18071, Granada, España.

Al menos una parte del CO<sub>2</sub> generado como consecuencia de la degradación de la materia orgánica por bacterias heterótrofas, es precipitado como carbonatos en distintos ambientes naturales. La producción de carbonatos por bacterias es, generalmente considerada, como un proceso de biomineralización inducida biológicamente. En este tipo de biomineralización, la precipitación está altamente influenciada por las condiciones ambientales. Entre los factores que más intervienen en la precipitación de carbonatos están las sales y la materia orgánica presentes en el medio, siendo esta última poco estudiada.

En el presente estudio se evalúa la capacidad de diferentes cepas bacterianas de formar carbonatos, teniendo como principal objetivo valorar la influencia de dos fuentes de carbono en la precipitación.

Las cepas utilizadas se ensayaron en un medio con acetato cálcico y una alta concentración de materia orgánica (medio descrito previamente para estudios de precipitación de carbonatos) con el fin de comprobar su capacidad de precipitar carbonatos. Se seleccionaron 44 cepas, 19 fueron aisladas del licor mezcla de un biorreactor de filtro sumergido, 12 de muestras de agua y sedimentos de fondo marino y 13 de cepas aisladas de distintos hábitats salinos y pertenecientes a distintas colecciones de cultivo. En todas estas cepas la precipitación comenzó a las 48 horas, y se produjo una abundante cantidad de cristales.

Con el fin de investigar la influencia de la fuente de carbono en el proceso de bioprecipitación, se estudió el crecimiento y la formación de carbonatos con cantidades bajas de dos fuentes diferentes de carbono: Extracto de levadura y triturado de espirulina, en medios adicionados de solución de sales marinas al 7.5%. Se realizó el seguimiento del crecimiento bacteriano y la formación de carbonatos macroscópica y microscópicamente durante 24 días. Posteriormente se realizó el aislamiento y purificación de los cristales formados con objeto de realizar un estudio cristalográfico y morfológico de los mismos.

Todas las cepas crecieron en el medio más pobre con el extracto de levadura (4 g/l), aunque en algunas de ellas se observó un retraso o una disminución de crecimiento. La precipitación de carbonatos se detectó en 31 de las 44 cepas estudiadas, si bien, en algunos casos, la formación de cristales fue escasa. Solo el 70% de las cepas tenían una precipitación abundante, aunque generalmente



inferior a la precipitación observada en el medio rico. Todas las cepas requerían mayor tiempo para el inicio de la precipitación que en el medio rico.

Sin embargo, utilizando 5g/l de triturado de espirulina como fuente de carbono se observó buen crecimiento únicamente en el grupo de cepas aisladas de fondo marino (12 cepas) y en ningún caso se observó formación de carbonatos.

De estos resultados, podemos deducir que la materia orgánica ejerce un papel importante en el proceso de precipitación, siendo significativos tanto el tipo de materia orgánica como la cantidad de la misma. Así mismo se comprueba que el extracto de levadura es una buena fuente de carbono para la precipitación de carbonatos, ya que se obtiene precipitación aún con bajas cantidades de la misma. El triturado de espirulina no es una buena fuente de materia orgánica para dicha precipitación.

## ESTUDIO DE PRECIPITACIÓN DE CARBONATOS EN BACTERIAS AISLADAS DEL FONDO MARINO: INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CALCIO

Uad, I.<sup>2</sup>; Silva-Castro, G.A.<sup>2</sup>; Calvo, C.<sup>1,2</sup>; Sánchez-Ruiz Jiménez; C.<sup>1</sup> y Rivadeneyra, M.A.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071, Granada, España.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología. Instituto del Agua. Universidad de Granada. 18071, Granada, España.

La biomineralización, proceso mediante el cual los organismos vivos son capaces de producir sólidos inorgánicos, se encuentra ampliamente extendida en la naturaleza. Se ha demostrado la capacidad de las bacterias para formar distintos minerales y su implicación en la precipitación de los mismos en sus ambientes naturales. Entre los minerales de origen biogénico los carbonatos, muy abundantes en la superficie terrestre, son los más estudiados.

Las bacterias halófilas son un grupo de bacterias útiles en algunas aplicaciones biotecnológicas. Una de las propiedades, de muchas de estas bacterias, es la capacidad de inducir bioprecipitación de carbonatos ( $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}^+$ ). Las bacterias halófilas, especialmente las halófilas moderadas, presentan características muy interesantes para realizar distintos estudios de biomineralización.

En este trabajo se estudia la precipitación de carbonatos por bacterias aisladas de aguas y sedimentos de las profundidades marinas y se seleccionan las bacterias que presentan mayor capacidad de precipitación, con objeto de investigar la posible aplicación de estas bacterias en procesos industriales y/o ecológicos que utilicen el proceso de precipitación de carbonatos.

En primer lugar se investigó la capacidad de estas bacterias para precipitar carbonatos, en un medio rico (M5) con una salinidad del 7.5%. Este medio había sido descrito anteriormente para estudios de precipitación de carbonatos por bacterias halófila. Tras el análisis de los resultados se seleccionaron 12 cepas, todas ellas, capaces de precipitar carbonatos tras 24 horas de incubación. Estas cepas se identificaron genéticamente mediante la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S. Los resultados muestran que 8 de ellas (cepas W1, W5, W7, W15, W16, F20, S30, S31) pertenecen al género *Bacillus*, la cepa (W12) se identificó como *Halomonas*, otra cepa (F2) como *Brevibacterium* y las cepas S21 y S23 como *Pseudomonas*.

En este estudio también se ensayó la capacidad de las bacterias para precipitar carbonatos en medios más pobres así como la influencia de la fuente de calcio en el proceso de bioprecipitación, para lo que se ensayaron medios adicionados de acetato y de cloruro de calcio.



En el medio pobre adicionado de acetato de calcio (medio M1) se obtuvo precipitación de carbonatos solamente en un 75% de las cepas ensayadas a pesar de todas ellas crecían adecuadamente en este medio. También se observó un retraso en el inicio de la precipitación ya que los cristales no se detectaron hasta los 7 días de incubación.

En el medio pobre adicionado de cloruro cálcico (medio M3), ninguna de las 12 cepas ensayadas mostró precipitación, antes de los 14 días de incubación (tiempo en el que se daba por finalizada la experiencia) aunque todas ellas presentaban buen crecimiento.

De los resultados obtenidos, en este estudio, se concluye que las bacterias de las profundidades marinas objeto de este estudio presentan una alta capacidad de precipitación de carbonatos en medios adecuados para ello. Así mismo se comprueba que el acetato de calcio es una fuente de calcio más adecuada para la precipitación de carbonatos que el cloruro de calcio.

## BACTERIAS DESNITRIFICANTES AUTOTRÓFICAS EN PILAS MICROBIANAS “PRODUCTORAS DE ELECTRICIDAD”

Vilar-Sanz, A.<sup>1\*</sup>, Puig, S.<sup>2</sup>, Balaguer, M.D.<sup>2</sup>, Colprim, J.<sup>2</sup>, Bañeras, L.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Grup d'Ecologia Microbiana Molecular (Institut d'Ecologia Aquàtica) Universitat de Girona. Facultat de Ciències. Campus de Montilivi s/n, 17071 Girona.

<sup>2</sup>Laboratory of Chemical and Environmental Engineering (LEQUIA-UdG), Institute of the Environment, University of Girona, Campus Montilivi s/n, Facultat de Ciències, E-17071 Girona, Spain

Las pilas de combustible microbianas o *Microbial Fuel Cells* (MFC) son dispositivos que utilizan los electrones liberados por microorganismos exoelectrogénicos durante la oxidación de la materia orgánica para generar electricidad. Las pilas se componen de dos electrodos, el ánodo (que actúa como aceptor de electrones) y el cátodo, desde dónde los electrones se transfieren al oxígeno o determinadas bacterias. Ambos compartimentos, ánodo y cátodo, se encuentran separados por una membrana de intercambio de cationes. En las pilas de combustible microbianas se genera una diferencia de potencial entre los electrodos en el cual los microorganismos juegan un papel fundamental. Uno de los aspectos más prometedores de las MFC es el de conseguir la depuración de aguas residuales y generar electricidad simultáneamente. Combinar éstas reacciones electrogénicas con biocátodos es un campo prometedor ya que permitiría la eliminación simultánea de materia orgánica y nitrógeno del agua residual. En este sentido la obtención de bacterias desnitrificantes autotróficas permitiría la eliminación de nitrato en el cátodo independientemente de la disponibilidad de carbono orgánico. Así, el objetivo de nuestra investigación es obtener cultivos puros de desnitrificantes quimiolitautotróficos potencialmente útiles como futuros inóculos en MFC desnitrificativas.

Los inóculos elegidos provienen de dos pilas biológicas. La primera trataba agua residual urbana ( $0,8 \text{ L}\cdot\text{día}^{-1}$ ) y la segunda trataba acetato en el ánodo y nitrato en el cátodo ( $736 \text{ ml}\cdot\text{día}^{-1}$  y  $784 \text{ ml}\cdot\text{día}^{-1}$ , respectivamente). Las dos pilas producían electricidad ( $380\text{mV}$  y  $233 \text{ mV}$  respectivamente).

El análisis de las comunidades de desnitrificantes presentes en dichas MFC se ha basado en el análisis por PCR-DGGE del gen funcional *nosZ* (óxido nítrico reductasa). Muestra de las bio-películas presentes en el ánodo de la pila que trata aguas residuales urbanas y el cátodo de una pila desnitrificativa se han usado como inóculos para iniciar unos enriquecimientos de bacterias desnitrificantes autotróficas usando tres donadores de electrones: la tioacetamida ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NS}$ ), el tiosulfato ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) y el hidrógeno ( $\text{H}_2$ ).

En base a los perfiles de la DGGE, las comunidades desnitrificantes presentes en los biofilms de los cátodos y el ánodo tienen diferentes composiciones. Las comunidades más complejas se encuentran en los ánodos y están compuestas por



cuatro o cinco miembros; en cambio, la comunidad del cátodo está compuesta por una comunidad dominante que tiene un 84% de similitud, en base a la comparación del gen *nosZ*, con la bacteria quimiolitotrófica *Oligotropha carboxidovorans* OM5.

Se han obtenido enriquecimientos de desnitrificantes quimiolitotróficos procedentes de ambos inóculos, y no se han apreciado diferencias en función del dador de electrones utilizado. Así mismo, la mayoría de enriquecimientos contienen secuencias del gen *nosZ* con poca homología (<92%) con secuencias de bacterias desnitrificantes previamente aisladas y disponibles en las colecciones de cultivos puros. Cabe destacar que se han detectado enriquecimientos con una elevada similitud a la comunidad dominante en el cátodo de la MFC desnitrificativa.

El presente estudio muestra la importancia de las bacterias desnitrificantes autotróficas en el funcionamiento de las pilas de combustible desnitrificativas y constituye el primer paso para obtener cultivos puros que sirvan como inóculo a futuras instalaciones de este tipo.

## COMPOSICIÓN ESPECÍFICA DEL BACTERIOPLANCTON COMO FACTOR REGULADOR DE LA RESPIRACIÓN DE LA COMUNIDAD: APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

Abad, N.<sup>1\*</sup>, Baña, Z.<sup>1</sup>, Uranga, A.<sup>1</sup>, Ayo, B.<sup>1</sup>, Iriberry, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco. UPV-EHU. Apdo 644, 48080 Bilbao. [juan.iritberri@ehu.es](mailto:juan.iritberri@ehu.es)

En un contexto biogeoquímico, mientras que son numerosos los estudios que cuantifican producción bacteriana, se pueden considerar escasos los que determinan respiración bacteriana. La respiración de la comunidad bacteriana se ha venido cuantificando tradicionalmente mediante métodos (por ejemplo, el método Winkler) que requieren incubaciones largas (24-48 horas) para detectar descensos significativos en la concentración de oxígeno de la muestra. En este sentido, el uso de métodos alternativos, tales como el ETS "in vivo" o la microamperometría y microsondas, pueden suponer un avance. En este último caso, el descenso en oxígeno se registra de forma continua y se obtienen resultados en cortos tiempos de incubación. Esto último es particularmente relevante dado que largas incubaciones pueden dar lugar a descensos no lineales de la concentración de oxígeno. En trabajos previos con aguas costeras hemos observado aumentos significativos en la producción, biomasa y respiración bacterianas a partir de las 6 horas de incubación, los cuales podrían estar relacionados con cambios en la composición específica de la comunidad bacteriana inicial. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó analizar si existen cambios cuantitativos y de estructura taxonómica de la comunidad durante los largos tiempos de incubación que pueden ser necesarios para realizar determinaciones de velocidad de respiración.

Las muestras de agua de mar superficial fueron recogidas en la estación marina costera Armintza, en el Cantábrico oriental, y se determinó de modo continuo mediante microamperometría y microsondas la concentración de oxígeno de las muestras mantenidas durante 45 h. El experimento se llevó a cabo en dos situaciones medioambientales diferentes, con temperaturas del agua de 12°C y 20°C y con comunidades bacterianas diferentes. Se determinó la composición específica de la comunidad mediante CARD-FISH, en diferentes momentos de la incubación (0h, 12h, 30h y 45h). Se analizó la presencia y proporción de procariontes pertenecientes al dominio Eubacteria, las subclases Alpha-Proteobacteria (incluyendo los grupos SAR11 y Roseobacter), Beta-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria y la clase Flavobacteria, perteneciente al filum Bacteroidetes.

La comunidad bacterioplanctónica inicial estuvo dominada por los grupos Bacteroidetes y Alpha-Proteobacteria, siendo menor la presencia de Beta-Proteobacteria y Gamma-Proteobacteria. Posiblemente debido a su naturaleza oportunista, la abundancia de la subclase Gamma-Proteobacteria aumentó en



VIII MMA

VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

las primeras 12 horas de incubación, pasando a ser el grupo dominante de la comunidad al final de la incubación. A lo largo del periodo de incubación las proporciones relativas del resto de los grupos procariotas descendieron, así como la proporción de Eubacterias con respecto a la situación inicial. Estos resultados ponen de manifiesto que se produce un cambio significativo en la composición específica de la comunidad bacterioplanctónica en cortos periodos de tiempo, el cual se acentúa con el transcurso de la incubación. Así mismo deducimos que las determinaciones de velocidad de respiración del bacterioplancton obtenidas utilizando periodos de incubación superiores a las 6 h, pueden estar sujetas a desviaciones significativas debidas a la modificación de la composición específica de la comunidad bacteriana.



## EFICIENCIA DE CRECIMIENTO DEL BACTERIOPLANCTON MARINO COSTERO Y ADAPTACIÓN DE LA COMUNIDAD A LO LARGO DEL CICLO ESTACIONAL

Uranga, A.<sup>1\*</sup>, Baña, Z.<sup>1</sup>, Abad, N.<sup>1</sup>, Ayo, B.<sup>1</sup>, Iriberry, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco. UPV-EHU. Apdo 644, 48080 Bilbao. [juan.iriberri@ehu.es](mailto:juan.iriberri@ehu.es)

En ecología microbiana acuática, la cuantificación y caracterización de las comunidades microbianas presentes en una masa de agua es especialmente importante, ya que la mayoría de los procesos biogeoquímicos del ecosistema son protagonizados por microorganismos. Actualmente no existe suficiente información sobre cómo se encuentran relacionadas la composición taxonómica del bacterioplancton y su eficiencia de crecimiento en sistemas acuáticos naturales, ni tampoco sobre qué hace cada tipo particular de microorganismo y cómo interactúa con el medio optimizando su función ecológica. El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular está permitiendo obtener más información en este campo, de forma que podemos comenzar a relacionar la variación espacio-temporal de la composición taxonómica de la comunidad con su expresión fisiológica en el medio, e incluso llegar a comprender en cierta medida la variabilidad de la eficiencia de crecimiento de la comunidad microbiana. El uso de técnicas moleculares nos permite conocer la composición taxonómica y diversidad de la comunidad. Así, gracias a la técnica CARD-FISH podemos obtener información cuantitativa sobre la composición de grupos filogenéticos del bacterioplancton, lo cual resulta de utilidad a la hora de establecer nexos de unión entre composición y función en el ecosistema. Los objetivos planteados en el presente trabajo son, en primer lugar, conocer cuál es la composición de principales grupos filogenéticos de la comunidad bacteriana en aguas costeras del Cantábrico oriental así como su sucesión estacional a lo largo de un ciclo anual. En segundo lugar, relacionar la composición específica de la comunidad con su eficiencia de crecimiento en las condiciones medioambientales cambiantes que se suceden a lo largo del tiempo.

El estudio se ha llevado a cabo en la estación de muestreo que el grupo tiene localizada en Armintza (Bizkaia). Los grupos analizados fueron Eubacteria, las subclases Alpha-Proteobacteria, incluyendo SAR11 y agrupaciones Roseobacter, Beta-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria y la clase Flavobacterias del filum Bacteroidetes. La eficiencia de crecimiento se ha determinado a partir de los valores de producción y respiración bacterianas, calculadas a partir de la incorporación de trazadores y del descenso en presión parcial de oxígeno en incubaciones de corta duración.

En aguas costeras del Cantábrico oriental se pueden distinguir dos situaciones estacionales muy marcadas: de alta productividad (periodo desde mayo a agosto)



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

y de baja productividad (periodo de octubre a febrero). En los meses de baja productividad (periodo con temperaturas más bajas) es claro el predominio del grupo SAR11 pues están mejor adaptadas a medios oligotróficos, y en los periodos de alta productividad, los grupos predominantes son Roseobacter, Gama-Proteobacterias y Bacteroidetes, más abundantes en situación de alta concentración de nutrientes. Los meses de Abril y Septiembre son meses de transición en los que se observa el cambio y adaptación de las comunidades a las nuevas condiciones. Mientras que en las dos situaciones contrastadas, de alta y baja productividad, la eficiencia de la comunidad se mantiene elevada, en las épocas de transición y cambio la eficiencia es bastante menor. Se deduce que la eficiencia de crecimiento de la comunidad puede ser un reflejo útil del grado de adaptación de los miembros relevantes de la comunidad a la situación medioambiental que se vive en el ecosistema marino costero.



## ESTUDIO PRELIMINAR DE LA SUPERVIVENCIA DE *Edwardsiella tarda* EN AGUA NATURAL DE L'ALBUFERA

Alcaide, E.\*, Esteve, C.

Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad de Valencia. Doctor Moliner 50, E-46100, Burjassot (Valencia).

*Edwardsiella tarda* es una enterobacteria que presenta baja incidencia en muestras naturales. Así, en los últimos 40 años, su aislamiento a partir de reptiles, anfibios, aves, peces y mamíferos ha sido reportado en unos 10 artículos aproximadamente. Su aislamiento de aguas naturales es, si cabe, incluso más raro pues tan sólo se ha encontrado en lagos y torrentes de Florida (1973; USA) y en el lago de L'Albufera (2008; España), con un porcentaje de muestras positivas para *E. tarda* inferior al 15%. Esta baja tasa de recuperación de la bacteria bien podría deberse a la incapacidad del microorganismo para sobrevivir en agua. Este aspecto ha sido ya investigado por dos estudios que ofrecen resultados contradictorios; según Sakai y cols (1994) la bacteria deja de estar cultivable a los 7 (agua de mar a 25°C) o 15 días (agua dulce a 25°C) posteriores a la inoculación del microcosmos, mientras que Du y cols. (2007) fijan este momento a los 28 días (agua de mar a 4°C). En cualquier caso, ningún estudio previo ha valorado la influencia que la temperatura de incubación o la cantidad de nutrientes en el agua podían ejercer sobre la supervivencia de *E. tarda*. Además las cepas utilizadas en dichos estudios procedían exclusivamente de peces enfermos. Con el objetivo de investigar dichos aspectos, se ha evaluado la culturabilidad de *E. tarda* en microcosmos con agua procedente del L'Albufera, previamente filtrada (0.22- $\mu$ m) y esterilizada, sometidos a condiciones de falta de nutrientes.

El valor de  $DBO_5$  del agua de L'Albufera filtrada (se inoculó con *A. hydrophila* EO63) fue de 25,89 ppmO<sub>2</sub>, y a partir de ésta se prepararon dos tipos de microcosmos en cuanto a la cantidad de materia orgánica; A: ( $DBO_5$ = 25,89 ppmO<sub>2</sub>) y B: ( $DBO_5$ = 12,94). Para estudiar el efecto de la temperatura los microcosmos se incubaron a valores similares a los observados en las épocas fría y cálida, y así preparamos dos tipos de microcosmos; C: ( $T^a$ = 15°C) y D: (25°C). Los microcosmos se inocularon con 10<sup>9</sup>-10<sup>8</sup> ufc/ml del microorganismo. A este respecto, hemos empleado cepas de *E. tarda* aisladas de diferentes orígenes; E: (cepa de agua= ABF43), F: (cepa de anguila enferma= S23-12), y G: (cepa de anguila sana portadora= E55). Se prepararon tres réplicas para cada tipo de microcosmos (ejemplo: A+C+E). A lo largo del tiempo se determinó en cada una de las réplicas el número de células cultivables en TSA y SSA mediante recuento en placa. Una semana después de que el número de células cultivables fuera inferior a 0,1 ufc/ml, se procedió a realizar diluciones decimales seriadas del microcosmos (10<sup>0</sup>-10<sup>-8</sup>), y a partir de éstas se inocularon con 1 ml tubos de caldo LB. Estos cultivos se mantuvieron a 28°C y 200rpm, durante tres días, de forma que los tubos con crecimiento positivo se sembraron en placas de



SSA. Sólo se consideró “resucitada” la cepa recuperada en SSA a partir de las mayores diluciones del microcosmos.

Todas las cepas ensayadas se han mantenido cultivables en los microcosmos de agua natural de L’Albufera por un periodo mínimo de 60 días, no obstante, y para incubaciones más prolongadas sí hemos observado diferencias estadísticamente significativas entre los distintos microcosmos. Así, todas las cepas se han mantenido cultivables por un tiempo más prolongado en los microcosmos incubados a 25°C (cepa ABF43: >140 días; cepa S23-12: 126; cepa E55: 130 días) que en aquellos incubados a 15°C (cepas ABF43 y S23-10: 120 días; cepa E55: 60 días). En general, todos los microcosmos que presentaban menor materia orgánica se mantuvieron cultivables por más tiempo, aunque las diferencias observadas no fueron significativas en todas las cepas. Finalmente destacar que los microcosmos inoculados con la cepa aislada de agua (*E. tarda* ABF43) son los que por más tiempo se han mantenido cultivables, mientras que en caso opuesto estuvieron los inoculados con la cepa aislada de pez portador (*E. tarda* E55). Los experimentos de resucitación mostraron una pauta similar pues la cepa ABF43 pudo ser resucitada a partir del 80% de sus microcosmos, la cepa S23-12 a partir del 45%, y la cepa E55 sólo en un 9% de sus microcosmos.

Nuestros resultados indican que 1) *E. tarda* se mantiene cultivable en agua natural de L’Albufera a 25°C y a 15°C, aunque a mayor temperatura la culturabilidad se prolonga por más tiempo; 2) Podría haber diferencias significativas entre cepas de *E. tarda* en relación a su capacidad de supervivencia en agua.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CGL2007-60565

## DISTRIBUCIÓN TEMPORAL Y RESERVORIOS DE *Edward-siella tarda* EN EL LAGO DE L'ALBUFERA

Esteve, C.\*, Alcaide, Elena

Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia. Doctor Moliner 50, E-46100, Burjassot (Valencia).

La edwardsiellosis es una enfermedad infecciosa de los peces causada por *Edwardsiella tarda*, que durante el periodo 2003-05 fue observada con una prevalencia del 8,2% en la población de anguila silvestre del lago de L'Albufera de Valencia. Tradicionalmente, esta patología había sido considerada como propia de áreas tropicales y subtropicales donde con relativa frecuencia se asociaba a peces cultivados. *Edwardsiella tarda* es además un patógeno humano capaz de causar serias infecciones gastrointestinales, de forma similar a *Salmonella* sp. En la actualidad se desconoce si la contaminación fecal de las aguas está relacionada con la presencia del microorganismo en el ambiente acuático, o si el agua y la fauna acuática actúan como sus reservorios naturales. Con el objetivo de investigar dichos aspectos, durante el año 2008 se analizaron 27 muestras de agua recogidas en tres puntos de muestreo situados en el interior del lago de L'Albufera, y también un total de 131 ejemplares de anguila silvestre capturados por pesca tradicional en este lago.

En todas las muestras (agua y peces) se determinó la presencia de *E. tarda* por métodos culturales mediante el uso de medios selectivos/diferenciales (Agar Salmonella-Shigella; SSA) y/o generales (Agar TSA). Además en las muestras de agua se cuantificaron indicadores de contaminación fecal (Coliformes fecales y *Streptococcus* fecales); niveles de *E. tarda* por Número Más Probable en caldo SS2X; y además los valores de parámetros fisicoquímicos (pH, conductividad, DBO<sub>5</sub>, temperatura, salinidad, O<sub>2</sub> disuelto, y turbidez).

*Edwardsiella tarda* pudo ser recuperada de agua del lago de L'Albufera en el 7,41% de las muestras analizadas, y así el NPM de *E. tarda* en éstas fue de 2,0x10<sup>0</sup> células viables/100 ml de agua. La recuperación de *E. tarda* a partir de agua de lago tuvo un componente estacional dado que sucedió a finales del verano (Septiembre/Octubre), cuando la temperatura del agua estaba aún cercana a los 20°C y además los niveles de materia orgánica era altos (DBO<sub>5</sub> ≥ 21 mg O<sub>2</sub>). De hecho, los parámetros fisico-químicos cuantificados mostraron una variación estadísticamente significativa según la época del año fuera fría (Diciembre-Abril; T<sup>a</sup> < 20°C) o cálida (Mayo-Octubre; T<sup>a</sup> ≥ 20°C); lo cual coincide con los dos periodos de máxima fluctuación en el nivel de agua del lago debido al régimen de lluvias y los procedimientos tradicionales de cultivo del arroz. Sin embargo, las variaciones en los valores de indicadores de contaminación fecal no se relacionaron con la época del año.

El porcentaje de peces positivos para *E. tarda* fue también significativamente mayor durante la época cálida (40-84%), pues la bacteria se aisló escasamente



de los peces durante la época fría (<7,4%). En estas muestras el uso de un medio general (agar TSA) y otro selectivo (agar SSA) permitió diferenciar los peces que estaban sufriendo edwardsiellosis (12,21%; n=16) de aquellos otros que eran portadores de *E. tarda* (32%; n=42). En los primeros la bacteria se recuperó como cultivo puro en ambos medios (TSA y SSA), mientras que en los segundos *E. tarda* sólo se recuperó a partir del cultivo de enriquecimiento selectivo (caldo SS2X+placa de SSA).

Entre los peces portadores de *E. tarda* algunos presentaban patologías causadas por *Aeromonas sp.* y/o *Vibrio vulnificus* (n=19), pero otros eran portadores sanos (n=23). En estos últimos *E. tarda* pudo ser recuperada, a nivel interno, del intestino (43,5%), el hígado (26%), o a partir de ambos (30,4%).

Nuestros resultados indican que 1) la presencia de *E. tarda* en agua del lago de L'Albufera no está relacionada con el nivel de contaminación fecal; 2) la recuperación de *E. tarda* a partir de agua depende de factores tales como la temperatura y la materia orgánica del agua; y 3) la anguila silvestre parece actuar como reservorio natural de *E. tarda* en este ambiente acuático.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CGL2007-60565

## INTERCEPTACIÓN DE SEÑALES DE QUORUM SENSING TIPO N-ACILHOMOSERÍN LACTONAS EN AISLADOS DE AGUA DE MAR

Romero, M.\*, Casero Bustos, V., Otero, A.

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

### Introducción/objetivos

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, incluidos factores de virulencia. Este mecanismo es conocido como "Quorum Sensing" (QS). La principal familia de autoinductores descrita es la de las N-Acilhomoserín lactonas (AHLs) basadas en un anillo lactona al que se une por un enlace amida 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 procariotas como eucariotas, se han 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. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado una alta frecuencia de actividad QQ sobre AHLs en aislados de sedimentos y biopelículas marinas. Con el objetivo de estudiar la frecuencia de esta actividad entre cepas aisladas de agua de mar y obtener aislados con posibles aplicaciones biotecnológicas, se procedió al aislamiento y estudio de la presencia de actividad QQ, en bacterias procedentes de: agua de mar de estuario y de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad

### Métodos

Para la detección de bacterias marinas con actividad QQ sobre AHLs se procedió al aislamiento de cepas, a 15 y 22°C, con medios sólidos con alta concentración de nutrientes como: TSA con 1% NaCl (TSA-I) y agar marino (AM) y también medios con baja concentración de nutrientes como: agar marino en dilución 1/100 (AM 1/100), agua de mar filtrada y autoclavada (FAS), suplementada con 1 g/L de casaminoácidos (FAS CAS) y medio FAS suplementado con 0.5 g/L de los polímeros agarosa, quitina y almidón (FAS POL). Para la detección de actividad QQ, se expusieron cultivos de cada aislado a AHLs de diferente tamaño; una N-Hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL) y N-Decanoil-L-homoserín lactona (C10-HSL) y se comprobó la actividad de las moléculas señal mediante los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026 y VIR07. Se comprobó por



HPLC-MS si las cepas activas contra AHLs presentaban actividad enzimática degradadora de señales.

### **Resultados y conclusiones**

Los resultados de aislamiento de bacterias marinas de este trabajo indicaron que el QQ podría ser una actividad de elevada prevalencia en el medio marino entre las bacterias cultivables, como demuestra la elevada frecuencia de aislados con capacidad de degradación enzimática de señales de quorum sensing (QS) tipo AHL. De un total de 464 bacterias aisladas, 85 presentaban actividad enzimática al menos sobre una de las AHLs probadas, lo que representa un 18,3% del total de los aislados analizados, porcentaje casi un orden de magnitud más elevado que el descrito para aislados de suelo. Sólo ha sido posible identificar un aislado capaz de antagonizar la actividad AHL sin degradarla, aunque esta actividad debe ser todavía caracterizada. El medio de cultivo y la temperatura de aislamiento no afectaron al número de bacterias aisladas con actividad QQ, mientras que el origen de la muestra afecta fuertemente a la actividad, siendo mayor en muestras de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad (27,7 y 21,7% respectivamente). Se han identificado 4 aislados capaces de degradar un amplio espectro de AHLs pertenecientes a géneros estrictamente marinos. Estos aislados con actividad QQ de amplio espectro pertenecieron a  $\gamma$ -Proteobacteria (2) y Bacteroidetes (2), incluyendo una nueva especie próxima a *Maribacter*. Existe una fuerte discrepancia entre el número de aislados con actividad QQ en aguas marinas y la frecuencia de las secuencias homólogas a enzimas de QQ conocidos en metagenomas del medio marino. Esta discrepancia puede ser atribuida a la baja homología existente entre secuencias de enzimas de QQ o a la existencia de actividades enzimáticas todavía no descritas.





## CAMBIOS ESTACIONALES EN EL BACTERIOPLANCTON DE LA “RÍA DE VIGO”, NO-ESPAÑA

Novoa<sup>1</sup>, Beatriz, Alonso-Gutiérrez Jorge,<sup>1</sup> Lekunberri Itziar,<sup>2</sup> Teira Eva,<sup>3</sup> Gasol Josep M.,<sup>2</sup> Figueras Antonio<sup>1</sup>

Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain,<sup>1</sup> Institut de Ciències del Mar, CSIC, Pg. Marítim de la Barceloneta 37-49, E-08003 Barcelona, Spain<sup>2</sup> and Departamento de Ecoloxía e Bioloxía Animal, Universidade de Vigo, Vigo, Spain<sup>3</sup>.

### Introducción.

En este trabajo estudiamos las variaciones estacionales de las comunidades bacterianas de la Ría de Vigo

### Material y métodos.

Se realizaron muestreos estacionales en la Ría de Vigo. Se prepararon librerías de clones y se empleó la técnica de CARD FISH.

### Resultados y Conclusiones.

El estudio de las librerías de clones y CARD-FISH llevadas a cabo con material recogido en un episodio de upwelling en la Ría de Vigo mostraron que *Roseobacter*, seguidas por *Bacteroidetes*, y algunos grupos de gammaproteobacteria tales como SAR86, dominaban la composición del bacterioplancton en la Ría de Vigo, NO España, al contrario que SAR11 (casi totalmente ausente en este ecosistema durante el upwelling). Dado que muestreamos cuatro veces durante el año, detectamos cambios pronunciados en la estructura de cada componente del bacterioplancton, especialmente para *Roseobacter*. Sugerimos que estas variaciones en el ecosistema costero de la Ría de Vigo durante el upwelling están asociados con las comunidades de fitoplancton características de las cuatro situaciones hidrográficas que se suceden durante el año: mezcla invernal, crecimiento primaveral, estratificación en verano y upwelling en otoño. Hemos descrito nuevas secuencias en los grupos mayoritarios de bacterias marinas, particularmente en el caso de *Roseobacter*, SAR11, y especialmente SAR86. La comunidad estaba dominada por dos clados de *Roseobacter* que previamente se habían relacionado con “blooms” de fitoplancton. La primavera fue la estación con menor diversidad bacteriana.



# **Patología de especies acuícolas**



## VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA DE CEPAS DE *Yersinia ruckeri* CAUSANTES DE RECIENTES EPIZOOTIAS DE ERM EN CULTIVOS DE SALMÓNIDOS.

Bastardo, A\*.<sup>1, 2</sup>, Ravelo, C.<sup>2</sup>, Toranzo A.<sup>1</sup>, Romalde J. L.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Estación de Investigaciones Hidrobiológicas de Guayana, Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Venezuela.

*Yersinia ruckeri* es el agente etiológico de la enfermedad de la boca roja (ERM del inglés "Enteric Red Mouth disease") o yersinosis, que afecta principalmente a peces salmónidos causando importantes pérdidas económicas. Las mortalidades por la ERM son causadas principalmente por cepas de *Y. ruckeri* pertenecientes al serotipo O1a (siguiendo el esquema de serotipado de Romalde y col., 1993) y al biotipo 1 (móviles y lipasa positivo). Aunque la vacunación con bacterinas elaboradas a partir de estas cepas ofrecen diferentes grados de protección cruzada con los distintos serotipos de *Y. ruckeri*, se han descrito recientemente brotes de ERM en cultivos de salmónidos, causados por cepas, entre las cuales la vacunación no ha tenido una alta eficacia. La mayoría de estas cepas emergentes, carecen de motilidad y mientras en España y USA han sido clasificadas dentro del biotipo 2, siendo además lipasa negativas, en Inglaterra se les designó como un nuevo biogrupo que representa un grupo clonal diferente. Otros de estos casos descritos en España han sido causados por cepas móviles del serotipo O2b.

En este trabajo se analizan las características bioquímicas, serológicas y moleculares de 60 cepas de *Y. ruckeri*, aisladas de diferentes brotes ocurridos entre 2003-2009 en salmónidos cultivados en Europa y Suramérica. Otras 11 cepas aisladas en USA (donadas por Dr. Arias) se incluyeron con fines comparativos. Los aislados fueron identificados fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas convencionales y utilizando el sistema miniaturizado API 20E. Las cepas evaluadas presentaron variabilidad en las pruebas para motilidad, actividad lipasa, hidrólisis de gelatina, Voges-Proskauer, fermentación de sorbitol y utilización de citrato. También se determinaron diferentes perfiles mediante el sistema API 20E (5104100; 5105100; 5107100; 5307100 y 5107500). El 62,8% de estas cepas pertenecieron al biotipo 1, resultando el 37,2 % de los aislados restantes correspondientes al biotipo 2 y aisladas principalmente en Norteamérica y Europa.

El tipado serológico realizado mediante el test de aglutinación en portaobjetos y ensayos dot blot, evidenció la presencia de los serotipos O1a (54 aislados), O1b (19 aislados) y O2b (1 aislado) entre todas las cepas estudiadas, considerándose de especial interés la emergencia del serotipo O1b en peces vacunados en Norte y Suramérica.

En relación a la evaluación molecular, la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, confirmó la identificación bioquímica y serológica de la especie. Por otra



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

VIII MMA

parte, el genotipado de los aislados realizado mediante las técnicas de ERIC y REP-PCR, indicaron una alta diversidad intraespecífica, evidenciada por la formación de diferentes grupos genéticos relacionados principalmente con los serotipos identificados. Son necesarios futuros estudios que permitan dilucidar las posibles causas de diseminación de estas cepas entre países salmonicultores, así como también las interrelaciones filogenéticas entre estos aislados, en búsqueda de información útil al desarrollo de estrategias más eficaces de control y prevención.

#### Referencia bibliográfica:

Romalde J. L., Margariños B., Barja J. L. and Toranzo A. E. (1993) Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*. Proposal for a new intraspecies classification. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 411-419.

## COLONIZACIÓN DE RODABALLO POR CEPAS VIRULENTAS Y AVIRULENTAS DE *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* DURANTE LA INFECCIÓN

Bobo, M. <sup>1\*</sup>, Rivera, L.<sup>1</sup>, Lago, E.P.<sup>1</sup>, Milton, D.L.<sup>2</sup>, Nieto, T.P.<sup>1</sup>, Farto, R. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Vigo, España

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Umeå Centre for Microbial Research, Umeå University, Umeå, SE 901 87, Sweden.

El riesgo de brotes de enfermedades en los cultivos de rodaballo (*Psetta maxima* L.) causada por cepas de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (ASS) hace necesario el conocimiento de las rutas de infección, ya que se podrían diseñar estrategias terapéuticas útiles para proteger ese sector de la acuicultura.

Se utilizaron dos cepas avirulentas (ACRp 43.1 y RM 274.1) y una cepa virulenta (RIM 33.1) de ASS aisladas de rodaballos cultivados en España, entre 2002 y 2004. Se confirmó su identificación usando un ensayo de PCR específico y se transformaron para que expresasen la proteína verde fluorescente (Gfp) de *Aequorea victoria* para facilitar el seguimiento de la enfermedad en rodaballo. Para ello se construyó el plásmido que incluía el gen *gfp* y un fragmento de una región intergénica del cromosoma de ASS. El plásmido, portado por una cepa de *Escherichia coli*, fue transferido a las cepas de ASS mediante conjugación e integrado en su cromosoma por recombinación homóloga. Los transconjugantes (ASS-*gfp*) fueron seleccionados en base a su resistencia a altas concentraciones de kanamicina y a la emisión de fluorescencia bajo la iluminación con luz UV.

Para demostrar que la expresión de Gfp no alteraba la virulencia de las cepas, se comparó la virulencia de cada cepa ASS-*gfp* con la de la cepa parental, sin marcar, mediante detección de la presencia de la proteína A-layer fenotípicamente, empleando rojo congo y del gen que la codifica (*vapA*) y por infección de rodaballo (11 g, sin vacunar) por inmersión con dosis de 10<sup>6</sup> ufc/mL.

Tras estos estudios previos, se realizó una infección por inmersión en rodaballo con las cepas marcadas con Gfp y se estudiaron distintas zonas del pez (mucus, branquias, intestino, hígado, riñón y músculo), en diferentes tiempos tras la infección (12 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 9 días y 21 días). La dosis empleada fue de 10<sup>6</sup> ufc/mL. Los resultados mostraron que, la entrada, supervivencia y proliferación fue claramente diferente entre las cepas virulentas y avirulentas. La cepa virulenta, que fue detectada 12 h después de la infección, fue capaz de colonizar y/o proliferar en el mucus, branquias, intestino, hígado, riñón y músculo causando la muerte del pez al séptimo día de la infección. En contraste, las dos cepas avirulentas no colonizaron o lo hicieron escasamente en el músculo, hígado y riñón, aunque sí se detectaron en el mucus, branquias e intestino en las primeras horas tras la infección. Transcurridos 2 días después de la inoculación, la carga bacteriana de las cepas avirulentas fue disminuyendo hasta



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

desaparecer al séptimo día, no siendo detectada mortalidad el último día del experimento (21 d). Con todos estos resultados se concluye que, se requiere la proliferación de ASS en la superficie del rodaballo y en sus tejidos internos para que la infección tenga éxito. El marcaje genético con la proteína Gfp ha sido una herramienta útil para investigar las interacciones entre ASS y el rodaballo.



## **EVALUACION DE DIFERENTES TECNICAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACION INTRAESPECIFICA DE *Edwardsiella tarda***

Castro, N.<sup>1\*</sup>, Magariños, B., Toranzo A.E.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología/CIBUS. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Sur, 15782, Santiago de Compostela.

*Edwardsiella tarda* es un patógeno bacteriano de la familia de las Enterobacterias que ha sido descrito en una gran variedad de organismos entre los que se pueden destacar reptiles, aves, anfibios, peces e incluso animales homeotermos como es el caso del hombre. Desde sus primeras descripciones en pez gato (*Ictalurus punctatus*) y anguila (*Anguilla japonica*) *E. tarda* ha sido aislada en el medio acuático de gran número de especies de peces. Se ha llegado incluso a especular que cualquier especie de pez, bajo determinadas condiciones, puede ser susceptible de ser afectada por *E. tarda*.

En la industria acuícola la edwardsiellosis causada por *E. tarda* ha provocado altas mortalidades y pérdidas económicas. Si bien en los primeros años este patógeno estaba asociado más a cultivos de peces en aguas templadas, más recientemente han sido numerosas las descripciones de esta enfermedad en aguas más frías.

Desde el año 2004 *E. tarda* ha sido considerada como una de las más importantes patologías emergentes en el cultivo del rodaballo, siendo aislada como agente causal de mortalidades en diferentes áreas de Europa. En estudios previos de nuestro grupo, se determinó que las cepas aisladas de rodaballo, si bien no presentaban diferencias bioquímicas con el resto de las cepas de *E. tarda*, sí constituían un grupo serológico homogéneo y claramente diferenciado del resto de cepas estudiadas. En estos mismos estudios, mediante la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos del ADN (RAPD), fue posible establecer diferencias moleculares dentro de los aislados de rodaballo, demostrando la existencia de dos líneas clonales.

En el presente trabajo nos hemos propuesto realizar un estudio intraespecífico de *E. tarda* centrándonos especialmente en los aislados de rodaballo y empleando cuatro técnicas moleculares: RAPD, ERIC-PCR, REP-PCR y BOX-PCR, con el propósito de determinar la posible variabilidad dentro de la especie así como evaluar la aplicabilidad de estas técnicas en estudios epidemiológicos.

Los resultados obtenidos mediante estas cuatro técnicas demostraron que todas las cepas procedentes de rodaballo presentaban perfiles moleculares claramente diferenciables a los del resto de cepas de *E. tarda* estudiadas. Además, mientras que las técnicas de RAPD (empleando los cebadores P3 y P6), ERIC-PCR y BOX-PCR agruparon a la totalidad de aislados de rodaballo dentro de un único grupo compacto y homogéneo y diferente al del resto de cepas, el



VIII MMA

VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

uso de técnicas de RAPD (cebadores P4 y P5) y REP-PCR permitió establecer diferencias dentro de las cepas de *E. tarda* de rodaballo. Así, en el caso de RAPD se obtuvieron dos grupos clonales con un porcentaje de similitud entre sí del 85% y que podrían asociarse con el origen de las cepas. El primer grupo estaría formado por cepas aisladas en los años 2005 y 2006, mientras que el segundo grupo estaría formado casi en su totalidad por cepas aisladas en los años 2007 a 2009 a las que se sumarían un grupo de cepas aisladas durante el año 2006 en el Norte de Europa. Aunque mediante la técnica de REP-PCR también pudieron establecerse dos grupos, éstos no pudieron asociarse con el origen geográfico ni con el año de aislamiento de las cepas.

## PRIMER AISLAMIENTO DE *Tenacibaculum mesophilum* EN POBLACIONES DE ALMEJA CULTIVADA.

Diéguez, A.L.<sup>1</sup>, Labella, A.<sup>2</sup>, Balboa, S.<sup>1</sup>, Castro, D.<sup>2</sup>, Borrego, J.J.<sup>2</sup>, Romalde, J.L.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.

E-mail: anabelen.lopez.dieguez@usc.es

El género *Tenacibaculum*, descrito por Suzuki et al. (2001) pertenece a la familia *Flavobacteriaceae*. Actualmente consta de 14 especies reconocidas, todas ellas aisladas de diferentes fuentes marinas. Algunas de estas especies son conocidas por su potencial patogénico, como *Tenacibaculum maritimum*, agente causal de la tenacibaculosis en varias especies de peces marinos.

Debido a los episodios de mortalidad encontrados periódicamente en poblaciones de almeja cultivada, es imprescindible conocer la microbiota asociada a estas especies, así como el potencial patogénico de sus miembros para estos moluscos bivalvos.

En nuestro estudio, se realizaron muestreos bimensuales durante los años 2007 y 2008 en poblaciones de almeja fina y japonesa (*Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*), procedentes de distintas localizaciones geográficas en Galicia. Los aislados obtenidos se sometieron a una serie de pruebas fenotípicas que nos permitieron seleccionar las que presentaban metabolismo oxidativo, las cuales se caracterizaron en profundidad. Esta caracterización incluyó secuenciación del gen 16S rRNA y análisis de ácidos grasos (FAME). Además, se analizó la actividad citotóxica, en la línea celular de dorada SAF-1, y proteolítica asociadas a sus productos extracelulares usando el sistema API ZYM.

Se seleccionaron un total de 32 aislados por sus actividades citotóxica y proteolítica, los cuales se utilizaron en un experimento de infección artificial de larvas de almeja (*Venerupis pullastra*). Seis de estos aislados estudiados mostraron un potencial patogénico para larva de almeja al causar mortalidades en las infecciones experimentales. Uno de esos aislados se asignó al género *Tenacibaculum*. Este aislado es aerobio, Gram-negativo, inmóvil y oxidasa y catalasa positivos. Es capaz de crecer a 37° C y a concentraciones de NaCl entre 3% y 6%.

El estudio filogenético en base al gen 16S rRNA reveló que el aislado pertenece a la especie *Tenacibaculum mesophilum*, siendo la primera vez que se detecta un aislado de este género y especie en poblaciones de almeja.

### Referencias

Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., Yamamoto, S. (2001) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1639-1652.



## EFFECTOS FENOTÍPICOS DE LA MUTACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS PROTEASAS EXTRACELULARES FPP1 Y FPP2 DE *Flavobacterium psychrophilum*.

Gómez, E.\*, Pérez-Pascual, D., Álvarez, B., Guijarro J.A.

\*Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional. IUBA. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo. 33006 Oviedo.

Introducción: *F. psychrophilum* es una bacteria gram negativa causante de la "enfermedad del agua fría" que afecta fundamentalmente a los alevines de salmónidos. En la actualidad es probablemente la infección bacteriana más importante en la acuicultura continental. La bacteria es considerada como "fastidiosa" debido a las dificultades que presentan su manipulación y cultivo por lo que, en muchos aspectos, no ha sido aun intensamente estudiada. Los factores de virulencia de esta bacteria son poco conocidos y, entre ellos, las proteasas extracelulares que produce se han propuesto por diferentes indicios como posibles candidatos. Dos de ellas, denominadas Fpp1 y Fpp2, han sido identificadas, purificadas y bioquímicamente caracterizadas. En esta comunicación se presenta la estructura genética de los genes que las codifican, se desarrolla un sistema de mutagénesis insercional para la obtención de mutantes en ambos genes y se analizan sus fenotipos.

Métodos: los análisis mediante RT-PCR se realizaron con RNA obtenido de la fase estacionaria de crecimiento y el kit Superscript one-step (Invitogen). La generación de los mutantes en los genes *fpp1* y *fpp2* se llevó a cabo mediante la recombinación entre un fragmento interno del gen clonado en el plásmido pLYL003 y la secuencia homóloga presente en el cromosoma de la bacteria. La complementación de la mutación del gen *fpp2* se realizó mediante la clonación del gen completo incluida la región promotora en el plásmido pCP23 y su introducción mediante conjugación a la cepa mutante *F. psychrophilum* Fpp2-. La actividad proteolítica extracelular se determinó utilizando azocaseína como sustrato y la motilidad mediante el cultivo de la bacteria en el medio 1/6NA. Los experimentos de DL50 se realizaron por inyección intramuscular de diluciones seriadas (10<sup>3</sup> a 10<sup>9</sup> a grupos de 10 peces de un peso entre 5 y 7 g.

Resultados: los genes *fpp1* y *fpp2* forman un tándem (*fpp2-fpp1*) que de acuerdo con los resultados obtenidos mediante RT-PCR está regulado a partir de un promotor situado delante del gen *fpp2* formando por tanto un operón. Mediante mutagénesis insercional por recombinación homóloga se obtuvieron los respectivos mutantes. El mutante en el gen *fpp1* no mostró variación alguna en la actividad proteolítica extracelular, en el crecimiento ni en la extensión de la colonia en relación con la cepa parental. Sin embargo, el mutante Fpp2- careció de actividad proteolítica extracelular y, aunque su crecimiento fue similar al de la cepa parental en cultivo en medio líquido, su comportamiento en el medio sólido mostró una hiper-extensión de la colonia. La complementación del mutante Fpp2-



con el gen correspondiente revirtió los fenotipos señalados. Por otra parte, los resultados de los experimentos de DL50 indicaron que ninguna de las proteasas señaladas estaba implicada en la virulencia puesto que no existieron diferencias significativas entre las cepas mutantes y parental.

Las conclusiones más relevantes son:

- Los genes que codifican las proteasas Fpp1 y Fpp2 forman un operon.
- Se ha desarrollado un sistema que permite por primera vez en *F. psychrophilum* la mutación de genes específicos.
- La proteasa Fpp2 parece ser la responsable de la actividad proteolítica extracelular sobre azocaseína.
- Ni la proteasa Fpp2, relacionada con la motilidad de la bacteria, ni la Fpp1 están implicadas en la virulencia de la bacteria.

## ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE “QUORUM SENSING” DE *Aeromonas salmonicida*, ASAR/I, EN LA VIRULENCIA DE ESTA ESPECIE EN RODABALLO

Lago, E.P. <sup>1\*</sup>, Bobo, M.<sup>1</sup>, Rivera, L.<sup>1</sup>, Nieto, T.P.<sup>1</sup>, Farto, R.<sup>1</sup>

<sup>1\*</sup>Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Lagoas-Marcosende, 36310, Vigo.

El patógeno *Aeromonas salmonicida*, presenta un sistema de “Quorum sensing”, QS, homólogo al de *Vibrio fischeri*, conocido como AsaR/I. Varios autores observaron la relación entre este sistema y varios factores de virulencia de *A. salmonicida*, como es el caso de la serín proteasas.

Se establecieron 2 objetivos para este trabajo: 1- Estudio de la distribución de los genes del QS, *asaR* y *asal*, entre cepas típicas y atípicas de *A. salmonicida* (AS). 2- Estudio de la importancia del sistema de QS en la fisiología y la virulencia de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (ASS).

En el estudio de la distribución se analizaron 47 cepas de AS mediante métodos moleculares, estudiando la presencia de los genes *asaR* y *asal*, por PCR y métodos fenotípicos, estudiando la producción de N-acil homoserina lactonas (AHL) mediante ensayos de difusión en placa.

Para el segundo de los objetivos se utilizó una de las cepas de ASS (ACRp 43.1), virulenta para rodaballo, y tres cepas mutantes obtenidas a partir de la cepa salvaje, mAsaR1 y mAsaR2 (mutantes para el gen *asaR*) y mAsal (mutante para el gen *asal*), con las cuales se realizaron varios ensayos:

En primer lugar, se estudió la curva de crecimiento de las 4 cepas midiendo la absorbancia a 590 nm de muestras del cultivo extraídas a distintas horas y haciendo los recuentos de u.f.c./mL. Se estudió también la producción de pigmento, midiendo la absorbancia a 410 nm a partir del sobrenadante filtrado del cultivo.

También se cuantificó la actividad proteolítica total y la debida a las serín proteasas y a las metaloproteasas; por otro lado se estudió el perfil de proteínas totales en geles de poliacrilamida y los perfiles de proteasas gelatinolíticas y caseinolíticas por zimografía. Las diferencias en la virulencia entre la cepa salvaje y las cepas mutantes se estudiaron por inoculación intraperitoneal (IP) y por baño en rodaballo, inoculando distintas dosis y calculando la DL50 y la dosis letal mínima. Por último, se cuantificaron las AHLs por el método de difusión en ágar con el biosensor *C. violaceum* y se caracterizaron por cromatografía de capa fina (CCF).

Los resultados obtenidos en este estudio fueron los siguientes:

El estudio de la presencia de los genes *asaR* y *asal* del QS en AS mostró que



todas las cepas amplificaron mediante PCR para ambos genes, y que todas ellas produjeron AHL, pues estimularon a *C. violaceum* a liberar violaceína

El estudio de la curva de crecimiento y producción de pigmento no mostró diferencias entre las 4 cepas. Pero sí se encontraron diferencias en la cuantificación de la actividad proteolítica, tanto en la debida a las metaloproteasas como a las serín proteasas. Estos resultados también fueron confirmados en los perfiles de proteínas obtenidos a partir de los geles de poliacrilamida y zimografía, tanto en el número de bandas como en la intensidad de las mismas. En cuanto a los ensayos de virulencia por IP se observó que las 3 cepas mutantes mantenían su capacidad de causar mortalidad en rodaballo y no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Las inoculaciones realizadas por baño mostraron que sólo la cepa salvaje y la cepa mutante del gen *asal*, fueron capaces de causar mortalidad en dosis altas. La cuantificación de AHLs mostró, como cabría esperar, diferencias entre las cepas pues se detectó una producción claramente inferior en las cepas mutantes que en la cepa salvaje. La CCF, mostró que la molécula autoinductora presente en el sobrenadante fue BHL.

De todos estos resultados se concluye que la mutación de los genes del sistema AsaR/I afectaría a la actividad proteolítica y sin embargo, no afectaría al crecimiento, a la producción de pigmento, ni a la virulencia de las cepas de ASS estudiadas.



## IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO TRANSPORTADOR DE CISTEÍNA EN BACTERIAS IMPLICADO EN LA VIRULENCIA DE *Yersinia ruckeri*.

Méndez, J<sup>1</sup>., Navais, R<sup>1</sup>., Reimundo, P<sup>1</sup>., Guijarro, J.A<sup>1</sup>.

Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional. Facultad de medicina. Universidad de Oviedo. 33006 Oviedo

### Introducción:

La aplicación de la tecnología IVET en *Yersinia ruckeri* ha permitido la identificación del operón *cdsAB* implicado en el transporte y probablemente posterior degradación del aminoácido L-cisteína. Este aminoácido es de gran importancia puesto que constituye la única entrada de azufre reducido en el metabolismo de la mayoría de organismos. Es esencial para la biogénesis de los centros Fe-S de algunos enzimas y juega un papel importante en la formación de puentes disulfuro necesario para el plegamiento de proteínas. Además, es uno de los aminoácidos a partir de los cuales se sintetiza el glutatión, la principal molécula detoxificadora en la célula.

### Métodos:

El análisis bioinformático de las proteínas CdsA y CdsB se llevó a cabo mediante diferentes programas informáticos entre los que se encuentran Blastx y Blastp del Centro Nacional de información de Biotecnología (NCBI). Estudios de regulación *in vitro* fueron llevados a cabo mediante la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa a partir de una fusión transcripcional entre el gen *cdsB* y los genes *lacZY*. La construcción de las cepas mutantes en los genes *cdsA* y *cdsB* se realizó mediante mutagénesis insercional. La caracterización fenotípica de los mismos consistió en el análisis de crecimiento en presencia de diferentes aminoácidos midiendo la absorbancia a 600 nm. Las diferencias en el consumo de cisteína fueron determinadas mediante ensayos con ninhidrina y con 35S-L-cisteína. Finalmente se realizaron estudios *in vivo* con alevines de trucha, determinándose los índices de competencia y los valores de DL50.

### Resultados:

El análisis bioinformático indica la presencia de once dominios transmembrana así como de dominios típicos de transportadores de aminoácidos en la proteína CdsA. Del mismo modo la proteína CdsB presenta dominios conservados con el enzima L-cisteína desulfidasa de *Methanocaldococcus jannaschii* (MJ1025). Estudios de regulación *in vitro* mostraron que la cisteína es un inductor del promotor que regula la expresión del operón *cdsAB*. La mutación en el gen *cdsA* confiere a *Y. ruckeri* una mayor resistencia al aminoácido cisteína cuando crece en medio M9 en presencia de éste. Los ensayos de ninhidrina, así como experimentos con 35S-L-cisteína, indicaron una menor captación y/o consumo de este aminoácido en comparación con la cepa parental. Finalmente estudios *in*



vivo realizados con la cepa parental y las cepas mutantes *cdsA* y *cdsB* reflejaron una implicación de estos genes en la virulencia de la bacteria.

**Conclusiones:**

- Los estudios de regulación *in vitro* indicaron que el operón *cdsAB* es inducido en presencia de L-cisteína.
- La proteína CdsA está implicada en el transporte de L-cisteína en *Y.ruckeri*.
- Los genes *cdsA* y *cdsB* están implicados en la virulencia de la bacteria.



## LACAPACIDAD HEMOLÍTICA DE *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* RESIDE EN DOS HEMOLISINAS, DLY Y HLYA, CODIFICADAS EN UN NUEVO PLÁSMIDO

Rivas, A.J., Puentes, B., Osorio, C.R., Lemos, M.L.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Instituto de Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Sur, 15782 Santiago de Compostela.

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* es una bacteria de la familia *Vibrionaceae* que se encuentra asociada a ambientes marinos, siendo patógena para una gran variedad de especies acuáticas como delfines, moluscos, crustáceos y peces. Además, puede ocasionalmente infectar al hombre a través de heridas en contacto con agua de mar o por el manejo de peces o utensilios infectados con este patógeno, provocando septicemias necrotizantes de rápido avance que pueden causar la muerte en pocas horas. El principal factor de virulencia conocido hasta la fecha es una potente citolisina con actividad hemolítica, la damselsina, codificada por el gen *dly*. Se trata de una exotoxina con actividad fosfolipasa D frente a la esfingomielina, y es capaz por sí sola de provocar la muerte en ratones. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha demostrado la relación directa entre hemólisis y presencia del gen *dly*. Además, algunos estudios previos sugieren que dicho gen podría estar localizado en un elemento genético inestable.

Con el fin de identificar los genes responsables de la hemólisis en *P. damsela* subsp. *damsela* así como su contexto genético, se construyó una genoteca en cósmidos en *Escherichia coli* a partir de la cepa RM71 aislada de rodaballo, y se evaluó mediante siembra en agar sangre la actividad hemolítica de aproximadamente 300 clones. Uno de estos clones, que mostró un halo de hemólisis similar al de la cepa de *P. damsela*, fue subclonado y sometido a secuenciación parcial. Se encontró que la actividad hemolítica residía en un fragmento de aproximadamente 5 kb que contenía dos ORFs enfrentadas: una que codificaba la damselsina, y otra que codificaba una proteína de la familia de las toxinas formadoras de poro, HlyA. Mediante la secuenciación de cósmidos solapantes se demostró que los genes *dly* y *hlyA* forman parte de un plásmido no descrito hasta el momento, de aproximadamente 150 kb, que se denominó pPHDD1. El análisis de la secuencia de este plásmido evidenció la existencia de genes de un aparato de conjugación (genes *tra*), lo cual sugiere que se trata de un plásmido conjugativo.

Al analizar la presencia de pPHDD1 en una colección de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* aisladas de diferentes orígenes, se pudo comprobar que las cepas más hemolíticas en agar sangre eran positivas para diferentes marcadores ubicados en el plásmido pPHDD1, incluyendo *dly* y *hlyA*, lo que indicaba la existencia de una relación directa entre la presencia de pPHDD1 y la capacidad hemolítica.



El análisis de mutantes, obtenidos por intercambio alélico, de estas dos ORFs mostró los siguientes resultados: Los mutantes para el gen *dly* produjeron en placas de agar sangre un halo hemolítico mucho más pequeño que la cepa salvaje, si bien se trataba de un halo translúcido que sugiere una hemólisis completa; los mutantes para el gen *hlyA* produjeron un gran halo hemolítico turbio lo que sugiere que dicho mutante no produce una hemólisis completa de los eritrocitos; finalmente, una cepa doblemente mutante para estos genes presentó un halo hemolítico basal, probablemente debido a una hemolisina de baja actividad codificada en el cromosoma. Las cepas curadas de pPHDD1 mostraron un fenotipo hemolítico idéntico al de los dobles mutantes, sugiriendo por una parte que este plásmido contiene los determinantes genéticos de la hemólisis y, por otra, que no alberga genes adicionales que codifiquen otras hemolisinas diferentes de *dly* y *hlyA*.

Cuando estas dos ORFs se clonaron individualmente en *E. coli*, se observó que HlyA producía un halo translúcido, mientras que la damselisina generaba un halo turbio, y las dos ORFs juntas provocaban un halo mucho mayor. Estos datos sugieren una posible interacción sinérgica entre estas dos hemolisinas. Los resultados obtenidos indican que la base molecular de la hemólisis en *P. damselae* subsp. *damselae* reside principalmente en dos proteínas: la damselisina y la toxina HlyA, y que ambas están codificadas en el plásmido pPHDD1, presente únicamente en las cepas más hemolíticas.

## ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LA PROTEÍNA Mx DE LENGUADO SENEGALÉS

Álvarez-Torres, D.<sup>1\*</sup>, García-Rosado, E., Fernández-Trujillo, M.A.<sup>2</sup>, Castro, D.<sup>1</sup>, Béjar, J.<sup>2</sup>, Borrego, J.J.<sup>1</sup>, Alonso, M.C.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga.

### Introducción:

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) es una especie de elevado valor comercial con un alto potencial de explotación en el sur de Europa. Sin embargo, como resultado de su cultivo intensivo, se ha observado un aumento de enfermedades de etiología viral que causan importantes pérdidas en su producción. El desarrollo de las necesarias medidas profilácticas que eviten las infecciones víricas en esta especie requiere el conocimiento previo de la respuesta inmune del hospedador. Un mecanismo clave de la respuesta inmune innata en peces es el sistema del interferón (IFN) tipo I, el cual induce la expresión de proteínas antivirales, como la proteína Mx. Para contribuir al conocimiento de este sistema, el objetivo que se plantea en este trabajo es caracterizar la actividad antivírica de la proteína Mx de lenguado senegalés (SsMx) frente a diferentes tipos de virus de peces.

### Material y Método:

La caracterización de la actividad antiviral de la proteína SsMx se ha realizado utilizando un sistema *in vitro* que permite la expresión permanente de SsMx en células CHSE-214. La especificidad de la actividad antiviral se ha determinado mediante la inoculación de células CHSE que expresan permanentemente la proteína SsMx (CHSE-SsMx) con diferentes virus patógenos de peces, tales como el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (EHNV) (título inicial: 0,1 MOI). La capacidad de multiplicación de estos virus en células CHSE-SsMx se ha estudiado utilizando dos aproximaciones experimentales distintas:

Estudio de la productividad de la infección vírica, determinándose el título vírico (expresado como TCID<sub>50</sub>/ml) en el sobrenadante de cultivos celulares inoculados con los virus a ensayar a 72 h post-inoculación.

Determinación cuantitativa mediante PCR a tiempo real de la expresión de proteínas víricas a 24, 48 y 72 h post-inoculación.

### Resultados:

En el sistema *in vitro* utilizado se ha apreciado una inhibición de la replicación



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

VIII MMA

de los virus ARN: IPNV y VHSV, puesto de manifiesto por la disminución de la expresión de proteínas víricas (VP2 y nucleoproteína para IPNV y VHSV, respectivamente), así como por el descenso de la productividad vírica. Sin embargo, para el virus ADN ensayado (EHNV) no se han observado diferencias con respecto a los controles en las dos aproximaciones experimentales ensayadas.

## ACTIVIDAD ANTIVÍRICA DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS ALIMENTARIOS FRENTE A VIRUS DE SALMÓNIDOS.

De las Heras, A.<sup>1</sup>, Carrillo, W.<sup>2</sup>, Recio, I.<sup>2</sup>, Ortiz-Delgado, O.<sup>3</sup>, Sarasquete, C.<sup>3</sup>, Pérez-Prieto, S.<sup>1</sup>, Rodríguez Saint-Jean, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Departamento de Microbiología Molecular y Biología de la Infección. C/Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.

<sup>2</sup> Instituto de Fermentaciones Industriales. Departamento de ... C/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid.

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía. Campus Universitario Río San Pedro

Apdo Oficial. 11510, E-11519 Puerto Real, Cádiz, España

El uso de antivíricos en acuicultura ha sido poco investigado debido a la toxicidad, coste del producto y repercusiones en el medio ambiente. Pero las proteínas y péptidos con actividad antiviral derivados de alimentos naturales podrían obviar estos inconvenientes. En este trabajo se analizaron varios tipos de productos: 1) proteínas e hidrolizados de proteínas de leche y huevo 2) fracciones de hidrolizados de proteínas lácteas y 3) péptidos identificados en las fracciones. Se estudió su actividad antivírica in vitro frente al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV). Se realizó un primer barrido con ensayos de toxicidad y actividad realizados sobre monocapas de cultivos celulares susceptibles a los virus y en el que se determinaron las dosis tóxicas 50, las dosis inhibitorias 50 y el índice antiviral, que proporciona una idea de la potencialidad del compuesto. De un total de 42 productos procesados del apartado 1, derivados lácteos y de huevo, 25 mostraron inhibición frente al IHNV y 11 frente al IPNV. El índice terapéutico (IT) fue siempre mayor para IHNV excepto en el caso de la  $\beta$ -Caseína y sus hidrolizados, en los que los IT para ambos virus fueron iguales.

Las diferencias de actividad antivírica determinadas frente IPNV en los diversos compuestos fueron mínimas mientras que frente al IHNV los IT variaron entre 30-32 en los hidrolizados más activos y 3 en los menos. En todos los casos los tiempos óptimos de hidrólisis en cuanto a resultados de productos activos fueron los obtenidos en las tres primeras horas.

Una vez seleccionados los hidrolizados más activos y los mejores tiempos de hidrólisis, se realizaron experimentos más largos de dosis-efecto, tiempo de adición, expresión de antígenos virales. Con ello se obtuvo información general sobre el modo de acción del compuesto (si es activo en los primeros estadios del ciclo del virus o durante la replicación viral). En todos los casos la actividad es dependiente de la dosis. Los compuestos inhiben alguna de las fases de la replicación. No son viricidas. En una tercera fase experimental se trató de identificar los péptidos que eran activos en los hidrolizados, determinando su



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

actividad. En la caseína láctea se ha identificado uno de ellos que inhibe al IHNV, aunque no parece responsable de toda la actividad detectada en el hidrolizado completo, probablemente otros péptidos actúen de forma sinérgica.

Se están realizando estudios histológicos para analizar las posibles diferencias en truchas tratadas y control.

(Este trabajo se ha realizado con financiación del CSIC proyecto PIF-200520F0113 y del Ministerio de Ciencia e Innovación –proyecto AGL2007-60256/ACU).



## EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Mx EN CÉLULAS DE DORADA (SAF-1) Y ACTIVIDAD ANTIVIRAL CONTRA LINFOCISTIVIRUS (LCDV)

Jiménez-Valverde, E.\*; Cano, I., Garcia-Rosado, E., Alonso, M.C., Borrego, J.J., Castro, D.

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus Teatinos s/n, 29071, Málaga.

### Introducción/objetivos.

La dorada (*Sparus aurata*, L.) es la principal especie marina cultivada en el sur de Europa, siendo la enfermedad de linfocistis la única patología viral descrita hasta la fecha. El agente causal de esta patología es el virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV), miembro de la familia *Iridoviridae*. Aunque se han realizado algunos estudios para establecer la patogénesis de las infecciones por LCDV en dorada, estos no abordan la caracterización de la respuesta inmune del hospedador. La expresión de proteínas antivirales inducidas por interferón (IFN) tipo I es uno de los principales mecanismos de defensa celular contra las infecciones víricas. Entre éstas, la proteína Mx es la más estudiada, utilizándose frecuentemente como marcador de la respuesta antivírica mediada por IFN.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar la expresión de la proteína Mx de dorada durante la infección por LCDV utilizando como modelo células SAF-1, así como evaluar la actividad antiviral en estas células tras inducción con poli I:C.

### Métodos.

Para analizar la inducción de la expresión de la proteína Mx durante la multiplicación del LCDV se inocularon células SAF-1 a una MOI de 0,05. A distintos tiempos post-inoculación (p.i.) se cuantificaron mediante PCR a tiempo real los niveles de transcripción de la Mx y de la proteína mayoritaria de la cápside (MCP) del virus. La actividad antivírica debida a la expresión de genes estimulados por IFN se evaluó mediante inducción con poli I:C. Para ello, las células SAF-1 se incubaron con 10 mg/ml de poli I:C, procediéndose a la inoculación del virus a las 24 h post-inducción. Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de Mx y de la MCP vírica como se especificó anteriormente.

### Resultados.

La expresión de la MCP del LCDV en células SAF-1 alcanza los niveles máximos a las 3 h p.i., mientras que la expresión de la Mx de dorada se induce a partir de 1 d p.i., similar a lo que ocurre tras el tratamiento con poli I:C. Por otra parte, en las células estimuladas con poli I:C, la multiplicación del LCDV, estimada en base a la cantidad de transcritos de la MCP vírica, es prácticamente nula.

### Conclusiones.

En el modelo *in vitro* utilizado (células SAF-1), la infección por el LCDV induce



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

la expresión del gen codificador de la Mx de dorada. Además, las células SAF-1 tratadas con poli I:C quedan protegidas frente a la infección vírica, lo que revela una actividad anti-LCDV mediada por IFN.

## ANÁLISIS DE FACTORES DE VIRULENCIA DE BIRNAVIRUS ACUÁTICOS AISLADOS DE PECES SALVAJES

Lago<sup>1</sup>, M., Bandín<sup>1</sup>, I., Rodríguez<sup>2</sup>, J.F. y Dopazo<sup>1</sup>, C. P.

<sup>1</sup>Unidad de Ictiopatología. Instituto Acuicultura, Universidad Santiago de Compostela. Campus Vida, 15706, Santiago de Compostela.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular y Celular, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC. Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid.

Los birnavirus acuáticos, incluyendo el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), están extendidos a nivel mundial y han sido detectados y aislados de un gran rango de animales acuáticos, sintomáticos y asintomáticos. Sin embargo, a pesar de la distribución mundial y su alto impacto económico en acuicultura hay pocos estudios acerca de los factores que determinan la virulencia de este tipo de virus, y los existentes se basan en la influencia que la secuencia genómica tiene sobre la virulencia.

En el presente trabajo presentamos los resultados preliminares de un estudio que estamos llevando a cabo para analizar el posible efecto de otros factores como la recombinación natural y la poliploidía.

Para demostrar la influencia de la recombinación en la virulencia se están llevando a cabo inoculaciones experimentales en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lenguado (*Solea senegalensis*) con tres cepas de aquabirnavirus aisladas de peces salvajes procedentes del banco pesquero Flemish Cap: Ab (Abild), WB (West Buxton) y una cepa recombinante con segmento A tipo WB y segmento B tipo Ab. Los resultados de los experimentos de infección sugieren que el segmento B podría estar involucrado en la regulación de la virulencia. Así, en las cepas tipo WB se observó un alto nivel de virulencia, mientras que las cepas Ab y recombinante mostraron en general niveles inferiores.

En base a los resultados de otros autores (Luque et al., 2009), que han demostrado la existencia de poliploidía en el virus de la Bursitis Infecciosa del pollo (IBDV), otro virus de la familia *Birnaviridae*, y considerando que este fenómeno podría estar implicado en la regulación de la gradación de la virulencia, decidimos comenzar a trabajar en la búsqueda de este fenómeno en aquabirnavirus. Para ello, se está aplicando purificación en gradientes de cloruro de cesio de una cepa tipo WB que muestra un perfil tri-banda en geles de RNA genómico. Los resultados preliminares muestran que los viriones de IPNV se distribuyen en diferentes poblaciones en los gradientes de CsCl. Estas poblaciones tienen la misma composición proteica aunque distinta densidad. Esta diferencia de densidad puede deberse al hecho de que el virus, en su proceso de replicación, esté encapsidando un número creciente de segmentos genómicos, como ya fue descrito para IBDV.



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

Referencia.- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Castón, J. R. 2009. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. PNAS 106: 2148-2152.0

## DETECCIÓN DE NODAVIRUS EN TEJIDOS DE LUBINAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

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

<sup>1</sup>IFAPA Centro El Toruño. Camino de Tiro de Pichón s/n, 11500, El Puerto de Santa María, Cádiz.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus Teatinos s/n, 29071, Málaga.

### Introducción/objetivos.

La encefalopatía y retinopatía viral es una enfermedad ocasionada por el virus de la necrosis nerviosa vírica (VNNV), perteneciente al género *Betanodavirus*. Este virus afecta a numerosas especies de peces, tanto cultivadas como salvajes, produciendo altas mortalidades y graves pérdidas económicas en el sector acuícola.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la localización del VNNV en tejidos de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) infectadas experimentalmente. Con este fin se ha determinado el número de copias de ambos segmentos del genoma vírico mediante PCR a tiempo real en diversos órganos y a distintos tiempos post-inoculación, realizándose en paralelo ensayos de titulación del virus.

### Métodos.

Se inyectaron intramuscularmente (i.m.) ejemplares juveniles de lubina (10 g) con un aislado vírico del genotipo RGNNV (107 TCID<sub>50</sub>/ml, concentración final). Los animales se mantuvieron a una temperatura de 21-24 °C. Los muestreos se realizaron a los 3, 10, 17, 24, 31 d y a los 2 meses post-inoculación (p.i.), tomándose muestras de cerebro, ojo, hígado/bazo/riñón, y aleta caudal. Las muestras se procesaron para la cuantificación absoluta del número de copias de los segmentos genómicos víricos, ARN1 y ARN2, llevándose a cabo en paralelo la titulación vírica mediante el cálculo del 50% de la dosis infectiva en cultivos celulares (TCID<sub>50</sub>) utilizando la línea celular E-11.

### Resultados.

La mortalidad comenzó a los 7 d p.i., alcanzando un valor acumulado máximo del 37% a los 29 días p.i. Los protocolos de PCR a tiempo real desarrollados permitieron la detección de ambos segmentos del genoma viral en todos los órganos analizados y en todos los tiempos de muestreo. En períodos iniciales (3 d p.i.) el mayor número de copias de ARN vírico se detectó en el cerebro. Sin embargo, en los restantes tiempos de muestreo el mayor número de copias de ARN viral se localizó en ojo. Con respecto a los tejidos no nerviosos, el genoma vírico se detectó en todos los órganos muestreados y, aunque el número de



copias para los dos segmentos fue siempre mayor en órganos internos que en aletas, cabe destacar la presencia de genoma vírico en este último tejido.

Los títulos víricos obtenidos en el transcurso de la infección experimental oscilaron entre  $10^3$  y  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml (para aleta y tejido nervioso, respectivamente), observándose los valores máximos en cerebro y ojo a los 17 d p.i. Tras la finalización del período de mortalidad se detectaron partículas víricas infectivas en el tejido nervioso y en órganos internos, aunque en estos últimos tejidos sólo hasta los 31 d p.i.

### **Conclusiones.**

La metodología desarrollada ha permitido determinar que el ojo y el cerebro son los órganos diana preferentes para la replicación vírica. Sin embargo, se ha demostrado que los órganos internos y la aleta caudal también pueden actuar como órganos de localización vírica. Además, la detección de nodavirus en aleta caudal mediante RT-PCR a tiempo real puede sugerir el uso de este tejido para la detección de portadores asintomáticos mediante un método no cruento alternativo al análisis de sangre.

## INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE BETANODAVIRUS RECOMBINANTES EN LENGUADO (*Solea senegalensis*)

Souto, S.<sup>1\*</sup>, Olveira, J. G.<sup>1</sup>, Dopazo, C. P.<sup>1</sup>, Barja, J. L.<sup>1</sup> & Bandín I.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Ictiopatología-Patología Viral. Departamento de Microbiología y Parasitología. Instituto de Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Vida, 15706, Santiago de Compostela, A Coruña.

Los betanodavirus son los agentes etiológicos de la patología conocida como necrosis nerviosa viral, una devastadora enfermedad que causa importantes mortalidades en un gran número de peces marinos de cultivo en todo el mundo. El genoma de betanodavirus consta de dos moléculas de ARN de cadena simple y positiva. El ARN1 codifica la polimerasa viral (RdRp) y el ARN2 codifica la proteína de la cápside (Cp). Los betanodavirus se clasifican en cuatro grandes grupos en base a una secuencia del ARN2 que contiene una región variable denominada región T4. Los grupos coinciden con las cuatro especies actualmente reconocidas striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV). Estos genotipos se caracterizan por exhibir una diferente capacidad de infectar distintas especies de peces.

Recientemente se ha demostrado la existencia de recombinantes naturales entre los genotipos RGNNV y SJNNV en 6 cepas aisladas de lenguado y dorada (Olveira y col., 2009) en la Península Ibérica.

En el presente estudio se realizó una infección experimental de juveniles de lenguado con 4 cepas distintas de betanodavirus: SpSs-IAusc160.03 y PtSs-IAusc573.04 (ambas recombinantes RGNNV/SJNNV aisladas de lenguado), SpDI-IAusc1688.08 (una cepa RGNNV aislada de lubina) y SJ93Nag (una cepa de referencia de tipo SJNNV). Los peces se inocularon por inmersión con una concentración viral de 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml a dos temperaturas distintas: 18°C and 22°C. Además con las cepas recombinantes se realizó un ensayo de cohabitación.

Sólo se produjeron mortalidades en los grupos de peces infectados con las cepas recombinantes, tanto en los grupos de inmersión como en los de cohabitación. A 22°C los peces empezaron a morir antes que a 18°C, alcanzando mortalidades del 100% el día 22 p.i. en los grupos de baño. Se consiguió el re-aislamiento del virus a partir de los peces muertos cumpliéndose los postulados de Rivers (Rivers, 1937). Los betanodavirus se detectaron por RT-PCR y aislaron en cultivo celular en todos los grupos de peces inoculados con las cepas RGNNV y SJNNV.

Los resultados sugieren que ambos genotipos pueden replicar en lenguado aunque no muestran evidencias de patología y que los cambios que tienen lugar en ambos segmentos después de la recombinación (Olveira y col., 2009) tienen efecto en la patogenicidad del virus en lenguado.



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

Oliveira, J.G., Souto, S., Dopazo, C.P., Thiéry, R., Barja, J.L. & Bandin, I. (2009). Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *Journal of General Virology.*, 90, 2940-2951.

Rivers, T.M. (1937). Viruses and Koch's postulates. *Journal of Bacteriology.* 33:1-12.





## **EL PEZ CEBRA (*Danio rerio*) COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y LA RESPUESTA INMUNE.**

Figueras, Antonio, Rodríguez, Iván, Dios, Sonia, Romero, Alejandro y Novoa, Beatriz.

Instituto de Investigaciones Marinas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Vigo. Spain

### **Introducción.**

Uno de los grandes problemas en el estudio de la respuesta inmune y enfermedades de peces es la falta de especies modelo con genomas conocidos y herramientas genómicas disponibles. El pez cebra podría ser una alternativa para estas especies de interés en Acuicultura.

### **Material y métodos.**

Hemos llevado a cabo infecciones experimentales con la bacteria *Aeromonas hydrophila* y el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) para determinar la susceptibilidad de del pez cebra a estas infecciones así como su respuesta inmune.

### **Resultados y Conclusión.**

El pez cebra fue susceptible a infecciones mediante inyección en la cavidad visceral con bacteria viva y con sus productos extracelulares (ECPs). Ambos produjeron elevadas mortalidades en pocas horas. La infección, con bacteria viva o con sus ECPs, causaron necrosis en las células del riñón anterior, debido a las actividades citotóxicas y hemolíticas de estos ECPs bacterianos. Además, la infección afectó a la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS). Los genes de  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  y  $IFN\gamma$  estaban sobreexpresados en el riñón de los peces cebra inyectados con bacteria viva, bacteria muerta por calor y ECPs.

Con respecto a las infecciones virales, el pez cebra resultó un modelo adecuado para estudiar infecciones virales y vacunación con VHSV, el agente etiológico de una de las enfermedades víricas más importantes de salmónidos. Aunque la alta protección obtenida con un virus vivo atenuado muestra que el pez cebra es capaz de establecer una respuesta inmune a 15°C, la expresión de los genes relacionados con la defensa antiviral está afectada por la temperatura durante el desarrollo embrionario.



# **Biodiversidad microbiana de los sistemas acuáticos**



## HUEVOS DE MOSQUITOS *Chironomus* sp., UN NUEVO HÁBITAT PARA *Aeromonas aquariorum*, UNA BACTERIA POTENCIALMENTE PATÓGENA.

Beaz-Hidalgo R.<sup>1\*</sup>, Figueras M.J.<sup>1</sup>, Senderovich Y<sup>2</sup>, Laviad S.<sup>2</sup>, Halpern M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Microbiologia. Departament de Ciènces Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. IISPV. Universitat Rovira i Virgili, Reus.

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Haifa, Oranim, Tivon 36006, Israel.

**Introducción:** Las *Aeromonas* son consideradas microorganismos autóctonos del medio acuático capaces de producir infecciones importantes en humanos habiéndose aislado como agente etiológico en diversos procesos infecciosos como septicemias, infecciones nosocomiales y desórdenes gastrointestinales. Recientemente se ha demostrado que los huevos de mosquito *Chironomus* sp. pueden ser un reservorio natural tanto de *Aeromonas* spp. como de *Vibrio cholerae*. Estos insectos están ampliamente distribuidos en el medio acuático pudiendo actuar como vehículo de diseminación de especies bacterianas patógenas en los sistemas de agua potable.

**Objetivos:** Re-identificar 26 aislados de *Aeromonas* recuperadas de huevos de mosquito identificadas previamente en base al gen 16S rRNA y evaluar en estas cepas la presencia de genes asociados a factores de virulencia.

**Métodos:** Se utilizó la técnica ERIC-PCR para determinar la presencia de clones, se secuenció el gen *rpoD* para su identificación a nivel de especie y se realizaron PCR específicas para determinar la presencia de genes que codifican para distintos factores de virulencia.

**Resultados y Conclusión:** La re-identificación en base al gen *rpoD* de los 26 aislados de *Aeromonas* revelaron que 23 pertenecen a la especie de reciente descripción *Aeromonas aquariorum*. Esta especie fue descrita en peces ornamentales, aunque ha sido recientemente asociada con infecciones extraintestinales en humanos. La técnica ERIC-PCR permitió diferenciar 11 genotipos de los 23 aislados de *A. aquariorum*. Además se comprobó la presencia de distintos genes asociados a factores de virulencia. El 90.9% de las cepas fueron positivas para el gen *alt* (enterotoxina termolábil citotóxica), el 81.8% para *ahpB* (elastasa) y *ascF-ascG* (Sistema de Secreción tipo III), el 54.5% para *pla/lip/lipH3/apl-1/lip* (lipasa), el 27.3% para *fla* (flagelo) y *act/hylA/aerA* (enterotoxinas citotóxicas) y el 9% para *aexT* (toxina liberada por el Sistema de Secreción tipo III). Los resultados del presente estudio sugieren que los huevos de mosquito de *Chironomus* sp. son un nuevo hábitat de *A. aquariorum* y demostraron que la especie estaba enmascarada y mal identificada como *Aeromonas caviae*. Además las cepas de *A. aquariorum* poseen una amplia variedad de genes asociados a factores de virulencia pudiendo ser potencialmente patógena para humanos tal



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

y como ya se ha demostrado. Por tanto es importante la monitorización y el estudio de la prevalencia, virulencia y diversidad intra-especie de *A. aquariorum* en los mosquitos *Chironomous* sp que infectan los sistemas de agua potable con el fin de profundizar en la ecología y epidemiología de este patógeno emergente en humanos.

## MICROBIOTA ASOCIADA A HUEVOS DE PULPO (*Octopus vulgaris*) EN CULTIVO

Combarro, M. P. \*, Míguez, B., Sestelo, A.B.F., Sieiro, C.

Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Lagoas-Marcosende, 36310, Vigo.

La microbiota asociada a la superficie de huevos de peces en cultivo ha sido ampliamente estudiada, demostrándose una estrecha relación entre carga bacteriana y mortalidad. En cefalópodos, sin embargo, los escasos estudios que se han llevado a cabo en este campo hacen referencia a la resistencia de los huevos a microorganismos patógenos, debido principalmente a la presencia de componentes antimicrobianos producidos por otras especies bacterianas presentes de forma mayoritaria.

El cultivo del pulpo (*Octopus vulgaris*) está en pleno desarrollo pero presenta grandes problemas debido a la alta mortalidad de la fase larvaria. El estudio de la microbiota asociada a huevos supone una primera pauta para conocer la composición microbiana de los estadios de desarrollo de esta especie, y determinar la relevancia que pueda tener en el éxito de su cultivo.

Se llevó a cabo el estudio taxonómico de 396 cepas: 176 aisladas de la superficie de los huevos y 220 aisladas del agua del tanque. La identificación mediante taxonomía numérica, empleando el método de agrupamiento UPGMA, se basó en 94 pruebas fenotípicas cuyos resultados se analizaron por separado para cepas fermentadoras y no fermentadoras de glucosa. La identificación molecular se realizó mediante secuenciación del gen 16S del rRNA en 25 cepas, 13 fermentadoras y 12 no fermentadoras.

Del total de los aislados incluidos en el estudio fenotípico el 61.87% fueron fermentadores de glucosa y el 38.13 % fueron no fermentadores. La taxonomía numérica de las cepas fermentadoras permitió la agrupación del 83,26% de los aislados y la identificación fenotípica de las especies; *Vibrio splendidus* biotipo I (31,84%), *Vibrio salmonicida* (11,83%), *Vibrio harveyi* (8,98%), *Vibrio agarivorans* (5,31%) y *Vibrio fischeri* (4,08%). La identificación molecular confirmó la presencia de *Vibrio harveyi* y *Vibrio splendidus*, detectándose otras especies de vibrios como *Vibrio furnissii*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio tasmaniensis*. En el caso de las cepas no fermentadoras, la identificación taxonómica agrupó el 79,47% de los aislados, con la identificación presuntiva de las especies; *Marinomonas communis* (16,55%), *Cytophaga lytica* (11,92%), *Tenacibaculum maritimum* (9,93%), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (3,31%), *Halomonas aquamarina* (2,64%) y *Pseudomonas stutzeri* (1.32%). Mediante caracterización molecular se identificó *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Shewanella* sp., *Bacillus megaterium*, *Idiomarina loihiensis*, *Marinomonas* sp., *Psychrobacter* sp. y *Roseobacter* sp.

Este estudio aporta la primera descripción de bacterias cultivables asociadas a huevos de pulpo (*Octopus vulgaris*) en cultivo. Las especies del género



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

Vibrio están presentes de forma mayoritaria dentro del grupo de anaerobios facultativos, destacando la presencia de especies descritas como patógenas en acuicultura pero que hasta el momento no se han relacionado de forma directa con mortalidades en huevos de otros organismos marinos. En el caso de los aislados aerobios se ha encontrado una mayor diversidad de géneros y especies, estando algunos de estos relacionados con la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos en acuicultura.



## ***Joostella ponsvetera* sp. nov. AISLADA DE ALMEJA FINA (*Ruditapes decussatus*) CULTIVADA EN LA RÍA DE PONTEVEDRA.**

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

Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS-Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela. España. [jesus.romalde@usc.es](mailto:jesus.romalde@usc.es)

### **Introducción**

La familia *Flavobacteriaceae* (Jooste, 1985) es una de las líneas filogenéticas más importantes dentro del phylum "*Bacteroidetes*" (Garrity y Holt, 2001) La familia incluye un grupo bien definido de "géneros acuáticos", cuyos miembros están ampliamente extendidos en hábitats marinos, donde contribuyen a la mineralización de la materia orgánica. El género *Joostella* sólo comprende una especie, *Joostella marina* (Quan *et al.*, 2008), aislada en la costa del Mar de Corea, y sus miembros se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, pigmentados, inmóviles, aerobios, oxidasa y catalasa positivos. Recientemente se ha descrito actividad antibacteriana en miembros de esta especie, lo que sugiere la posibilidad de ser utilizados eventualmente como probióticos en el cultivo larvario de moluscos.

En este estudio se describe una nueva especie dentro del género *Joostella*, aislada de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) cultivada en la Ría de Pontevedra.

### **Materiales y métodos**

Durante al año 2008 se llevaron a cabo muestreos bimensuales en un parque de cultivo de playa de almeja fina en la Ría de Pontevedra, cuya finalidad era estudiar la microbiota asociada. Para la obtención de los aislados, los órganos de las almejas se extrajeron y se homogenizaron en solución salina (1:1 p/v) y las diluciones se sembraron en AM (agar marino) y TCBS (tiosulfato citrato bilis sacarosa). Transcurridas 48 horas se realizó el aislamiento de las diferentes bacterias presentes en ambos medios de cultivo. Posteriormente se llevó a cabo una caracterización bioquímica preliminar para diferenciar los aislados fermentativos y oxidativos. Dada la dificultad para identificar los aislados oxidativos mediante caracterización bioquímica se efectuó la secuenciación del gen 16S rRNA de los mismos.

### **Resultados**

El análisis de la secuencia nucleotídica del gen del 16S rRNA permitió definir la localización taxonómica de cuatro cepas relacionadas que muestran una similitud menor del 97,5% con *Joostella marina*, siendo esta especie la más cercana desde el punto de vista filogenético. Las cepas PPL1.11, PPL1.18, PPL1.30 y PPL2.18 se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, inmóviles, con pigmentación amarilla y arreactivos.



## Conclusiones

Los resultados preliminares obtenidos a partir de la secuenciación del 16S rDNA indican que las cuatro cepas representan una nueva especie dentro del género *Joostella*, para la cual se propone el nombre de *Joostella ponsvetera*. En estos momentos están en curso experimentos adicionales de hibridación DNA-DNA para confirmar estos resultados, así como experimentos de inhibición bacteriana para determinar el papel que desempeñan estas bacterias como parte de la microbiota asociada al cultivo de almeja fina.

## Bibliografía

Jooste P. J. and De Haast J., A numerical taxonomic study of *Flavobacterium-Cytophaga*. 1985. J Appl Bacteriol. 59 311-323

Quan Z.X., Xiao Y.P., Roh S.W., Nam Y.D., Chang H.W., Shin K.S., Rhee S.K., Park Y.H. and Bae J.W. *Joostella marina* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the East Sea. 2008. Int J Syst Evol Microbiol. 58 1388-1392.

## ***Janthinobacterium lividum* AISLADA EN UN MANANTIAL MINEROMEDICINAL**

De la Rosa, M C., Platero, L., Navarro-García, F. y Mosso, M. A.

Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. UCM. 28040 Madrid.

El género *Janthinobacterium* fue propuesto por Sneath, en 1984, para incluir en él la especie *Chromobacterium lividum* con características fenotípicas y genotípicas muy distintas de la otra especie *Ch. violaceum*, ambas productoras del pigmento violaceína. Actualmente, este género está incluido en la clase *Betaproteobacteria*, familia *Oxalobacteraceae*. Son bacilos Gram negativos, móviles, catalasa y oxidasa positivos. Se diferencian de otras especies productoras de violaceína por ser aerobios estrictos, con metabolismo respiratorio y psicrotrofos que crecen de 4° a 30°C (Gillis y Logan, 2005).

La característica más significativa y visible de esta especie es la producción de un pigmento violeta, soluble en etanol e insoluble en agua, que se favorece en medios de cultivo con triptófano y que ha sido utilizado como colorante de fibras. La violaceína tiene propiedades citotóxicas y antimicrobianas que pueden tener un importante papel en la supervivencia y competición con otros microorganismos en el ambiente (Lu *et al.*, 2009). Suele ser frecuente la aparición en los subcultivos de cepas no pigmentadas, total o parcialmente. Su hábitat es el suelo y agua de climas fríos y templados y ha sido ocasionalmente implicada en la alteración de leche pasteurizada y en infecciones oportunistas (Pantarella *et al.*, 2007).

En este estudio se han caracterizado dos cepas de *J. lividum* aisladas de un manantial mineromedicinal utilizado para los tratamientos terapéuticos en el Balneario de la Concepción (Albacete). El agua emerge a 28°C y se clasifica como extremadamente dura, con predominio de sulfato, bicarbonato, cloruro, calcio, magnesio y sodio (Maraver, 2010).

Las cepas se aislaron filtrando, por duplicado, 10 mL de agua, tomada en el punto de emergencia, y cultivando en agar extracto de levadura y R2A a 22°C. Posteriormente se resembraron en agar nutritivo y se identificaron mediante pruebas fenotípicas como *J. lividum* "atípica". Las cepas "atípicas" se diferencian de las típicas por la apariencia gelatinosa de las colonias y por no hidrolizar la esculina ni la gelatina y han sido previamente aisladas en suelos de la Antártida (Shivaji *et al.*, 1991). El recuento de viables de esta especie en el agua ha sido muy bajo (1 ufc/ 10 mL).

También se ha realizado un estudio genético, amplificando las secuencias 16S rDNA mediante PCR, utilizando los cebadores E8F y 1510Ric (Baker *et al.*, 2003) y DNA genómico de los clones. Los productos de PCR fueron clonados en un vector comercial (pGEMT, Promega), y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante BLAST frente a la base de datos nr del NCBI, presentando una identidad superior al 98% con las de diversas cepas de *Janthinobacterium* spp. lo que confirma su identificación fenotípica.



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

Ambas cepas producen un pigmento violeta que ha sido identificado como violaceína tras su extracción con etanol mediante espectrofotometría por su espectro de absorción máximo en etanol a 579 nm y en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 699 nm (Gillis y Logan, 2005).

- Baker *et al.*, 2003. JMM 55:541-555.
- Gillis, M. and Logan, N. 2005. Bergey's Manual. 2° ed. Vol. 2:636-642.
- Lu *et al.*, 2009. Bioch. Engine. J.,43: 135-141.
- Maraver, F. y Armijo, F. 2010. Vademecum II de aguas mineromedicinales españolas. Ed. Complutense
- Pantanella *et al.*, 2007. J. Appl. Microbiol.,102: 992-999.
- Shivaji *et al.*, 1991. Polar Biol.,11: 267-271.



## DIVERSIDAD Y NOVEDAD TAXONÓMICA ENTRE BACTERIAS QUIMIOHETEROTROFAS MARINAS AISLADAS DE LA MALVARROSA

Lucena, T.\*, Macián, M.C., Pujalte, M.J., Arahal, D.R.

Departamento de Microbiología y Ecología, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia. Burjassot, 46100 Valencia. E-mail: tlucena@cect.org

### Introducción

El número de especies procariotas descritas actualmente apenas supera las 8300 (<http://www.bacterio.cict.fr>), lo que se debe en gran medida a la dificultad para aislar los microorganismos en cultivo puro, requisito indispensable para describir nuevos taxones. En los ambientes acuáticos, el conocimiento taxonómico de esta diversidad también se encuentra muy limitada y sigue estando aun hoy subestimada.

Con el objetivo de incrementar el conocimiento de especies procariotas marinas y su descripción formal, nuestra línea de investigación realiza muestreos en la costa valenciana a la búsqueda de nuevos aislados de interés taxonómico.

### Metodología

Un muestreo preliminar de agua de mar costera en la playa de la Malvarrosa (Valencia) se llevó a cabo usando diferentes condiciones de cultivo con el fin de ampliar las posibilidades de obtener nuevos aislados. Se utilizaron medios de cultivo de características nutricionales diferentes: Marine Agar (MA), con 6 g/L de materia orgánica, y R2A marino, con 2,8 g/L, además de sus versiones diluidas (1/100 y 1/50 respectivamente), y dos temperaturas de incubación (15 y 26 °C).

### Resultados y Conclusiones

Una selección de aproximadamente 200 colonias obtenidas de dichos medios ha sido identificada tentativamente mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA hasta el nivel de género y especie, cuando ello ha sido posible. El análisis de los resultados obtenidos nos ha permitido hacer las siguientes observaciones:

Los grupos mayoritarios de *Vibrionaceae*, cuyo predominio en este tipo de estudios es bien conocido, han sido *V. mediterranei* y el Grupo harveyi (que incluye *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. rotiferianus*).

La incidencia de ambos en los medios ensayados ha resultado ser muy distinta, encontrándose favorecido el Grupo harveyi en los medios de R2A marino con una representación del 34 %, el doble que el obtenido en MA. Por el contrario, *V. mediterranei* tiene mayor representación en los medios de MA con un 11 %, el doble que el obtenido para esta especie en R2A marino.



El porcentaje de aislados que representan con seguridad nuevos taxones (<97 % de similitud de secuencia del 16S rRNA con la especie establecida más cercana) oscila entre un 13 y un 15 % del total de aislados en las distintas condiciones de cultivo.

La composición del medio (MA y variaciones *versus* R2A marino y variaciones) no afectó apenas al porcentaje de nuevos taxones aislados.

La composición del medio tampoco afectó a la abundancia relativa de los dos grupos mayoritarios, alfa-proteobacterias y gamma-proteobacterias.

La dilución del medio redujo el número de aislados totales recuperados, así como el de posibles nuevos taxones.

Las bajas temperaturas afectaron en menor medida al total de cepas aisladas, sin embargo el porcentaje de cepas con novedad taxonómica fue similar al obtenido diluyendo los medios.

Es muy notable constatar la práctica ausencia de "*Bacteroidetes*" (sólo un aislado).

Como parte del trabajo también se ha procedido al depósito en la CECT de las cepas de interés, para llevar a cabo la caracterización y descripción de los potenciales nuevos taxones.



## ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL CULTIVO LARVARIO DEL PULPO (*Octopus vulgaris*)

Míguez, B.\*; Sestelo, A.B.F.; Sieiro, C.; Combarro, M. P.

Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Lagoas-Marcosende, 36310, Vigo.

En los últimos años, el cultivo del pulpo (*Octopus vulgaris*) ha adquirido un papel relevante en el panorama de la acuicultura gallega, al ser ésta una especie de gran importancia económica. Sin embargo, todavía no se ha logrado optimizar de forma productiva este cultivo debido a la alta mortalidad de las paralarvas durante su desarrollo.

El presente trabajo tiene como objetivo llevar a cabo una primera descripción de la microbiota asociada al cultivo de las paralarvas de pulpo, así como la identificación de posibles bacterias patógenas que puedan estar relacionadas con su mortalidad.

Se realizó el estudio taxonómico de 426 cepas bacterianas: 97 aisladas de la superficie de las larvas, 115 aisladas del intestino, 132 aisladas del fito-zooplankton del medio de cultivo y 82 aisladas del agua del tanque. Para la identificación fenotípica mediante taxonomía numérica se realizaron 94 pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, cuyos resultados se analizaron por separado para cepas fermentadoras y no fermentadoras de glucosa. La identificación molecular mediante secuenciación del gen 16S del rRNA se llevó a cabo en 36 cepas fermentadoras y 21 no fermentadoras, seleccionadas en función de los resultados obtenidos en la identificación fenotípica previamente descrita.

El 68,78% de los aislados fueron fermentadores de glucosa. Mediante taxonomía numérica se logró el agrupamiento del 87,04% de estos aislados con la identificación fenotípica de las especies; *Vibrio salmonicida* (16,86%), *Vibrio pectenicida* (13,33%), *Vibrio splendidus* biotipo I (10,98%), *Vibrio kanaloae* (9,8%), *Vibrio ordalii* (8,24%), *Vibrio harveyi* (6,67%), *Vibrio fischeri* (3,92%) y *Aeromonas veronii* (0,78%). Con la caracterización molecular se identificaron las especies: *V. splendidus*, *V. harveyi*, *V. furnissii*, *V. fischeri*, *V. logei*, *V. mediterranei*, *V. pelagius* y *Photobacterium profundum*. Del 31,22% de cepas no fermentadoras se agruparon el 92,48% de los aislados, algunos de los cuales se incluyeron en fenones con cepas de colección; *Pseudoalteromonas haloplanktis* (20,32%), *Marinomonas communis* (16,26%), *Cytophaga lytica* (9,77%), *Moraxella nonliquefaciens* (7,52%) y *Halomonas marina* (1,5%). Mediante secuenciación del gen 16S rRNA se han identificado principalmente; *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Sulfitobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudoalteromonas tunicata*, *Shewanella woodyi*, *Colwellia psychrerythraea*, *Idiomarina loihiensis*, *Halomonas* sp. y *Marinomonas* sp.



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

El presente trabajo es el primer estudio de microbiota asociada al cultivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*). Especies del género *Vibrio* fueron identificadas mayoritariamente a partir de los aislados de intestino de larvas y de fito-zooplankton, destacando la presencia de bacterias descritas como patógenos en el cultivo de larvas de otros organismos marinos. Entre los aislados aerobios, cabe destacar la presencia de especies bacterianas descritas por primera vez asociadas a un cultivo larvario.





## ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVABLE DE LA LAGUNA DE LA CALDERA DEL PARQUE NACIONAL DE SIERRA NEVADA (GRANADA)

<sup>1</sup>Reboleiro-Rivas, P., <sup>1</sup>Rodelas-González, B., <sup>2</sup>Martínez-Toledo, M.V., <sup>1</sup>González-López, J., <sup>3</sup>Fenice, M., <sup>1</sup>Cortés-Lorenzo, C., <sup>1</sup>Andrade, L., <sup>1</sup>Juárez-Jiménez, B.

<sup>1</sup>Área de Microbiología Ambiental. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071, Granada.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, 18071, Granada.

<sup>3</sup>DECOS: Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile University of Tuscia, Viterbo, Italia

Las lagunas de alta montaña constituyen ecosistemas únicos, donde aún persisten especies endémicas. En las últimas décadas se está generalizando su estudio tanto desde un punto de vista abiótico como del estudio de sus distintas comunidades. Concretamente, la *Laguna de la Caldera* es un sistema acuático de origen glacial ubicado en el Parque Nacional de Sierra Nevada (Granada), y situada a 3050 m de altura que presenta una destacada oligotrofia. Por otro lado, el estudio de la Biodiversidad Microbiana constituye una herramienta útil para el estudio del mundo microbiano, ya que permite conocer los diferentes hábitats así como el comportamiento de los diversos ambientes y microambientes del planeta. Por consiguiente, el estudio de la biodiversidad microbiana de la Laguna de la Caldera reporta interesantes aplicaciones en el campo de la protección, preservación medioambiental, además de interesantes propuestas en el campo de la biotecnología. Como objetivos proponemos el estudio de biodiversidad cultivable de la laguna de La Caldera, concretamente: 1. Determinación del número de bacterias heterotróficas (UFC/ml) mediante recuento en distintos medios de cultivo y temperaturas de incubación. 2. Identificación genética, mediante secuenciación del gen codificante del ARNr 16S de la microbiota bacteriana más representativa. 3. Estudio filogenético de los microorganismos identificados mediante análisis Neighbour-Joining. Para llevar a cabo este estudio, se realizaron 2 muestreos en el periodo de deshielo; las muestras se tomaron de la capa fótica superficial de 3 puntos de la laguna. Posteriormente se procedió a la identificación microbiana: a) abundancia numérica, b) crecimiento en cultivos puros, c) identificación a nivel genético (Burns *et al.*, 2004). Para ello se realizó: 1) Un estudio de aislamiento en diferentes medios de cultivos y Tas de incubación (Minna *et al.*, 2006); 2) Un análisis filogenético de los microorganismos cultivados: a) Extracción de DNA mediante lisis celular; b) amplificación por PCR del gen codificante del ARNr 16s; c) secuenciación y análisis informático de las secuencias (Chromas v.1.51; Clustal X2), comparación con las bases de datos EMBL y Genbank, y d) creación de árboles filogenéticos mediante el método de Neighbour-Joining (MEGA4). Tras realizar nuestros ensayos, en el medio mínimo



de Winogradsky se observó un n° reducido de colonias en contraposición con los medios de cultivo TSA y TSA diluido. Los crecimientos de los microorganismos aislados fueron muy similares a ambas Tas (15 y 5°C), pudiéndose observar que la microbiota estudiada podría encuadrarse como microorganismos psicotolerantes. Por otro lado, la secuenciación del gen 16S ARNr, ha permitido conocer las relaciones filogenéticas de un total de 53 microorganismos aislados, pertenecientes mayoritariamente a las clases *gamma* y *beta* *Proteobacteria*. El % de Gram negativas (90,5%), frente a Gram positivas (9,5%) manifiesta coherencia con los resultados encontrados en diversas publicaciones (Glöckner *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2004; Qinglong *et al.*, 2006; van Trappen *et al.*, 2002, Xingqing *et al.*, 2008, Spring *et al.*, 2000). El 91,6% de los microorganismos aislados se sitúan filogenéticamente en los clusters de *Proteobacterias*. El análisis comparativo de los resultados filogenéticos obtenidos, también muestra un alto % de microorganismos aislados (63,8%) relacionados evolutivamente con cepas pertenecientes a la clase *gamma-Proteobacteria*, con una acusada dominancia del género *Pseudomonas*. En nuestro estudio, tanto Gram positivas de alto G+C como de bajo G+C se presentan en porcentajes similares: *Actinobacterias* (5,7%) y *Firmicutes* (3,8%), lo que podría justificar una posible relación entre los hábitats permanentes de nieve (tal y como describe en otros ambientes acuáticos fríos Spring *et al.*, 2000). De todo nuestro estudio, concluimos que: 1. Las diferentes Tas no influyeron en el n° UFC/ml, no obstante en los medios de cultivo enriquecidos se incrementó el n° UFC/ml y la diversidad colonial. 2. El estudio de las relaciones filogenéticas muestra una marcada biodiversidad siendo los grupos más representativos *gamma-Proteobacteria*, *alfa-Proteobacteria*, *beta-Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacterias*. 3. La biodiversidad del 2º muestreo fue significativamente mayor que en el 1º muestreo.



## **Vibrios ASOCIADOS A REPRODUCTORES DE OSTRA PLANA (*Ostrea edulis*) DURANTE EL ACONDICIONAMIENTO EN CRIADERO.**

Dubert Pérez, J., Barja Pérez, J.L., Prado Plana, S.

Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS - Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela (USC). Campus Sur, 15782, Santiago de Compostela.

La ostra plana (*Ostrea edulis*) es una de las especies más importantes dentro de la acuicultura marina de moluscos bivalvos en Galicia. Una mala planificación en su explotación provocó una drástica reducción en las poblaciones autóctonas naturales hasta hacerlas desaparecer casi por completo. Un primer paso indispensable para la recuperación de estas poblaciones es la obtención de semilla competente en criadero, dada la falta de suministro de origen natural.

En las instalaciones de cultivo, las mortalidades por causas bacteriológicas son unos de los factores limitantes. Una de las primeras vías de entrada de patógenos bacterianos al sistema es la microbiota asociada a los reproductores utilizados. Este factor cobra especial importancia en la ostra plana, ya que las larvas quedan retenidas en el interior de la cavidad paleal de la hembra durante un periodo prolongado de tiempo correspondiente a las primeras fases de desarrollo. De esta manera, la transmisión vertical de bacterias entre progenitores y larvas aumenta considerablemente el riesgo de infección por bacterias potencialmente patógenas, siendo los miembros del género *Vibrio* los principales agentes etiológicos de mortalidades larvarias.

Teniendo en cuenta lo expuesto, profundizar en el conocimiento de la microbiota de los reproductores es una herramienta importante para la optimización del cultivo de ostra plana en criadero, mediante el control de la entrada de posibles patógenos.

Con este objetivo se muestrearon 3 lotes de reproductores de *Ostrea edulis* durante su acondicionamiento en criadero (2-4 meses). Para su procesado, se cortaron asépticamente porciones de gónada, y se homogeneizaron en agua de mar estéril. Las diluciones apropiadas se sembraron en los medio Agar Marino y TCBS. Se aislaron los tipos de colonia predominantes en cada muestra. Se conservaron mediante congelación (-80°C) en Caldo Marino suplementado con glicerol.

Los 77 aislados obtenidos se caracterizaron bioquímicamente mediante metodología clásica en tubo y placa. En este trabajo se presentan los resultados de los estudios realizados con los 56 aislados con metabolismo fermentativo. Todos ellos compartieron las características del género *Vibrio*. Esta información no permitió asignarlos a ninguna especie en concreto, pero sí resultó útil para agruparlos en base a los perfiles obtenidos. Se seleccionaron representantes de cada uno de ellos, hasta un total de 33, para establecer su posición taxonómica.



Con esta finalidad, se secuenció el gen *ARNr 16S* y, en aquellos casos en que fue preciso se completó con la secuenciación los genes *recA* y *rpoA*.

La secuenciación del *ADNr 16S* confirmó que todas las cepas pertenecen al género *Vibrio*.

La gran mayoría de los aislados analizados ( $n=27$ ) formaron parte del grupo de especies relacionadas con *V. splendidus*, comunes en sedimentos marinos costeros, agua de mar y moluscos bivalvos. Algunas, como *V. splendidus* o *V. tasmaniensis*, han sido además asociadas a brotes de mortalidades en moluscos. La secuenciación del gen *ARNr 16S* no nos permitió definir con claridad la posición filogenética de nuestras cepas dentro del grupo, siendo necesario el análisis multilocus de secuencias (MLSA) para estudiar su biodiversidad.

De entre los aislados no incluidos en este grupo, las cepas 455 y 472 se identificaron como *V. breoganii* (clado *V. halioticoli*) tanto por bioquímica como genéticamente.

Por otro lado, las cepas 670, 671, 675 y 679 no se pudieron asignar a ninguna especie del género *Vibrio* descrita hasta ahora, al mostrar porcentajes de similitud de los genes *ARNr 16S* y *recA* inferiores a los límites establecidos. El análisis de las secuencias génicas concatenadas de los 3 genes estudiados apoyó la idea de que se pueda tratar de nuevas especies. Es necesario realizar estudios complementarios para confirmar esta hipótesis. Además, para poder conocer la variabilidad intraespecífica sería necesario encontrar más aislados similares.

## UNA NUEVA PROTEOBACTERIA MARINA CERCANA A SHIMIA-NAUTELLA - PHAEOBACTER

Pujalte, M.J.\*, Lucena, T., Ruvira, A., Macián, M.C., Arahal, D.R.

Departamento de Microbiología y Ecología, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia. Burjassot, 46100 Valencia.

E-mail: maria.j.pujalte@uv.es

### Introducción

Seis cepas bacterianas, M17 (CECT 7615), M15Ø3 (CECT 7616), M49 (CECT 7637), M76 (CECT 7638), 2OM6 (CECT 5090) y R37 (CECT 7639), aisladas de agua de mar del Mediterráneo en diferentes medios y condiciones de cultivo, han sido caracterizadas con el fin de determinar si constituyen un nuevo taxón, ya que el análisis comparativo de sus secuencias para el gen 16S rRNA ha mostrado diferencias superiores al 3 % con las de cualquier otra especie con estándar en nomenclatura.

### Metodología

Las cepas se han cultivado rutinariamente en Marine Agar a 28 °C y han sido caracterizadas en su fenotipo por métodos previamente descritos por Macián *et al.* (2005). El perfil de ácidos grasos celulares procesó siguiendo las condiciones de Sasser (1990). El análisis comparativo de la secuencia del gen 16S rRNA se ha realizado según Arahal *et al.* (2008).

### Resultados

Se trata de bacilos Gram-negativos, móviles, no fermentadores, oxidasa y catalasa positivos, que no hidrolizan gelatina, caseína, almidón, alginato, lecitina, Tween-80, DNA, urea o esculina. Son también negativos para la producción de indol y ADH. Todas las cepas presentan actividad leucina arilamidasa, fosfatasa ácida y alcalina y negativas para el resto de actividades de la galería API ZYM. Se comportan como halófilas con requerimientos iónicos específicos, que pueden ser sólo de Na (M17 y 2OM6) o bien de Na<sup>+</sup> + Mg<sup>++</sup> (el resto). Crecen en un rango de salinidades entre el 2 y el 5 %, son mesófilas, incapaces de crecer a 4 °C o por encima de 37 °C. Dos cepas, M17 y 2OM6, difieren del resto en alguna prueba clave, como la capacidad de desnitrificar, las temperaturas y salinidades máximas de crecimiento y el uso de varias fuentes de carbono. Todas ellas utilizan algunos monosacáridos como fuente única de C y energía, pero prefieren ácidos orgánicos y aminoácidos. Los principales ácidos grasos celulares son los C18:1 (78-84 %), seguidos por cantidades mucho menores (entre el 1 y el 5 %) de ácidos grasos saturados (C16:0 y C18:0) y 2- y 3- hidroxiaácidos de 10, 12 y 16 C.

Las secuencias del gen 16S rRNA de estas seis cepas presentan semejanzas entre ellas muy cercanas al 100 %. Al compararlas con las secuencias de especies establecidas los valores más altos se quedan entre 95,5 % y 96,4 % (con especies



de *Phaeobacter*, *Shimia*, *Nautella* y *Tropicibacter*). En los árboles filogenéticos elaborados, constituyen un grupo independiente y claramente diferenciado, que puede distinguirse del resto de miembros de la familia *Rhodobacteraceae* también a nivel fenotípico, mediante un amplio número de caracteres.

### Conclusiones

El grupo formado por las seis cepas referidas constituye un nuevo taxón en la familia *Rhodobacteraceae* (*Alphaproteobacteria*) que podría tener el nivel de nuevo género o bien de nueva/s especie/s.

### Referencias

Arahal, D. R., Sanchez, E., Macian, M. C. & Garay, E. (2008). Value of *recN* sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family "*Leuconostocaceae*". *Int Microbiol* 11, 33- 39.

Macián, M. C., Arahal, D. R., Garay, E., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. & Pujalte, M. J. (2005). *Thalassobacter stenotrophicus* gen. nov., sp. nov., a novel marine  $\alpha$ -proteobacterium isolated from Mediterranean sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 105–110.

Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark: DE: MIDI Inc.



## CARACTERIZACIÓN DE TRES NUEVOS ELEMENTOS INTEGRATIVOS Y CONJUGATIVOS (ICES) EN *Vibrios* AISLADOS DE PECES

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

Departamento de Microbiología y Parasitología. Instituto de Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Sur, 15782 Santiago de Compostela.

La transferencia genética horizontal desempeña un papel primordial en la generación de diversidad bacteriana, facilitando la adaptación al medio, y promoviendo la dispersión de genes relacionados con la patogenicidad y la resistencia a antimicrobianos. Los ICES (*Integrating and Conjugative Elements*) son un tipo de elementos de ADN móvil que poseen características comunes con plásmidos, bacteriófagos y transposones. Son capaces de movilizarse de forma autónoma por conjugación, integrándose en el cromosoma por recombinación específica de sitio dado que carecen de capacidad de autoreplicación. Los ICES más estudiados son los de la familia "SXT/R391", con un tamaño aproximado de 100 kb. Aislados inicialmente en cepas de *Vibrio cholerae* en la India en 1992, desde entonces se ha constatado su expansión geográfica tanto en cepas patógenas de *V. cholerae* como en otras especies. Recientemente, el análisis de la secuencia completa de 13 elementos ICE de esta familia ha permitido definir un esqueleto común altamente conservado que codifica las funciones de movilización e integración. Además, contienen regiones hipervariables que, evolucionando de manera modular, incorporan nuevos genes con funciones tan diversas como la resistencia a antibióticos y metales pesados o la modulación de la motilidad. El único ICE descrito hasta la fecha en un patógeno de peces se caracterizó en una cepa de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* aislada de lenguado en el sur de España. Este ICE se denominó ICEPdaSpa1, confiere resistencia a tetraciclina y posibilita la movilización del plásmido de virulencia pPHDP10.

Dado que la mayoría de los ICES de la familia SXT/R391 se han descrito en *V. cholerae*, en este trabajo nos planteamos estudiar cuál es la prevalencia de ICES de la familia SXT/R391 en bacterias aisladas de peces cultivados en la costa Atlántica. Para ello, hemos rastreado mediante PCR la presencia de marcadores moleculares específicos (gen de la integrasa y genes del aparato de conjugación) en una colección de 350 cepas de Gamma-proteobacterias procedentes de 18 localizaciones diferentes de la costa de Galicia y Portugal.

De esta forma se detectaron 3 cepas de las especies *Vibrio splendidus*, *V. alginolyticus* y *V. lentus* positivas para los marcadores utilizados. Tras secuenciar y analizar las regiones variables se pudo comprobar que se trataba de 3 nuevos ICES con combinaciones génicas nunca antes descritas, y que se denominaron ICEVspPt1, ICEVa/Spa1 y ICEVleSpa1 respectivamente. De los tres elementos,



hemos centrado el estudio en ICEVspPt1, dado que es el único que confiere resistencia a antibióticos, concretamente a la tetraciclina.

Hemos demostrado que ICEVspPt1 es capaz de transferirse por conjugación desde *V. splendidus* a *E. coli* con una frecuencia de  $4 \times 10^{-4}$ , tasa que aumenta hasta  $2 \times 10^{-3}$  cuando la conjugación se efectúa entre cepas de *E. coli*. También se ha constatado que ICEVspPt1 se transfiere a otras especies patógenas potencialmente presentes en el mismo ecosistema, tales como *V. anguillarum* y *P. damsela* a frecuencias estimadas de  $1 \times 10^{-6}$ . Además, es destacable que entre los genes presentes en las regiones variables, ICEVspPt1 porta genes de resistencia a mercurio (*merACPTR*) idénticos a los descritos en el ICE R391 aislado de *Providencia rettgeri*, así como genes de un sistema de restricción y modificación de tipo III homólogo a uno presente en el genoma de *V. harveyi*.

Los resultados de este estudio indican no sólo que la frecuencia de ICEs de la familia SXT/R391 en bacterias presentes en las plantas de acuicultura de la costa atlántica podría ser significativa, sino también que el rango de especies susceptibles de albergar este tipo de elementos es mayor de lo inicialmente descrito. La utilización de antibióticos, especialmente del grupo de las tetraciclinas, en las plantas de cultivo, podría estar funcionando como un factor de selección positiva para la expansión de estos elementos móviles. Dado que los tres ICEs descritos en el presente trabajo contienen ADN variable nuevo, no presente en los miembros de esta familia descritos hasta la fecha, se puede pensar que el pangenoma de esta familia de ICEs dista de estar acotado. Por tanto, es probable que se describan nuevas variantes de ICEs a medida que el número y la diversidad de bacterias marinas estudiadas se incrementen.



## **DIVERSOS GENOTIPOS DE *Aeromonas veronii* ESTAN PRESENTES EN UN ACUARIO DE PECES TROPICALES DE AGUA DULCE Y EN LOS CARACOLES QUE LO INFESTAN.**

Paredes K.<sup>1\*</sup>, Beaz-Hidalgo R.<sup>1</sup>, Figueras M. J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Microbiologia. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. IISPV. Universitat Rovira I Virgili, Reus.

### **Introducción:**

El género *Aeromonas*, comprende en la actualidad 25 especies, la mayoría de las cuales están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos (ríos, lagos, estuarios, aguas residuales, etc) pudiéndose encontrar tanto como bacterias de vida libre o asociadas a otros organismos (peces, moluscos, crustáceos, etc). Esta prevalencia convierte al género *Aeromonas* en el agente etiológico responsable de una gran variedad de infecciones tanto en peces como en personas inmunodeprimidas como inmunocompetentes. En este sentido una de las especies recientemente descritas, *Aeromonas aquariorum*, fue aislada a partir de agua de un acuario y de sus peces tropicales y posteriormente se ha reportado a partir de muestras clínicas tanto intestinales como extraintestinales. Estos datos junto con la descripción de un caso de fallo renal en una niña de 6 meses, asociado a una cepa de *Aeromonas*, la cual se sospechó que provenía del agua de un acuario, ponen de manifiesto que los acuarios pueden ser un reservorio importante de *Aeromonas*.

### **Objetivo:**

Investigar la incidencia de *Aeromonas* en muestras de agua, sedimento y caracoles provenientes de un acuario.

### **Método:**

Se analizaron un total de 5 muestras (3 muestras provenientes del agua, 1 del sedimento del filtro y 1 de los caracoles que infestaban el acuario). Las muestras se sembraron en medio ADA, a partir del cual se aislaron 8 colonias de cada muestra que fueron sometidas a pruebas bioquímicas para confirmar su pertenencia al género (oxidasa positiva, crecimiento en NaCl 0% y no crecimiento en NaCl 6%). Todas las colonias se verificaron en base a un método de PCR específico para el género, basado en la amplificación del gen que codifica para una lipasa extracelular, la glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa (GCAT). Todos los aislados confirmados fueron genotipados mediante la técnica del ERIC-PCR para reconocer posibles clones. Un representante de cada genotipo, fue identificado a nivel de especie en base a su patrón de RFLP del gen 16S rRNA y por secuenciación del gen *rpoD*.

### **Resultados:**

Las 5 muestras investigadas resultaron ser presuntamente positivas para



*Aeromonas*, en base a su morfología colonial. Sin embargo del total de 40 colonias investigadas 21 (52.5%) resultaron pertenecer al género *Aeromonas*, en base a las pruebas fenotípicas y de éstas sólo 16 (40%) fueron confirmadas por la GCAT-PCR. De estos 16 aislados, 7 (29%) provenían de muestras de agua, 3 (37%) del sedimento del filtro y 6 (75%) de caracoles. En base al patrón obtenido por ERIC-PCR, se demostró que estas 16 colonias pertenecían sólo a 3 genotipos diferentes. El genotipo I fue encontrado en muestras de agua, sedimento de filtro y caracoles; el genotipo II en muestras de agua y caracoles y el genotipo III únicamente fue obtenido en caracoles. Estos 3 genotipos resultaron pertenecer a la especie *Aeromonas veronii*, en base tanto a su patrón de RFLP como a la secuenciación del gen *rpoD*.

### Conclusiones:

Este estudio preliminar demuestra que diversas cepas de *Aeromonas veronii*, una especie frecuentemente aislada en casos clínicos, está presente en todas las muestras del acuario. Queda por delimitar en estudios posteriores la presencia de genes de virulencia en estas cepas ya que podrían jugar un rol importante en el desarrollo de infecciones. Los caracoles presentaron los 3 genotipos simultáneamente lo que parece indicar que el origen de las cepas de esta especie en el acuario podrían ser los caracoles, aunque esto debería demostrarse. La ampliación de este estudio, con un mayor número de acuarios, puede permitir establecer, la prevalencia real de esta especie y la diversidad de otras, no detectadas en este estudio. El ambiente de un acuario, debido a su manipulación, podría considerarse como una fuente potencial de infección para los seres humanos, tal y como se ha sugerido en estudios previos.



## DIVERSIDAD DE ARCHAEA EN LAGOS CÁRSTICOS ESTRATIFICADOS CON ANOXIA ESTACIONAL ¿QUIÉN ANDA AHÍ?

Fillol, M., Plasencia, A., Llirós, M., Gich, F., Borrego, C.

Grupo de Ecología Microbiana Molecular, Instituto de Ecología Acuática, Universitat de Girona. Campus de Montilivi, E-17071, Girona.

Durante los últimos años se ha estudiado la presencia y distribución de Archaea en diferentes lagos y lagunas del sistema cárstico de Banyoles caracterizados por meromixis, anoxia estacional y un ciclo del azufre muy activo. En estos ambientes, las archaea constituyen comunidades poco abundantes (<10% del total de células) y mayoritariamente localizadas en las zonas anóxicas profundas, donde la concentración de sulfhídrico puede llegar a 1 mM. Un análisis detallado mediante clonación del gen del 16S rRNA de archaea reveló diferencias significativas en cuanto a la composición de la comunidad planctónica y del sedimento en relación al estado trófico del ambiente analizado. Así, en lagos oligotróficos, el mayor número de clones se afilió a un linaje de crenarchaeota oxidadoras de amonio (*Marine Group* I.1a), muy abundantes y ubicuas en sistemas acuáticos oligotróficos, tanto lacustres como marinos. La presencia de una interfase óxico-anóxica bien definida y la distribución coincidente en profundidad de máximos de nitrato y nitrito y del marcador funcional de las archaea nitrificantes (el gen de la subunidad A de la amonio-monooxigenasa, *amoA*) sugiere, además, una contribución — aún no cuantificada— de estos microorganismos en los procesos de nitrificación que tienen lugar en estas interfases. Las pocas *Euryarchaeota* recuperadas en estos ambientes oligotróficos pertenecen a linajes constituidos principalmente por representantes no cultivados (*Thermoplasmata* y *Deep Hydrothermal Vent Euryarchaeota*). Por otra parte, las librerías de clones realizadas de ambientes meso- o eutróficos mostraron un predominio prácticamente exclusivo del Reino Crenarchaeota (80% del total de clones) y en concreto del linaje *Miscellaneous Crenarchaeotic Group* (MCG). Como su nombre indica, este grupo incluye clones recuperados de los más diversos ambientes y se ha sugerido que la mayoría de ellos serían heterótrofos anaerobios. Su ubicuidad y exclusividad en las capas anóxicas profundas de los lagos estudiados, ricas en sulfhídrico, amonio y materia orgánica parecen reforzar esta hipótesis. No puede descartarse, por otra parte, la presencia de metabolismos autotróficos dentro de este grupo. Los estudios realizados hasta la fecha por nuestro grupo se suman a las numerosas evidencias que indican una diversidad de Archaea mucho mayor de la supuesta de acuerdo con su presunto origen extremófilo, y que las capas profundas, anóxicas y sulfurosas, de estos lagos cársticos constituyen un reservorio de riqueza hasta ahora inexplorado.





## ESTUDIO COMPARATIVO DE CEPAS DE *Streptococcus phocae* AISLADAS DE SALMÓN Y FOCA

Ruben Avendaño-Herrera<sup>1\*</sup>, Sabela Balboa<sup>2</sup>, Alberto Contreras-González<sup>1</sup>, Beatriz Magariños<sup>2</sup>, Jorge Fernández<sup>3</sup>, Alicia E. Toranzo<sup>2</sup>, Jesús L. Romalde<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Andrés Bello, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Ciencias Básica, Viña del Mar, Chile

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

<sup>3</sup>Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Salud Pública, Chile.

*Streptococcus phocae*, es un patógeno Gram-positivo y  $\beta$ -hemolítico que produce mortalidades masivas en el cultivo chileno del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cuando las temperaturas son superiores a 16°C. El modo de transmisión y ruta de infección de esta enfermedad son todavía desconocidos, pero no se descarta la hipótesis de un salto de especie desde su hospedador natural, es decir las poblaciones de pinnípedos (focas) ubicados cercanos a las instalaciones acuícolas donde se cultivan los salmónidos (Romalde et al., 2008). Sin embargo, recientes estudios de geno- y sero-tipificación de cepas de *S. phocae* procedentes de salmónidos y la cepa tipo de la especie aislada a partir de foca, han mostrado la existencia de heterogeneidad estrechamente relacionada al huésped de aislamiento (Valdés et al. 2009).

El presente trabajo, tiene como objetivo dilucidar la posición taxonómica de aislados de *S. phocae* asociados a distintos huéspedes de aislamiento.

Las cepas de *S. phocae* se analizaron usando geles PAGE-SDS, Western-Blot, MIDI, secuenciación de genes metabólicos (MLST) y MALDI-TOF MS de acuerdo a procedimientos estándares.

El análisis de proteínas de *S. phocae* en geles de poliacrilamida teñidos con tinción de plata y transferidos a membranas de nitrocelulosa para estudios inmunológico, muestran la existencia de 2 perfiles estrechamente asociados al origen de aislamiento (salmón o foca). Similar resultado se registró al analizar el contenido de ácidos grasos (FAME) de las cepas, aún cuando se registró los mismos componentes mayoritarios en el perfil de FAME (>10%). De esta forma, los aislados obtenidos a partir de focas muestran  $C_{16:0}$  (29,53  $\pm$  1,69%),  $C_{18:1\ w9c}$  (13,45  $\pm$  0,70%) y la suma de la característica 5 (13,04  $\pm$  1,06%), mientras que el porcentaje en los aislados de salmónidos es 19,17  $\pm$  1,37%; 20,67  $\pm$  0,94% y 34,91  $\pm$  2,34, respectivamente. Los resultados de MLST usando los genes *groEI*, *gyrB*, *rpoB*, *recN* y *sodA* confirman la existencia de las dos divisiones genéticas principales. Sin embargo, la traducción a proteínas de las secuencias obtenidas a partir de aislados de *S. phocae* de salmón y foca muestran que son idénticas. Finalmente, el análisis de células completas de aislados representativos de *S. phocae* de salmón y foca por MALDI-TOF MS no detectó diferencias entre las



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

cepas. En base a los resultados obtenidos *S. phocae* debe ser considerada una especie clonal. Futuros estudios de hibridación DNA-DNA confirmarán si las dos líneas clonales detectadas constituyen dos subespecies distintas de *S. phocae*.

**Financiamiento:**

FONDECYT 1090054 (CONICYT, Chile) y AGL2006-13208-C02-01 (Ministerio de Ciencia e Innovación, España).

# **Avances metodológicos**





## COMPARACIÓN DE TRES PAREJAS DE CEBADORES PARA LA DETECCIÓN DEL PATÓGENO DE ALMEJA *Vibrio tapetis*.

Balboa, S., Doce, A., López-Diéguéz, A., Romalde, J.L.

Departamento de Microbiología and Parasitología. CIBUS. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Sur s/n. 15782. Santiago de Compostela.

*Vibrio tapetis* es el agente causal de la enfermedad del anillo marrón. La enfermedad se caracteriza por la presencia de un depósito marrón de materia orgánica en la cara interna de la concha, situada en al entre la línea paleal y el borde de la concha. La identificación de este patógeno se hace clásicamente en base a sus características fenotípicas y antigénicas. En el caso de la identificación fenotípica se hace en base a cuatro características: crecimiento en TCBS, no utilización de sacarosa, incapacidad de crecer a temperaturas superiores a 30°C y la incapacidad de producir ácido a partir de manitol. Pero para la identificación fenotípica es necesario el aislamiento en cultivo puro del patógeno con incubaciones que varían entre uno y siete días. Además, el aislamiento de *V. tapetis* es difícil y se ha demostrado que aunque se detecte por métodos indirectos como inmunofluorescencia o PCR el patógeno puede no ser aislado en medio de cultivo.

En este trabajo se comparó la especificidad y sensibilidad de tres parejas de cebadores previamente descritas: VtF-VtR (Paillard *et al.*, 2006), VtKF-VtKR (Park *et al.*, 2006) y Jvt1-Jvt2 (Romalde *et al.*, 2007). Las tres parejas están diseñadas amplifican una zona variable del 16S, rindiendo amplicones de 416, 413 y 816 bp respectivamente. Para el ensayo de especificidad se utilizaron 55 cepas tipo de *Vibrio* seleccionadas en base a su similitud en la secuencia del gen rDNA 16S con *V. tapetis* así como 19 cepas de *V. tapetis* con diferente origen geográfico y de hospedador. La sensibilidad se determinó utilizando diluciones seriadas de 10<sup>8</sup> a 10 células/ml de un cultivo en fase exponencial de la cepa tipo de *V. tapetis* CECT4600T. Todas las PCR se realizaron en paralelo en dos termocicladores y por triplicado.

Usando la pareja de cebadores Jvt1-Jvt2 no se encontró ninguna reacción positiva en los 55 vibrios utilizados, mientras que usando VtF-VtR se observaron amplificaciones inespecíficas con *V. mytili*, *V. proteolyticus*, *V. splendidus*, *V. ezurae*, *V. nigripulchritudo*, *V. pommeroyi* y *V. pectenecida*. En el caso de la pareja VtKF-VtKR se encontraron reacciones positivas para *V. mytili* y *V. pectenecida*. En el caso de *V. tapetis*, todas las cepas amplificaron independientemente de la pareja de cebadores utilizados.

Por otro lado, las parejas VtF-VtR y Jvt1-Jvt2 resultaron ser las más sensibles, obteniéndose amplificaciones usando hasta 1pg de DNA mientras VtKF-VtKR fueron capaces de amplificar 10pg de DNA.

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos decir que la pareja de cebadores Jvt1-Jvt2 es la mejor de las tres ensayadas ya que a pesar de tener la misma



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

sensibilidad que VtF-VtR muestra una mayor especificidad, no obteniéndose en ningún caso amplificaciones con otros vibrios.

#### **References:**

Paillard, *et al.* 2006. *Aquaculture*. 253: 25-38.

Park *et al.* 2006. *Aquaculture*. 255: 610-613

Romalde *et al.* 2007. Patente ES 2 265 707. Patente ES 2 265 707. Oficina Española de Patentes y Marcas.



## UTILIDAD DEL CHROMagar™ VIBRIO PARA SU USO EN ACUICULTURA

Buján, N.\*, Bastardo, A., Diéguez, A. L., Romalde, J. L. y Barja, J. L.

Departamento de Microbiología y Parasitología. C.I.B.U.S. - Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Sur, 15782, Santiago de Compostela.

En la acuicultura, una gran parte de las mortalidades son causadas por infecciones de origen microbiano. La necesidad de una rápida identificación de las bacterias causantes de esas pérdidas, hace interesante el desarrollo o ensayo de nuevos medios de cultivo diferenciales y/o selectivos, que nos permitan en poco tiempo reconocer los agentes patógenos. El medio de cultivo más usado en este momento es el TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa), un medio selectivo para vibrios, uno de los géneros más problemáticos en acuicultura. El CHROMagar™ VIBRIO (Hara-Kudo y col., 2001) es un medio cromogénico que pone de manifiesto la presencia de *Vibrio cholera*, *V. parahemolyticus* y *V. vulnificus* según la pigmentación de las colonias y es muy usado en la industria alimentaria ya que simplifica los análisis sin rebajar fiabilidad.

Por ello, el objetivo de este trabajo es ensayar la posible utilidad de este medio en la detección de vibrios patógenos en la industria acuícola.

El primer grupo de experimentos, consistió en la comparación del crecimiento de cepas en CHROMagar™ VIBRIO y TCBS (Oxoid), empleando como controles positivos Agar Marino (AM, Pronadisa) y TSA-1 (Pronadisa). Para ello, 1µl de las diferentes suspensiones bacterianas ajustadas a una densidad de 103 células/ml, se inocularon mediante replicador en placas. El crecimiento de las cepas se verificó entre 24 y 72 horas de incubación a 25°C. que fueron. Se utilizó un amplio número de especies *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. splendidus*, *V. pelagius* y otros vibrios, *Aeromonas hydrophyla* y *A. salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda*, un grupo de especies oxidativas (*Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Alteromonas*), así como otras cepas aisladas de bivalvos y peces. El segundo grupo de experimentos se centró en la determinación del grado de sensibilidad del medio sembrando diferentes concentraciones. En el tercer grupo de ensayos se sembraron muestras de agua de mar de criadero de moluscos en CHROMagar™ VIBRIO y TCBS.

Entre los primeros resultados obtenidos destacar que una de las especies más comunes en acuicultura, *V. splendidus*, crece en TCBS mientras que no lo hace en el medio cromogénico. Por otro lado, las posibles especies de interés no forman colonias características y diferenciables de otras. Las bacterias fermentativas como *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*, crecen mostrando una coloración azul-verdosa, similar a *V. vulnificus*. Como cabía esperar,



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

las bacterias oxidativas ensayadas no crecieron en CHROMagar™ VIBRIO. Estos resultados parecen indicar que el medio no supone una mejora frente al TCBS que recomiende su uso en los sistemas de cultivos.

Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J. y Kumagai, S. (2001). Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Appl. Environ. Microbiol. 67:5819-23

## VALORACIÓN DE MÉTODOS MINIATURIZADOS PARA LA DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA DE *Bacteróides* spp. Y *Bifidobacterium* spp.

Casanovas-Massana, A. <sup>1\*</sup> y Blanch, A.R. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Microbiologia. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.  
Av. Diagonal, 645 -08028- Barcelona

### Introducción

*Bacteróides* spp. i *Bifidobacterium* spp. son dos géneros de bacterias mayoritarias en el aparato digestivo de humanos y animales que han sido propuestos como indicadores del origen de la contaminación fecal en el agua (Chevalier et al., 1991). Su fisiología estrictamente anaerobia, los elevados requerimientos nutricionales y su incapacidad para multiplicarse por debajo de 30°C, explican que las especies de estos dos géneros no puedan replicar a nivel extraentérico (Sinton et al., 1998). Es razonable pensar que haya habido una especiación a nivel de huésped y consecuentemente existan especies específicas de huésped. Por lo tanto, es de gran utilidad disponer de métodos comerciales de fácil aplicación que permitan la discriminación e identificación de las especies de *Bacteróides* spp. y *Bifidobacterium* spp. y con ello identificar el origen de la contaminación fecal en el agua. El objetivo de este estudio fue valorar los métodos miniaturizados API 20A (Biomérieux, Francia) y Phene-Plate System: PhP-RE y PhP-RF (Bactus AB, Suecia) para la diferenciación fenotípica de las especies de estos géneros.

### Materiales

En el caso de la galería API 20A se siguió el protocolo descrito por el fabricante para el crecimiento e inoculación de las cepas. Una vez inoculadas, las galerías se cerraron en bolsas plásticas conteniendo una tira Anaerocult® A (Merck) que produce una atmosfera anaerobia. Además, se añadió una tira de Anaerotest® (Merck) que permite comprobar que efectivamente la atmosfera dentro de la jarra ha permanecido en anaerobiosis en todo momento. Las galerías se incubaron a 37°C durante 48h. De manera similar se procedió a la adaptación y la valoración de la aplicabilidad de las placas PhP-RE y PhP-RF del Phene-Plate System. Se valoraron diferentes medios de resuspensión de los cultivos puros para la posterior inoculación de las microplacas siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El medio de suspensión aconsejado por la casa comercial no puede utilizarse debido a su composición basal inadecuada para el crecimiento de *Bifidobacterium* spp. y *Bacteróides* spp. y al indicador de pH que resulta de un rango inadecuado atendiendo a la fisiología de los géneros y a las condiciones reductoras generadas en la atmósfera anaeróbica necesaria para su crecimiento. También se adaptó el protocolo de incubación y lecturas del crecimiento atendiendo a la necesidad de mantener en todo momento la anaerobiosis. Las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis conteniendo una tira Anaerocult® A (Merck) añadiendo una tira de



Anaerotest® (Merck). Las jarras se incubaron a 37°C, y se realizaron lecturas del crecimiento en los pocillos de las placas mediante un espectrofotómetro a 620nm (iEMS Reader MF, Labsystems) a 16h, 40h y 64h. Para cada lectura, las placas se sacaron de las jarras y con la mayor celeridad se procedió a su lectura. Finalmente devolvieron a la jarra con un nuevo Anaerocult® A y Anaerotest®. En total, 15 cepas de *Bacteroides spp.* y 30 cepas de *Bifidobacterium spp.* fueron utilizadas para la validación. Los perfiles bioquímicos obtenidos se estudiaron utilizando la base de datos APIWeb® i el programa informático PhPWin®.

### Resultados

Las galerías API 20A permiten discriminar correctamente la mayor parte de las cepas de *Bifidobacterium spp.*, pero no las de *Bacteroides spp.* que presentan perfiles poco comparables y de difícil interpretación. Por otro lado, se ha observado que las placas PhP-RF permiten una mejor diferenciación de las cepas de ambos géneros que las placas PhP-RF. Mayoritariamente las cepas tipo estudiadas presentan perfiles suficientemente diferentes como para poder ser identificadas correctamente mediante esta técnica.

### Conclusión

Dado que las placas PhP-RF y las galerías API 20A permiten obtener niveles adecuados de separación entre especies de *Bifidobacterium spp.* i *Bacteroides spp.*, y que los protocolos de trabajo optimizados son de fácil aplicación, su uso en el análisis de la diversidad de las poblaciones en aguas residuales es altamente recomendable.



## COMPARACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL Y LA ISO 21872-1:2007 PARA LA DETECCIÓN DE *Vibrio parahaemolyticus* PATÓGENO

Garrido, A., Chapela M.J., Lago, J., Ferreira M., Atanassova M., Vieites J.M., Cabado A.G.

Area de Microbiología y Toxinas. Centro Técnico Nacional de Conservación de Productos de la Pesca. ANFACO-CECOPESCA. Carretera Col. Univ. 16, 36310 Vigo (Pontevedra).

### Introducción/Objetivos

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria halófila que se encuentra de modo habitual en mariscos y otros crustáceos y puede producir gastroenteritis cuando éstos se consumen crudos o poco cocinados. Se ha asociado esta especie bacteriana a casos de gastroenteritis en diversas partes del mundo. El principal objetivo que se plantea en este trabajo es la "comparación" de la técnica PCR en tiempo real, para la detección de *V. parahaemolyticus* patógeno (TDH+ y TRH+) frente al método de microbiología clásica desarrollado en la norma ISO 21872-1:2007. Hay que tener en cuenta que por el método de microbiología clásica no se llega a la detección de patógeno, sino que harían falta pruebas complementarias.

### Métodos

- Detección de *V. parahaemolyticus* patógeno mediante método ISO 21872-1:2007. Se evaluaron la productividad y selectividad de diferentes medios de cultivo.
- Detección de *V. parahemolyticus* patógeno mediante PCR en tiempo real. Se usaron dos sondas fluorescentes diferentes para realizar la detección simultánea de dos genes de patogenicidad, una de ellas diseñada en este trabajo. Se evaluaron diferentes métodos de extracción de ADN para la PCR en tiempo real.

### Resultados/Conclusiones

- Existen diferencias significativas en la productividad de los medios de cultivo evaluados empleando las especificaciones de la ISO/TS 11133-2:2003. El uso de un segundo medio sólido selectivo permitirá mejor detección de *V. parahaemolyticus*.
- La técnica de PCR en tiempo real diseñada en este trabajo permite obtener unos límites de detección de *V. parahemolyticus* similares a los obtenidos por los métodos de microbiología tradicional por lo que es una alternativa válida a los métodos de microbiología clásica para la detección de este patógeno.







## DISCRIMINACIÓN DE BACTERIOFAGO T4 INFECTIVO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL Y PROPIDIO MONOAZIDO (PMA)

Fittipaldi, M<sup>1\*</sup>, Pino Rodríguez, N<sup>2</sup>, Codony, F<sup>1</sup>, Adrados, B<sup>1</sup>, Agusti, G<sup>1</sup>, Peñuela, G<sup>2</sup>, Morató, J<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Sanitaria y Mediambiental. Universitat Politècnica de Catalunya. Violinista Vellsolà, 37, 08222, Terrassa, Barcelona.

<sup>2</sup>Grupo de Diagnóstico y Control de la Contaminación (GDCON). Sede de Investigación

Universitaria, Universidad de Antioquia, calle. 62 # 52-59, Medellín, Colombia.

**Introducción/Objetivos:** Los virus, son uno de los agentes patógenos de mayor interés en salud pública, debido a que causan un gran número de enfermedades de origen hídrico y alimentario. La determinación de la presencia de partículas virales con capacidad infectiva en diferentes tipos de muestras es fundamental para entender la capacidad de persistencia de los virus en el medio ambiente, la eficacia de los diferentes métodos de desinfección, y la evaluación del riesgo de transmisión a las poblaciones humanas susceptibles. El advenimiento de la PCR en tiempo real ha permitido detectar y cuantificar con mayor rapidez, sensibilidad y especificidad la concentración de genomas virales en el medio ambiente. Sin embargo esta técnica tiene ciertas limitaciones, siendo una de las más importantes la dificultad para diferenciar entre virus infectivos y aquellos no infectivos. Con el fin de minimizar esta limitación, se evaluó la utilidad de un método combinado de detección, consistiendo en un pretratamiento con propidio monoazido (PMA) y posterior PCR en tiempo real, para diferenciar los virus infectivos de los no infectivos.

**Métodos:** Para este estudio el bacteriofago T4 fue utilizado, por ser un fago ampliamente estudiado, fácil de cultivar y con un hospedero bien caracterizado. Como métodos de inactivación se empleó calor (85°C y 110°C) y proteólisis, cuyo efecto se analizó a diferentes tiempos. Después de cada tratamiento el porcentaje de virus infectivos fue evaluado por cultivo, qPCR y PMA-PCR.

**Resultados:** Después de los tratamientos de inactivación con calor (85°C) y proteólisis, los resultados indican que el pre-tratamiento con PMA no es apropiado para la diferenciación entre virus infectivos y no infectivos, al menos cuando las condiciones de inactivación analizadas son aplicadas. Sin embargo, cuando la inactivación se produjo empleando una temperatura de 110°C, los resultados indican que el pretratamiento con PMA permite la discriminación entre virus infectivos de aquellos que no son infectivos. En este caso, el enlace efectivo entre el PMA y el DNA de bacteriofago T4 podría indicar que existe o se produjo algún tipo de daño en la cápside de la partícula viral.

**Conclusiones:** En base a los resultados, el pre-tratamiento con PMA puede ser apropiado para evaluar la efectividad de los tratamientos de desinfección; y



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

contribuir a un mejor entendimiento de los factores que contribuyen la inactivación viral mediante el monitoreo de los daños en la cápside. El uso combinado del PMA y PCR en tiempo real podría ser una rápida y económica herramienta para la evaluación de la eficacia de los desinfectantes frente a virus y la posterior selección de desinfectantes.

## ELIMINACIÓN VIRAL DURANTE PROCESOS DE DEPURACIÓN EN ALMEJAS CONTAMINADAS ARTIFICIALMENTE CON VIRUS ENTÉRICOS

Polo, D.<sup>1\*</sup>, Álvarez, C.<sup>2</sup>, Díez, J.<sup>3</sup>, Manso, C.F.<sup>1</sup>, Angulo, M.<sup>4</sup>, Vilariño, M.L.<sup>1</sup>, Darriba, S.<sup>2</sup>, Longa, A.<sup>3</sup>, Romalde, J.L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS-Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Sur Universitario, 15782, Santiago de Compostela.

<sup>2</sup>INTECMAR (Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia). Consellería do Mar. Peirao de Vilaxoan, 36611, Vilagarcía de Arousa.

<sup>3</sup>Consello Regulador Denominación de Orixe Mexillón de Galicia. Avda. de la Marina, 36600, Vilagarcía de Arousa.

<sup>4</sup>TRAGSATEC/INTECMAR, 36611, Vilagarcía de Arousa.

Los controles sanitarios actuales para los moluscos destinados a consumo humano están basados en el recuento de *Escherichia coli* como único indicador de contaminación microbiana (EC 854/2004). Los virus entéricos como el virus de la hepatitis A (HAV) y norovirus presentan grandes diferencias con las bacterias en cuanto a la resistencia a los tratamientos de aguas residuales, transmisión y persistencia tanto en los moluscos como en el medio acuático. Este hecho unido a que los procesos de depuración no eliminan totalmente las partículas virales del molusco demuestra que los indicadores bacterianos son inadecuados para reflejar la presencia de contaminantes virales.

En este estudio se evaluó la eficiencia de la depuración en almejas sometidas a bioacumulación con el virus de la hepatitis A (HAV) y norovirus murino (MNV-1), como modelo de norovirus humano, en un sistema de depuración experimental.

Se realizaron un total de 10 experiencias de bioacumulación, 5 de ellas con HAV y las 5 restantes con MNV-1 como modelo de Norovirus. Tras la contaminación viral durante 24 horas, los moluscos se trasladaron a una depuradora experimental donde se controlaron los parámetros físico-químicos ( $O_2$ , pH,  $T^a$ ,  $NH_3/NH_4$ ,  $NO_2$ ,  $NO_3$ , conductividad y salinidad). Se tomaron muestras para el análisis viral tanto antes de la contaminación como cada 24 horas de depuración durante un total de 7 días. Éste se realizó mediante la disección de los hepatopáncreas que fueron homogenizados con agua de peptona 0,1% pH 7.5. Tras 1 hora de agitación seguida de una centrifugación a 1.000 xg durante 5 minutos, se extrajo el RNA viral mediante el kit comercial NucleoSpin RNA virus (Macherey-Nagel). La cuantificación viral se realizó mediante la técnica de real-time RT-PCR con sondas TaqMan, teniendo en cuenta tanto las eficiencias de extracción y amplificación para no subestimar la carga viral real.

Los resultados mostraron una reducción de la carga viral en las 5 experiencias con HAV, con una tasa de eliminación viral (expresada en Log n° copias RNA/g



hepatopáncreas) que osciló entre 0,64 y 1,48 unidades logarítmicas (log), siendo la reducción media 1,03 log lo que supone una reducción del 90% del número de copias de RNA detectado. Pero, de las 5 experiencias con MNV-1, sólo en 3 de ellas se redujo la carga viral al término de la depuración. En otra de las experiencias se encontraron valores similares tanto en el tiempo inicial como en el final y en la última experiencia se encontró una mayor carga viral al término del proceso depurativo con respecto al tiempo inicial. Teniendo en cuenta sólo las 3 experiencias en las que se redujo la carga viral, ésta osciló entre 0,33 y 0,68 log, siendo la reducción media 0,46 log lo que se corresponde a una reducción del 41,4% en el número de copias detectado. En cambio, si tomamos en cuenta las 5 experiencias, la reducción media estaría cerca de 0, lo que nos indica la falta de reducción de la carga viral durante la depuración.

La dinámica de eliminación viral durante la depuración resultó diferente entre ambos virus, ya que se observó una mayor eficiencia en la eliminación de HAV con respecto a MNV-1. Son necesarios más estudios para determinar las razones de estas diferencias pudiendo ser debidas a las distintas propiedades que presentan ambos virus y a la existencia de ligandos específicos con el molusco. De todas formas, la carga viral que presentan los moluscos al término de la depuración sigue siendo elevada, por lo que los estudios futuros irán enfocados a la mejora de la eficiencia del proceso de depuración.

## CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN *Aeromonas E. tarda* subsp. *salmonicida* MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Rivera, L.<sup>1\*</sup>, Bobo, M.<sup>1</sup>, Lago, E.P.<sup>1</sup>, Nieto, T.P.<sup>1</sup>, Farto, R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Lagoas-Marcosende, 36310, Vigo.

Este trabajo tiene como objetivo la cuantificación de la expresión de genes de virulencia en *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (ASS) mediante PCR a tiempo real (RT-qPCR). Con ello se pretende determinar si la presencia de los genes *asaR* y *asal*, ligados a quórum sensing, no funcionales (por mutación) afectaría a la regulación de la expresión de los genes *ascC* y *ascV* implicados en la virulencia de ASS. En este estudio se utilizó una cepa salvaje, ACRp 43.1, que fue aislada de rodaballo enfermo, cultivado en Galicia y tres cepas mutantes obtenidas a partir de la cepa salvaje, *mAsaR1* y *mAsaR2* (mutantes para el gen *asaR*) y *mAsal* (mutante para el gen *asal*). Para la cuantificación se ha seleccionado el marcador no específico SYBR Green, que detecta todo el ADN de doble cadena producido durante la reacción de amplificación. Por este motivo adquiere especial importancia el proceso de diseño de cebadores, de modo que han de ser altamente específicos, para evitar amplificaciones de productos no deseados. En la etapa de análisis de datos se requiere el uso de genes de referencia (genes constitutivos necesarios para el mantenimiento basal de la función celular: mantenimiento de la homeostasis metabólica y reproducción) para corregir la variación no específica, como las diferencias en la cantidad y calidad del ARN empleado, que pueden afectar a las eficiencias tanto de la transcripción reversa como de la PCR.

Las etapas realizadas han sido: (1) Se diseñaron cebadores específicos para los genes de virulencia *ascC* y *ascV* (que codifican para proteínas del sistema de secreción de tipo III), así como para varios genes de referencia. Para ello se utilizaron dos herramientas de diseño de cebadores. Las distintas parejas de cebadores obtenidas se analizaron empleando la herramienta BLAST. La elección de la pareja de cebadores se ha realizado en base a la mayor especificidad. Para la evaluación de los cebadores diseñados se llevaron a cabo reacciones de amplificación mediante PCR convencional, tanto a partir de cultivo en medio sólido (TSA), como de cultivo en medio líquido (TSB). (2) Extracción de ARN en distintos tiempos de la curva de crecimiento de cultivos líquidos de las cepas, para lo cual se empleó el reactivo TRIzol y se aplicó el protocolo de la casa comercial. Finalmente se determinó la pureza y concentración de las muestras empleando un espectrofotómetro y se seleccionaron las muestras con una pureza adecuada (absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  que oscila entre 1,8 y 2,1). (3) Transcripción reversa, para la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN. (4) PCR en Tiempo Real y análisis de los datos obtenidos.



Los resultados han mostrado que es necesario el empleo de, al menos, dos herramientas de diseño de cebadores, para que se puedan seleccionar los que cumplan el máximo número de criterios de calidad y así se asegure una amplificación positiva y específica. La obtención de ADN molde a partir de cultivo en medio líquido (TSB) proporciona mejores resultados, que si dicho ADN se obtiene a partir de colonias en medio sólido. Se han obtenido amplificaciones positivas con todos los cebadores diseñados, lo que indica que su diseño ha sido correcto, por tanto los genes de referencia seleccionados: *proC*, *rpoC*, *rpoD*, *fabD*, *gmk* y *gyrB* podrían ser útiles para la normalización de los datos obtenidos mediante RT-qPCR. Del conjunto de todos los cebadores que han sido seleccionados, aquellos que han resultado ser específicos para ASS han sido: *proC*, *rpoD*, *fabD* y *gmk*. Las muestras *in vivo* han de analizarse previamente para descartar la presencia de *A. hydrophila* en caso de cuantificar los genes de virulencia *ascC* y *ascV* o los genes de referencia *rpoC* y *gyrB*. Se confirmó mediante la transcripción reversa la expresión positiva de los genes estudiados y se cuantificó mediante RT-qPCR.

## ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE QUANTIFICACIÓN DE *Legionella pneumophila* (CULTIVO, VIABLES, PCR REAL TIME Y PMA PCR)

Saucedo, G.<sup>1</sup>, Terradillos, A.<sup>1</sup>, Codony, F.<sup>2</sup> Huguet, J.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología. Sociedad General de Aguas de Barcelona. Barcelona.

<sup>2</sup>Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona

### Introducción. Objetivos.

Las técnicas de biología molecular (real time PCR) para la cuantificación de *Legionella pneumophila* han supuesto un gran avance para el control de las instalaciones de riesgo determinadas en el RD 865/2003, con el inconveniente de la dificultad para valorar su viabilidad. El objetivo de este proyecto es relacionar los valores obtenidos por métodos de biología molecular y los que determinan viabilidad del microorganismo, así como la cuantificación de viables por real time PCR.

### Métodos.

Cultivo según norma ISO 11731: método de cultivo y aislamiento de *Legionella* basado en la necesidad que tienen la mayoría de cepas del género *Legionella* de crecer en presencia del aminoácido cisteína y sales de hierro, así como de tolerar la presencia de ciertos antibióticos (que inhiben el crecimiento de otros microorganismos presentes en el agua).

Recuento de viables por fluorescencia láser scanning: las bacterias retenidas en un filtro de 0,4 µm de tamaño de poro se tiñen directamente con reactivos (AES Chemunex) que permiten determinar su viabilidad. Concretamente, sólo las bacterias viables que mantienen intacta su membrana celular son capaces de romper enzimáticamente, por la actividad esterasa, un sustrato no fluorescente y retener el producto final fluorescente. Esta fluorescencia se determina a través del escáner de láser o ChemScan®RDI, validando los resultados obtenidos a través del microscopio.

Real time PCR (rtPCR): concentración de las muestras por filtración y extracción de ácidos nucleicos con el uso de MagNa Pure Compact de Roche®. Cuantificación de *Legionella pneumophila* por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, mediante la amplificación de un fragmento de 386 pares de bases del gen 16S rDNA, utilizando el termociclador LightCycler 2.0 de Roche® y cebadores y sondas de Tib Molbiol.

PMA-PCR: la misma reacción de rtPCR descrita anteriormente, previo tratamiento de 0,5 ml de las muestras con 12,5 µl de una solución de PMA (propidium iodide monoazide) al 20% de dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final de PMA es de 50 µM. Se incuban las muestras 5 minutos a temperatura ambiente en



la oscuridad para que el PMA ingrese a las células que tienen su membrana celular comprometida o dañada. Se colocan las muestras en el equipo de fotoactivación de Ingenia Biosystems durante 15 minutos. Durante esta etapa el PMA de una al DNA al que tiene acceso, inhibiendo su amplificación en posteriores ensayos de PCR. Se centrifugan las muestras, se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 200 µl de PBS 1x. La muestra obtenida está lista para la extracción de los ácidos nucleicos y posterior rtPCR.

### Resultados

Se han obtenido buenos índices de correlación entre los valores de las diferentes técnicas ensayadas.

El uso de PMA-PCR permite valorar la disminución de viabilidad de *Legionella pneumophila* sometida a un choque térmico.

Se ha observado una reducción de viabilidad de *Legionella pneumophila* después de un proceso de extracción por sonicación.

### Conclusiones

La PMA-PCR se presenta como una alternativa a la medida de la viabilidad en el ámbito de la biología molecular y nuestros resultados preliminares obtenidos apuntan claramente en esta dirección.

La sonicación conlleva una reducción en la viabilidad de *Legionella pneumophila*.



# **Lista participantes**





**Abad Trueba, Naiara**

Depto. Inmunología, Microbiología y Parasitología  
UPV/EHU  
E-mail: [nabad004@gmail.com](mailto:nabad004@gmail.com)  
Telf. 945142671/ 679183766  
48080 Bilbao

**Agulló Barceló, Míriam**

Depto. Microbiología  
Universitat de Barcelona  
E-mail: [miriam\\_agullo@ub.edu](mailto:miriam_agullo@ub.edu)  
Telf. 934039044                      FAX: 934039047  
Av. Diagonal, 645.  
08028 Barcelona

**Alcaide Moreno, Elena**

Depto. Microbiología y Ecología  
Universidad de Valencia  
E-mail: [elena.alcaide@uv.es](mailto:elena.alcaide@uv.es)  
Telf. 963 543 376                      FAX: 963 544 570  
C/ Dr. Moliner, 50.  
46100 Burjasot, Valencia

**Alonso Sánchez, María del Carmen**

Depto. Microbiología  
Universidad de Málaga  
E-mail: [mdalonso@uma.es](mailto:mdalonso@uma.es)  
Telf. 952137588                      FAX: 952136645  
Facultad de Ciencias.  
29071 Málaga

**Álvarez Torres, Daniel**

Depto. Microbiología  
Universidad de Málaga  
E-mail: [dani-alto@uma.es](mailto:dani-alto@uma.es)  
Telf. 952132364                      FAX: 952136645  
Facultad de Ciencias.  
29071 Málaga

**Avendaño Herrera, Ruben Esteba**

Depto. Ciencias Biológicas  
Universidad Andrés Bello  
E-mail: [reavendano@yahoo.com](mailto:reavendano@yahoo.com)  
Tfno. +56-9-76711566  
Los fresnos 52, Miraflores. Viña del mar. Chile



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

**Balado Dacosta, Miguel**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura.  
E-mail: miguel.balado@usc.es  
Telf. 981 56 31 00 ext. 16062  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Bañeras Vives, Lluís**

Depto. Institut d'Ecologia Aquàtica  
E-MAIL:lluis.banyeras@udg.edu  
Telf. 972418177  
Universitat de Girona  
Facultat de Ciències. Campus de Montilivi s/n.  
17071 Girona

**Barja Pérez, Juan Luís**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
E-mail: mpaetjlb@usc.es  
Telf. 981563100/13255 FAX: 981596904  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Bastardo Espinoza, Asmine**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
Telf. 981563100/13255 FAX: 981596904  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Beaz Hidalgo, Roxana**

Depto. Ciencias Médicas Básicas  
Universidad Rovira i Virgili  
E-mail: roxana.beaz@urv.cat  
Telf. 97 775 93 41 FAX: 977 759322  
C/ Sant Llorenç 21.  
43201 Reus

**Benítez Rodas, Gilberto Antonio**

Depto. Microbiología III  
Universidad Complutense de Madrid  
E-mail: gabenite@bio.ucm.es  
Telf. 913494965 FAX: 913944964  
Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid



**Blanch Gisbert, Anicet**

Depto. Microbiología  
Universitat de Barcelona  
E-mail : ablanch@ub.edu  
Telf. 934029012                      FAX: 934039047  
Av. Diagonal 645. 08028 Barcelona

**Bobo Bermúdez, María**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
E-mail: mariabobobermudez@hotmail.com  
Telf. 616881371                      FAX: 986812556  
As Lagoas, Marcosende. 36310 Vigo

**Borrego García, Juan José**

Depto. Microbiología  
Universidad de Málaga  
E-mail: jjborrego@uma.es  
Telf. 952131893                      FAX: 952136645  
Facultad de Ciencias. 29071 Málaga

**Borrego Moré, Carles**

Grupo de Ecología Microbiana Molecular. Inst. Ecol. Acuática  
Universitat de Girona  
E-mail: carles.borrego@udg.edu  
Telf. 972418177                      FAX: 972418150  
Facultad de Ciencias. Campus de Montilivi. 17071 Girona

**Buján Gómez, Noemí**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
Telf. 981563100/13255      FAX: 981596904  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Carballo Rodríguez, Julia**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
E-mail: carballo@uvigo.es  
Telf. 988387068  
Facultad de Ciencias de Ourense

**Casanovas Massana, Arnau**

Depto. Microbiología  
Universitat de Barcelona



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

E-mail: arnaucasanovas@ub.edu  
Telf. 934039044                      FAX: 934039047  
Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona

**Castro Iglesias, Nuria**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
Telf. 981563100/13255    FAX: 981596904  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Castro López, Dolores**

Depto. Microbiología  
Universidad de Málaga  
E-mail: dcastro@uma.es  
Telf. 952134214                      FAX: 952136645  
Facultad de Ciencias. 29071 Málaga

**Cervero Aragó, Silvia**

Depto. Microbiología  
Universitat de Barcelona  
E-mail: silviacervero@gmail.com  
Telf. 934039043                      FAX: 934039047  
Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona

**Combarro Combarro, María Pilar**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
E-mail: pcombarro@uvigo.es  
Telf. 986812634  
Campus Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo

**Cortés Lorenzo, Carmen**

Depto. Microbiología, Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada  
E-mail: carmencortes@ugr.es  
Telf. 958242980                      FAX: 958243094  
Instituto del Agua, Univ. Granada. Ramón y Cajal, 4. 18071 Granada

**Costas Riveiro, Eugenio**

Área de Microbiología  
Laboratorio Municipal de Vigo  
E-mail: eugenio.costas@vigo.org  
Telf. 986810117/18  
36202 Vigo



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

Depto. Microbiología II  
Universidad Complutense de Madrid  
E-mail: delarosa@farm.ucm.es  
Telf. 913941834                      FAX: 913941745  
Fac. Farmacia. Pza. Ramón y Cajal, s/n. 28040 Madrid

**De las Heras Sánchez, Ana**

Depto. Microbiología Molecular  
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)  
E-mail: aiheras@yahoo.es  
Telf. 91837 3112 -4385    FAX: 91 536 04 32  
C/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid

**Doce Carracedo, Alejandra**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
Telf. 981563100/13255    FAX: 981596904  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Dubert Pérez, Javier**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Esteve Sánchez, Consuelo**

Depto. Microbiología y Ecología  
Universidad de Valencia  
E-mail: estevem@uv.es  
Telf. 963 543 376                      FAX: 963 544 570  
C/ Dr. Moliner, 50 46100 Burjasot, Valencia

**Estévez-Toranzo, Alicia**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
E-mail: alicia.estevez.toranzo@usc.es  
Telf. 981563100/13255    FAX: 981596904  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Farto Seguín, Rosa**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

E-mail: rfarto@uvigo.es  
Telf. 986812398                      FAX: 986812556  
As Lagoas, Marcosende. 36310 Vigo

**Figueras, Antonio**

Instituto de Investigaciones Marinas  
CSIC  
Eduardo Cabello 6. 36208 Vigo

**Figueras Salvat, María José**

Depto. Ciencias Médicas Básicas  
Universidad Rovira i Virgili  
E-mail: mariajose.figueras@urv.cat  
Telf. 977759321                      FAX: 977759322  
Facultad de Medicina, San Lorenzo 21.  
43201 REUS

**Fillol Homs, Mireia**

Grupo de Ecología Microbiana Molecular.  
Inst. Ecol. Acuática  
Universitat de Girona  
E-mail : mireiafh@gmail.com  
Telf. 620695467  
Facultad de Ciencias.  
Campus de Montilivi. 17071 Girona

**Fittipaldi, M**

Universitat Politècnica de Catalunya  
Laboratorio de Microbiología Sanitaria y Mediambiental.  
Violinista Vellsolà, 37, 08222, Terrassa, Barcelona

**Garaizabal Ruiz, Idoia**

Depto. Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Universidad del País Vasco  
E-mail: igaraizabal001@ikasle.ehu.es  
Telf. 946013412                      FAX: 946013500  
Facultad de Ciencia y Tecnología  
Barrio Sarriena s/n 48940 Leioa, Vizcaya

**García Lledó, Arantzazu**

Depto. Biología  
Universitat de Girona  
E-mail: arantzazu.garcia@udg.edu  
Telf. 972418396                      FAX: 972418150  
Campus de Montilivi. 17071 Girona





**Garrido Maestú, Alejandro**

ANFACO-CECOPECA

E-mail: [agarrido@anfaco.es](mailto:agarrido@anfaco.es)

Telf. 986469303 FAX: 986469269

Campus Universitario, Lagoas-Marcosende.  
36310 Vigo

**Gómez López, Esther**

Depto. Biología Funcional

Universidad de Oviedo

E-mail: [uo167556@uniovi.es](mailto:uo167556@uniovi.es)

Telf. 620420477 FAX: 985103148

C/ Julián Clavería, 6. 33006 Oviedo

**Guijarro Atienza, José Agustín**

Depto. Biología Funcional

Universidad de Oviedo

E-mail: [jaga@fa.uniovi.es](mailto:jaga@fa.uniovi.es)

Telf. 985104218 FAX: 985103148

C/ Julián Clavería, 6. 33006 Oviedo

**Iniesto Rodríguez, Miguel**

Depto. Ecología

Universidad Autónoma de Madrid

E-mail: [miguel.iniesto@titulado.uam.es](mailto:miguel.iniesto@titulado.uam.es)

Telf. 914978117

C/ Darwin 2, Edificio de Biología,  
Cantoblanco. 28049 Madrid

**Iriberry Ramalle, Juan**

Depto. Inmunología, Microbiología y Parasitología

Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV-EHU)

E-mail: [juan.iriberri@ehu.es](mailto:juan.iriberri@ehu.es)

Telf. 619126286 FAX: 946013500

Apdo 644, 48080 Bilbao

**Jiménez Valverde, Estefanía**

Depto. Microbiología

Universidad de Málaga

E-mail: [ejv@uma.es](mailto:ejv@uma.es)

Telf. 952132364 FAX: 952136645

Facultad de Ciencias. 29071 Málaga

**Juárez Jiménez, Belén**

Depto. Microbiología Facultad de Farmacia

Universidad de Granada



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

E-mail: belenjj@ugr.es  
Telf. 958242980                      FAX: 958243094  
Instituto del Agua, Univ. Granada. Ramón y Cajal, 4. 18071Granada

**Lago Carrera, Rocío**

Área de Microbiología  
Laboratorio Municipal de Vigo  
E-mail: rocio.lago@vigo.org  
Telf. 986810117/18  
36202 Vigo

**Lago Lorenzo, M<sup>a</sup> del Carmen**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura.  
E-mail: mlago\_l@hotmail.com  
Telf. 627687511  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Larrañaga Saez-Torres, Olalla**

Laboratorio. DTA  
Pescanova  
E-mail: laboratorio.dta@pescanova.es  
Telf. 986818353                      FAX. 986 818293  
C. José Fernandez López s/n. Chapela-Redondela. Pontevedra

**Lemos Ramos, Manuel L.**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura.  
E-mail: manuel.lemos@usc.es  
Telf. 981563100                      FAX: 981547165  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Levican Asenjo, Arturo**

Depto. Ciencias Médicas Básicas  
Universidad Rovira i Virgili  
E-mail: aalevican@gmail.com  
Telf. 97 775 93 41                      FAX: 977759322  
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud  
C/ Sant Llorenç 21, 43201 Reus

**López Diéguez, Ana Belén**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura



Telf. 981563100/13255 FAX: 981596904  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**López Jimena, Benjamín**

E-mail: benjamin.lopez.ext@juntadeandalucia.es  
Telf. 635374897  
IFAPA Centro El Toruño, Junta de Andalucía  
Camino de Tiro de Pichón s/n  
11500 El Puerto de Santa María, Cádiz.

**López Romalde, Jesús**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
E-mail: jesus.romalde@usc.es  
Telf. 981563100/13255 FAX: 981596904  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Lucena Gutiérrez, Francisco**

Depto. de Microbiología  
Universitat de Barcelona  
E-mail: flucena@ub.edu  
Telf. 934021484 FAX: 934110592  
Av. Diagonal, 645.  
08028 Barcelona

**Lucena Reyes, Teresa**

Colección Española de Cultivos Tipo - CECT  
Universidad de Valencia  
E-mail: tlucena@cect.org  
Telf. 963543188  
C/ Dr. Moliner nº 50. 46100 Burjassot, Valencia

**Macián Rovira, M<sup>a</sup> Carmen**

Colección Española de Cultivos Tipo-CECT  
Universidad de Valencia  
E-mail: macianro@cect.org  
Telf. 963543188 FAX: 963543187  
C/ Dr. Moliner nº 50. 46100 Burjassot, Valencia

**Magariños Ferro, Beatriz**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
Telf. 981563100/13255 FAX: 981596904



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Márquez Marcos, M<sup>a</sup> del Carmen**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Sevilla  
E-mail: cmarquez@us.es  
Telf. 954553809                      FAX: 954628162  
C/ Prof. García González, 2 Sevilla

**Martínez Peinado, José**

Depto. Microbiología III  
Universidad Complutense de Madrid  
E-mail: peinado@bio.ucm.es  
Telf. 913944967                      FAX: 913944964  
Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid

**Méndez Sotorrío, María Jessica**

Depto. Biología Funcional  
Universidad de Oviedo  
E-mail: mendezmaria@uniovi.es  
Telf. 669542344                      FAX: 985103148  
C/ Julián Clavería, 6.  
33006 Oviedo

**Míguez Soto, Beatriz**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
E-mail: beamiso@uvigo.es  
Telf. 645208733  
As Lagoas, Marcosende.  
36310 Vigo

**Milton, Debra L.**

Dept. Molecular Biology  
Umeå University  
E-mail: debra.milton@molbiol.umu.se  
Telf. +46907850815

**Mosso Romeo, M<sup>a</sup> Ángeles**

Depto. Microbiología II  
Universidad Complutense de Madrid  
E-mail: a.mossoromeo@farm.ucm.es  
Telf. 913941744                      FAX: 913941745  
Fac. Farmacia. Pza. Ramón y Cajal, s/n.  
28040 Madrid



**Novoa, Beatriz**

Instituto de Investigaciones Marinas  
CSIC  
Eduardo Cabello 6.  
36208 Vigo

**Paredes Aguilar, Katiuska**

Depto. Ciencias Médicas Básicas  
Universidad Rovira i Virgili  
E-mail: k\_paredes@hotmail.com  
Telf. 97 775 93 41      FAX: 977759322  
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud  
C/ Sant Llorenç 21.  
43201 Reus

**Pérez Álvarez, M<sup>a</sup> José**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
E-mail: mjperez@uvigo.es  
Telf. 988387093  
Facultad de Ciencias de Ourense

**Pérez Lago, Estela**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
E-mail: eplago@uvigo.es  
Telf. 619319338      FAX: 986812556  
As Lagoas, Marcosende.  
36310 Vigo

**Pérez Nieto, M<sup>a</sup> Teresa**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
E-mail: mtperez@uvigo.es  
Telf. 619319338      FAX: 986812556  
As Lagoas, Marcosende.  
36310 Vigo

**Pérez Prieto, Sara Isabel**

Depto. Microbiología Molecular  
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)  
E-mail: saraip@cib.csic.es  
Telf. 91-837 31 12 -4385 FAX: 91 536 04 32  
C/ Ramiro de Maeztu 9.  
28040 Madrid



VIII Reunión Microbiología del Medio Acuático  
Sociedad Española de Microbiología  
Vigo, 14-16 septiembre 2010

**Pujalte Domarco, M<sup>a</sup> Jesús**

Depto. Microbiología y Ecología  
Universidad de Valencia  
E-mail: maria.j.pujalte@uv.es  
Telf. 963 543 142            FAX: 963 544 570  
C/ Dr. Moliner, 50 46100 Burjasot, Valencia

**Reboleiro Rivas, Patricia**

Depto. Microbiología Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada  
E-mail: preboleiro@ugr.es  
Telf. 958242980            FAX: 958243094  
Instituto del Agua, Univ. Granada. Ramón y Cajal, 4.  
18071 Granada

**Rivadeneira Ruiz, M<sup>a</sup> Angustias**

Depto. Microbiología Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada  
E-mail: mrivaden@ugr.es  
Telf. 958243874            FAX: 958246235  
Campus de Cartuja, s/n. 18071 Granada

**Rivadeneira Torres, Almudena**

Depto. Microbiología. Ciencias Ambientales  
Universidad de Granada  
E-mail: almutr@correo.ugr.es  
Telf. 650657209            FAX: 958246235  
Campus Fuentenueva s/n.  
18071 Granada

**Rivas Fontenla, Amable José**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura  
E-mail: amablejrf@hotmail.com  
Telf. 981563100/16062    FAX: 981596904  
C. Candeira. Institutos Univ. Campus Vida.  
15706 Santiago de Compostela

**Rivera Fernández, Leticia**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
E-mail: leticia.rivera@uvigo.es  
Telf. 659494752            FAX: 986812556  
As Lagoas, Marcosende. 36310 Vigo



**Rodríguez López, Luis Alfonso**

Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud  
Universidad de Vigo  
E-mail: lalopez@uvigo.es  
Telf. 988387066  
Facultad de Ciencias de Ourense

**Romero Bernárdez, Manuel**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Universidad de Santiago de Compostela  
E-mail: manuel.romero @usc.es  
Telf. 630935619  
Edif. CIBUS 1ª planta, Campus Vida.  
15782 Santiago de Compostela

**Rubiano Saavedra, Mª Eugenia**

Depto. Microbiología  
Universidad de Barcelona  
E-mail: maeuru@hotmail.com  
Telf. 630908988                      FAX: 934039047  
Av. Diagonal, 645.  
08028 Barcelona

**Ruiz Berraquero, Francisco**

Departamento de Microbiología y Parasitología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla  
C/ Prof. García González, 2 Sevilla

**Silva Castro, Gloria Andrea**

Depto. Microbiología Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada  
E-mail: gasilva@correo.ugr.es  
Telf. 958242981                      FAX: 958243094  
Campus de Cartuja, s/n.  
18071 Granada

**Solís Andrés, Inmaculada**

Depto. Microbiología  
IPROMA S.L.  
E-mail: isolis@iproma.com  
Telf. 964251072                      FAX: 964210476  
Apartado 8106.  
12080 Castellón

**Souto Pereira, Sandra**

Depto. Microbiología y Parasitología  
Instituto de Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela  
E-mail: sandra.souto@usc.es  
Telf. 657378224  
C. Candeira. Institutos Univ.  
15706 Santiago de Compostela

**Uad, Imane**

Depto. Microbiología Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada  
E-mail: uimane@ugr.es  
Telf. 958242981  
Campus de Cartuja, s/n.  
18071 Granada

**Uranga Larralde, Ainhoa**

Depto. Inmunología, Microbiología y Parasitología  
UPV/ EHU  
E-mail: ainhoaul87@gmail.com  
Telf. 943640787/652729767  
48940 Leioa, Bizkaia

**Urmeneta Masó, Jordi**

Depto. Microbiología  
Universitat de Barcelona  
E-mail : jurmeneta@ub.edu  
Telf. 934034628                      FAX: 934034629  
Av. Diagonal 645.  
08028 Barcelona

**Vilar Sanz, Ariadna**

Depto. Biología  
Universitat de Girona  
E-mail : ariadna.vilar@udg.edu  
Telf. 972418396                      FAX: 972418150  
Campus de Montilivi.  
17071 Girona



# **Índice de autores**



- Abad, N. 77,79.  
Adrados, B. 159.  
Agulló-Barceló, M 43.  
Agustí, G. 159.  
Alcaide, E. 81, 83.  
Alonso Gutiérrez, J. 87.  
Alonso, M.C. 107, 111, 115.  
Álvarez, B. 99.  
Álvarez, C. 161.  
Álvarez-Torres, D. 107.  
Andrade, L. 135.  
Angulo, M. 161.  
Arahal, D.R. 131, 139.  
Arana, I. 51.  
Atanassova M. 157.  
Avendaño-Herrera, R. 147.  
Ayo, B. 77, 79.  
Balado, M. 141.  
Balaguer, M.D. 75.  
Balboa, S. 97, 127, 147, 151.  
Bandín, I. 113, 117.  
Baña, Z. 77, 79.  
Bañeras, L. 79,75.  
Barcina, I. 51.  
Barja, J.L. 117, 137, 153.  
Bastardo, A. 91, 153.  
Beaz-Hidalgo, R. 123, 143.  
Béjar, J. 107.  
Benítez, G.A. 45.  
Blanch, A.R. 155.  
Bobo, M. 93, 101, 163.  
Borrego, C. 57, 145.  
Borrego, J.J. 97, 107, 111, 115.  
Buján, N. 153.  
Burguera, M. 61.  
Cabado, A.G. 157.  
Calvo, C. 75.  
Cama, J. 59.  
Cano, I. 111.  
Carrillo, W. 109.  
Casanovas-Massana, A. 115.  
Casero Bustos, V. 85.  
Castro, D. 97, 107, 111, 115.  
Castro, N. 95.  
Castro, S. 71, 73.  
Céspedes-Sánchez R. 61.  
Chapela, M.J. 157.  
Chicote, A. 65.  
Codony, F. 159, 165.  
Collado, L. 55.  
Colprim, J. 75.  
Contreras-González, A. 147.  
Cortés-Lorenzo, C. 47, 135.  
Darriba, S. 161.  
De la Rosa, M C. 129.  
De las Heras, A. 109.  
Delgado, A. 65.  
Diéguez, A.L. 97, 127, 153.  
Díez, J. 161.  
Dios, S. 129.  
Doce, A. 127, 151.  
Dopazo, C.P. 113, 117.  
Dubert Pérez, J. 137.  
Esteve, C. 81, 83.  
Farto, R. 93, 101, 163.  
Fenice, M. 135.  
Fernández, J. 147.  
Fernández-Trujillo, M.A. 107.  
Ferreira, M. 157.  
Figueras, A. 87, 119.  
Figueras, M.J. 55, 123, 143.  
Fillol, M. 145.  
Fittipaldi, M. 159.  
Florín, M. 65.  
Garaizabal, I. 51.  
García-Lledó, A. 49.  
García-Rosado, E. 107.  
Garrido, A. 157.  
Gasol, J.M. 87.  
Gich, F. 145.  
Gómez, E. 99.  
González-López, J. 47, 67, 69, 135.  
Guerrero, M.C. 65.  
Guerrero, R. 59.  
Guijarro, J.A. 99, 103.  
Hallin, S. 49.  
Halpern M. 123.  
Huguet, J.M. 43, 165.  
Infante, C. 115.  
Infante, P. 53.  
Iniesto, M. 65.  
Iriberry, J. 77, 79.  
Jiménez, C. 67, 69, 7.  
Jiménez-Valverde, E. 111.  
Jofre, J. 43, 61.  
Juárez-Jiménez, B. 47, 135.  
Labella, A. 97.  
Lago, E.P. 93, 101, 163.



- Lago, J. 157.  
Lago, M. 113.  
Laguna, C. 65.  
Laviad, S. 123.  
Lekunberri, I. 87.  
Lemos, M.L. 105, 141.  
Levicán A 55.  
Llirós, M. 145.  
Longa, A. 161.  
López-Archilla, A.I. 65.  
López-Diéguez, A. 151.  
López-Jimena, B. 115.  
López-Sánchez, I.M. 115.  
Lucena, F. 43, 61.  
Lucena, T. 131, 139.  
Macián, M.C. 131, 139  
Magariños, B. 95, 147.  
Manchado, M. 115.  
Manso, C.F. 161.  
Martín-Ramos, D. 67, 69.  
Martínez-Toledo, M.V. 135.  
Méndez, J. 103.  
Milton, D.L. 39, 93.  
Morató, J. 159.  
Mosso, M.A. 129.  
Navais, R. 103.  
Navarro-García, F. 129.  
Nieto, T.P. 93, 101, 163.  
Noguerola, I. 57.  
Novoa, B. 87, 119.  
Olveira, J. G. 117.  
Orruño, M. 51.  
Ortiz-Delgado, O. 109.  
Osorio, C.R. 105, 141.  
Otero, A. 85.  
Paredes, K. 143.  
Peinado, J.M. 45.  
Peñin, I. 65.  
Peñuela, G. 159.  
Pérez-Pascual, D. 99.  
Pérez-Prieto, S. 109.  
Pino Rodríguez, N. 159.  
Plasencia, A. 145.  
Platero, L. 129.  
Polo, D. 161.  
Prado Plana, S. 137.  
Puentes, B. 105.  
Puig, S. 75.  
Pujalte, M.J. 131, 139.  
Ravelo, C. 91.  
Reboleiro-Rivas, P. 47, 135.  
Recio, I. 109.  
Reimundo, P. 103.  
Rivadeneira, A. 67, 69.  
Rivadeneira, M.A. 67, 69, 71, 73.  
Rivas, A.J. 105.  
Rivera, L. 93, 101, 163.  
Rodelas-González, B. 135.  
Rodríguez Saint-Jean, S. 109.  
Rodríguez, E. 53.  
Rodríguez, I. 119.  
Rodríguez, J.F. 113.  
Rodríguez-Blanco, A. 141.  
Romalde, J.L. 91, 97, 127, 147, 151, 153, 161.  
Romero, A. 119.  
Romero, M. 85.  
Rubiano M.E. 61.  
Ruvira, A. 139.  
Sánchez-Ruiz Jiménez, C. 67, 69, 71, 73.  
Sarasquete, C. 109.  
Saucedo, G. 165.  
Senderovich, Y. 123.  
Sestelo A.B.F. 125, 133.  
Sieiro, C. 125, 133.  
Silóniz, M.I. 45.  
Silva-Castro, G.A. 71, 73.  
Souto, S. 117.  
Teira, E. 87.  
Terradillos, A. 165  
Toranzo, A.E. 91, 95, 147.  
Torrentó, C. 59.  
Trias, R. 49.  
Uad, I. 47, 71, 73.  
Uranga, A. 77, 79.  
Urmeneta, J. 59.  
Vargas, L.P. 45.  
Vieites J.M. 157.  
Vilariño, M.L. 161.  
Vilar-Sanz, A. 49, 75.  
Wrent, P. 45.

## Fe de erratas

Pg. 25: .....*Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*.....

Pg. 27: *Shimia- Nautella- Phaeobacter*

Pg. 29: ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LA PROTEÍNA Mx....  
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Mx.....

Pg. 33: *Bacteroides* spp y *Bifidobacterium* spp.

*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

Pg. 65: la deposición de precipitados minerales como el  $\text{CaCO}_3$

Pg. 67: en el primer párrafo:  $\text{Mg}_3 (\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Mg}_3 (\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Pg. 83: *Edwardsiella tarda*

Pg. 123: *Vibrio cholerae*

Pg. 139: *Shimia- Nautella- Phaeobacter*

Pg. 141: *V. cholerae*;  $4 \times 10^{-4}$ , tasa que aumenta

hasta  $2 \times 10^{-3}$  cuando la conjugación....; \_frecuencias estimadas de  $1 \times 10^{-6}$ .  
(*merACPTR*)

Pg. 163: GENES DE VIRULENCIA EN *Aeromonas salmonicida* subsp.  
*salmonicida* MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Pg. 52: se retira la comunicación

Pg.165: se retira la comunicación

## **Lista de participantes a incluir:**

*Carlos Pereira Dopazo*

Universidad de Santiago de Compostela

Instituto de Acuicultura

E- mail: [carlos.pereira@usc.es](mailto:carlos.pereira@usc.es)

Telef. 881816051

Rua Constantino Candeira s/n.

Campus Sur. Santiago de Compostela

*Bandín Matos, Isabel*

Universidad de Santiago de Compostela

Instituto de Acuicultura

E- mail: [isabel.bandin@usc.es](mailto:isabel.bandin@usc.es)

Telef. 881816087

Rua Constantino Candeira s/n.

Campus Sur. Santiago de Compostela

*Sabela Balboa Mendez*

Depto. Microbiología y Parasitología

Universidad de Santiago de Compostela

E-mail: [sabela.balboa@usc.es](mailto:sabela.balboa@usc.es)

Tfno.: 981563100. Ext. 16910

CIBUS. Facultad de Biología

Campus Sur

15782. Santiago de Compostela

*David Polo Montero*

Depto. Microbiología y Parasitología

Universidad de Santiago de Compostela

E-mail: [david.polo@usc.es](mailto:david.polo@usc.es)

Tfno.: 981563100. Ext. 16910

CIBUS. Facultad de Biología

Campus Sur

15782. Santiago de Compostela



En la última sesión de Avances Metodológicos se incluye la siguiente comunicación:

## **DETECCIÓN DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* MEDIANTE UN BIOSENSOR BASADO EN PARTÍCULAS MAGNÉTICAS INMUNOACTIVADAS.**

Solís, I.<sup>1</sup>, Ballester, S.<sup>1</sup>, Rodríguez, G.<sup>2</sup>, Bedrina, B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IPROMA, S.L. Apartado 8106. 12080 – Castellón. [isolis@iproma.com](mailto:isolis@iproma.com)

<sup>2</sup>BIOTICA, Bioquímica Analítica, S.L. Parque Tecnológico de la Universidad Jaime I. Edificio de Investigación I, 2ª planta. Castellón. [guiller@biotica.es](mailto:guiller@biotica.es)

La detección de *Legionella pneumophila* en muestras ambientales representa un desafío considerable para la salud pública. Este microorganismo coloniza y persiste con éxito notable en los ambientes acuáticos de origen antrópico, desde los que puede ser transmitido a los seres humanos y causa una forma grave de neumonía llamada enfermedad del legionario. Los métodos de cultivo requieren tiempos de incubación largos y los resultados pueden ser subestimados, porque *Legionella pneumophila* puede entrar en un estado viable pero no cultivable. Las técnicas de PCR no discriminan entre bacterias vivas y muertas y los resultados pueden ser sobreestimados debido a la persistencia de ADN en las células después de la muerte. La integridad de superficie de una célula bacteriana es un criterio aceptado para caracterizar formas viables (activas o inactivas), distinguiéndolas de las células dañadas y de superficie comprometida. En este contexto, el desarrollo de biosensores y ensayos rápidos de para la detección de *Legionella pneumophila* basado en microesferas o partículas inmunoactivadas aparece como campo de investigación y desarrollo muy interesante. Estas técnicas pueden ser una buena aproximación para restringir la detección a las células viables, especialmente cuando por ejemplo, pueden acoplarse a la monitorización de una actividad enzimática. Sin embargo, uno de los obstáculos de las técnicas que emplean el formato de *immunosensing*, es que la detección depende de la capacidad para interactuar con las células sueltas, *single cell*.

En el presente estudio se utilizan muestras de aguas procedentes de torres de refrigeración y muestras de aguas potables naturales contaminadas artificialmente. Después de su filtración y concentración se someten al kit de detección y se comparan los resultados obtenidos frente a la detección por cultivo. Mediante la utilización de muestras contaminadas artificialmente identificamos la agregación bacteriana inducida por cultivo así como la concentración de actividades enzimáticas endógenas, como parámetros que pueden ser críticos a lo largo de los diferentes pasos de detección de *Legionella pneumophila* mediante la utilización de partículas inmunoactivadas.

Con los datos obtenidos proponemos la incorporación de técnicas inmunomagnéticas en estrategias de análisis, vigilancia y prevención de microorganismos patógenos en muestras ambientales. Esta tecnología permite un análisis microbiológico rápido que posibilita un enfoque pre-infectivo ya que permite determinar el nivel de la bacteria en 50 minutos aproximadamente.

## ESTUDIO POLIFÁSICO DE UN GRUPO DE BACILOS GRAM POSITIVOS, AISLADOS DE DIFERENTES LAGOS SALINOS Y ALCALINOS

Márquez, M.C., Carrasco, I.J., de la Haba, R.R., Ventosa, A.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 41012, Sevilla.

Los ambientes acuáticos hipersalinos constituyen un tipo de ambiente extremo caracterizado por presentar concentraciones de sales muy superiores a las encontradas en el agua de mar. Además del alto contenido en iones, algunos ambientes hipersalinos están sometidos a valores de pH muy elevados. Estos ambientes salinos y alcalinos representan ecosistemas muy bio-productivos que están bastante extendidos por todo el mundo, principalmente en zonas calientes y secas. En estos ambientes predominan los microorganismos haloalcalófilos, los cuales han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico, debido a su capacidad para producir compuestos de enorme interés industrial, como enzimas o solutos compatibles, entre otros compuestos.

En este trabajo hemos realizado un estudio polifásico de un grupo de ocho bacilos Gram positivos haloalcalófilos aislados de tres lagos salinos y alcalinos localizados en el continente africano (Tanzania y Kenia) y asiático (China).

Para determinar su posición filogenética, se procedió a la amplificación y posterior secuenciación del gen ARNr 16S. La comparación de las secuencias obtenidas con otras secuencias disponibles en las bases de datos mostró que todas las aisladas forman un grupo filogenético coherente dentro de la familia *Bacillaceae*, con valores de semejanza entre 97,7 y 99,8%. Además, las secuencias del gen ARNr 16S de las ocho cepas aisladas mostraron porcentajes de semejanza iguales o inferiores a 93,8% con respecto a especies del género *Bacillus*, siendo *B. agaradhaerens* DSM 8791<sup>T</sup> la especie más cercana desde el punto de vista filogenético. El estudio del tipo de mureína de la pared celular se realizó a partir de células completas utilizando la metodología descrita por Stanek y Roberts (1974). Todas las cepas estudiadas poseen ácido meso-diaminopimélico como componente de la mureína de su pared celular, al igual que ocurre en otros bacilos Gram positivos formadores de endosporas. La composición de los ácidos grasos se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases en el Servicio de identificación de la Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMG) del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Gante (Bélgica). Los ácidos grasos mayoritarios de las cepas estudiadas son anteiso-C15:0, iso-C15:0 y anteiso-C17:0. Esta composición es muy parecida a la obtenida en este mismo estudio para *B. agaradhaerens* DSM 8791<sup>T</sup>. Respecto al contenido en G+C del ADN de las cepas aisladas, éste osciló entre 42.0 y 43.4 moles%, valores superiores al descrito para *B. agaradhaerens* DSM 8791<sup>T</sup> (39.5 mol%) (Nielsen y col., 1995). Por otro lado y siguiendo los estándares mínimos requeridos para la descripción de nuevos taxones dentro de la familia *Bacillaceae*, se ha realizado un estudio fenotípico de todas las aisladas y de la cepa tipo de *B. agaradhaerens*. Los resultados obtenidos muestran diferencias fenotípicas significativas que permiten distinguir nuestras cepas de *B. agaradhaerens*. Los estudios de hibridación ADN-ADN han confirmado que todas las cepas aisladas constituyen una única genespecie, con valores que oscilan entre 85 y 100%. En base a los resultados obtenidos hasta el momento, las cepas estudiadas en este trabajo podrían constituir un nuevo taxón dentro de la familia *Bacillaceae*.





A scenic view of a bay with many sailboats and a forested hillside. The water is a clear, light blue, and the sky is a pale, hazy blue. The hillside is covered in dense green trees. In the foreground, the water is slightly darker blue. The overall atmosphere is peaceful and serene.

 *Frinsa*