

CONTROL BIOLÓGICO DE OÍDIO DE CUCURBITÁCEAS MEDIANTE BACTERIAS INDUCTORAS DE RESISTENCIA SISTÉMICA. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INDUCIDAS EN LA PLANTA Y DETERMINANTES BACTERIANOS IMPLICADOS

Autor: Laura García Gutiérrez.

Director: Alejandro Pérez García.

Centro: Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga.

La principal enfermedad de origen fúngico que afecta al cultivo de cucurbitáceas es el oídio causado por *Podosphaera fusca*. El 70% de las hectáreas de cultivo dedicadas a melón en España se desarrollan al aire libre, lo que representa una seria limitación para muchos de los agentes de control biológico actualmente diseñados frente a esta enfermedad. Para superar este inconveniente, en este trabajo nos hemos planteado la selección de bacterias que aplicadas a las raíces de plantas de melón sean capaces de promover su crecimiento (PGPR) y proporcionar un control de la enfermedad mediante la activación de los mecanismos de defensa de la planta asociados a la resistencia sistémica inducida (ISR).

Para realizar este estudio partimos de una colección de cepas de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. y evaluamos su potencial como bacterias PGPR mediante el análisis de distintas características fenotípicas asociadas a estas bacterias. Este análisis nos permitió seleccionar dos cepas de *Bacillus subtilis*, UMAF6639 y UMAF6614, una de *Bacillus cereus*, UMAF8564, y dos cepas de *Pseudomonas fluorescens*, UMAF6031 y UMAF6033. Estas cepas seleccionadas resultaron ser promotoras de crecimiento en melón, incrementando el peso fresco en un 30%, e inductoras de resistencia sistémica frente a oídio de cucurbitáceas, proporcionando reducciones de severidad de hasta el 50%. La aplicación conjunta de *B. subtilis* UMAF6639 y *B. cereus* UMAF8564 proporcionó reducciones de enfermedad mayores a las obtenidas por cada cepa de forma independiente. Además, las cepas de *B. subtilis* UMAF6639 y *B. cereus* UMAF8564 eran capaces de inducir resistencia sistémica en melón frente a *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* sin embargo, las cepas de *P. fluorescens* UMAF6031 y UMAF6033 no provocaron ningún efecto en las defensas de las plantas de melón frente a este patógeno.

El estudio de la expresión de varios genes marcadores de defensa como *LOX2* (lipoxigenasa), *PR-1* y *PR-9* (peroxidasa) mediante RT-qPCR nos indicó que la inducción de defensas activadas por las cepas de *Bacillus subtilis* UMAF6639 y *Bacillus cereus* UMAF8564 en melón eran dependientes de JA, ya que las plantas bacterizadas con estas cepas presentaban una mayor expresión de *LOX2* respecto a las plantas control. Además *B. subtilis* UMAF6639 y *B. cereus* UMAF8564 activaban la expresión de *PR9* y *PR1*, indicando que el SA también estaba implicado en la activación de las defensas frente a esta enfermedad. Sin embargo, la activación de las defensas en plantas de melón bacterizadas con *P. fluorescens* UMAF6031 frente a *P. fusca* no eran dependientes de JA y SA.

A partir de este momento seleccionamos la cepa de *B. subtilis* UMAF6639 para profundizar en el estudio de las rutas de señalización inducidas y los determinantes bacterianos implicados en la activación de la ISR. Para ello, se realizaron ensayos de ISR en mutantes de *Arabidopsis thaliana* defectivos en la biosíntesis y percepción de las hormonas JA, ET y SA. Estos ensayos nos indicaron que *B. subtilis* UMAF6639 activaba defensas en *A. thaliana* frente a oídio dependientes de ET y SA, pero a diferencia de melón no eran dependientes de JA. Además, las hojas de plantas tratadas con *B. subtilis* UMAF6639 presentaban una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y de reforzamientos de paredes

celulares (depósitos de calosa y lignina) respecto a plantas no inducidas. En este trabajo, estudiamos también la implicación de los lipopéptidos como determinantes bacterianos implicados en la inducción de defensas en melón. Para ello, utilizamos mutantes defectivos en la producción de los tres lipopéptidos producidos por *B. subtilis* UMAF6639, fengicina, iturina y surfactina. Estos ensayos nos indicaron que la surfactina está implicada en la inducción de resistencia en melón frente a oídio.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE UN SUELO AGRÍCOLA MEDITERRÁNEO TRAS LA APLICACIÓN DE LODOS DE DEPURADORA URBANA

Autor: Clarissa Gondim Porto.

Director: Federico Navarro García.

Centro: Dpto. Microbiología II, Facultad de Farmacia, Univ. Complutense de Madrid.

Los lodos de depuradora son los residuos sólidos obtenidos del tratamiento de las aguas residuales. Para el reciclaje de estos productos, el II Plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR 2007-2015) exige que se lleve a cabo un tratamiento previo para concentrar la fase sólida y eliminar posibles agentes patógenos. En España, el 65% del total de estos lodos es utilizado como enmienda agrícola, aunque su uso puede entrañar posibles riesgos para el ser humano y el medio ambiente que no han sido suficientemente evaluados. Por esa razón, hemos analizado su efecto en la microbiología de un suelo agrícola mediterráneo utilizando distintas dosis (40, 80 y 160 t ha⁻¹) y tipos (anaerobio y aerobio) mediante técnicas dependientes de cultivo y moleculares. Desde el punto de vista sanitario, nuestros resultados muestran que las dosis bajas e intermedias producen un incremento transitorio del número de bacterias patógenas y de resistentes a ampicilina que disminuye hasta niveles similares a los del suelo control o desaparecen al cabo de dos años. Por el contrario, las dosis altas provocan que los valores de esos microorganismos sean superiores a los del suelo control hasta el final del experimento. Desde el punto de vista ambiental, se produce un fenómeno peculiar en el que a pesar de que el número de microorganismos copiotróficos y heterotróficos aumenta en los suelos enmendados con las dosis más altas de lodos, su respiración y biomasa disminuye. En cambio, los suelos enmendados con dosis bajas e intermedias presentan mayores tasas de respiración con el consiguiente incremento en la emisión de CO₂, gas que produce el efecto invernadero e influye en el llamado cambio climático. Por otro lado, se produce una gran modificación de las poblaciones bacterianas que componen el suelo agrícola tras la adición de lodos que ha podido ser medida mediante técnicas moleculares. Así, los filos bacterianos más afectados corresponden a *Acidobacteria* y *Proteobacteria*, que junto a *Actinobacteria* son los más abundantes en el suelo control. El incremento de bacterias de la clase *Gammaproteobacteria* junto con la disminución de la proporción de las de la clase *Gp6* del filo *Acidobacteria*, constituyen los principales marcadores de la alteración del suelo por la adición de lodos de depuradora a largo plazo. A corto plazo se ha encontrado un incremento de la presencia de diversas bacterias del filo *Firmicutes* (*Bacilli*) que puede ser utilizado como indicador de una contaminación reciente. En las muestras tratadas con dosis bajas e intermedias las principales modificaciones se detectan en los primeros muestreos y van desapareciendo gradualmente hasta asemejarse a la del suelo control dos años después de la aplicación, fenómeno que no sucede en las parcelas con mayores dosis (sobre todo ANAE160). Podemos

concluir, por tanto, que la aplicación de lodos de depuradora en suelos agrícolas precisa todavía de ser evaluada en profundidad puesto que se producen importantes alteraciones sanitarias y ambientales que pueden influir negativamente en la salud del ser humano e influir en el cambio climático.

UNRAVELING THE BIOLOGY AND CONTROL OF BACTERIAL APICAL NECROSIS (BAN) OF MANGO

Autor: José Antonio Gutiérrez Barranquero.

Directores: Antonio de Vicente Moreno y Francisco Manuel Cazorla López.

Centro: Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga.

Pseudomonas syringae es una especie bacteriana que causa enfermedades en gran número de plantas, tanto herbáceas como leñosas, siendo muchas de ellas, importantes desde el punto de vista ornamental y agrícola, y por lo tanto, económico. La principal enfermedad que afecta al cultivo del mango en el área mediterránea (España, Portugal, Italia e Israel y también presente en otros países como Australia y Estados Unidos) es la necrosis apical del mango (NAM) producida por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Con el fin de aportar nuevos datos que ayuden a mejorar la situación del cultivo del mango en el área mediterránea, esta Tesis Doctoral se ha centrado en descifrar la biología y el control de la necrosis apical del mango, así como la descripción de etiologías alternativas. En primer lugar se llevó a cabo el estudio de tratamientos experimentales alternativos al caldo bordelés (compuesto cúprico y principal tratamiento frente a la NAM) compatibles con la agricultura ecológica y con un modo de acción similar para comprobar su eficacia frente a la necrosis apical del mango. Los resultados presentados en este trabajo indicaron que el gel de silicio es un tratamiento eficaz y respetuoso con el medio ambiente para el control de la NAM en cultivos de mango, y que es equivalente en eficacia al caldo bordelés. En segundo lugar, se llevó a cabo un estudio epidemiológico (basado en técnicas diversidad genética y fenotípica) de cepas de *P. syringae* pv. *syringae* aisladas de mango de las principales zonas productoras a nivel mundial, pero principalmente del sur de España. Los resultados obtenidos mostraron que la diversidad de las poblaciones de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* patógenas de mango constituían un grupo único y que a su vez eran dependientes del lugar de aislamiento. El análisis filogenético usando genes de housekeeping, reveló un filotipo diferenciado patovar *syringae* caracterizado principalmente por la producción de mangotoxina y la asociación al hospedador. En tercer lugar, la secuenciación de plásmidos nativos de cepas de *Pseudomonas syringae*, reveló la presencia de un plásmido nativo conservado de 61,6 Kb en 2 cepas patógenas de *P. syringae* pv. *syringae* aisladas de diferentes hospedadores y en diferentes continentes. Este plásmido se caracteriza por la presencia de una novedosa estructura, donde el gen *copG* y los genes *czcCBA* se encuentran insertados en el operón *copABCD*, involucrado en la resistencia a cobre. El análisis de la secuencia de los genes *czc* del plásmido (pCzc) ha revelado que estos genes eran diferentes en homología e identidad a los genes *czc* cromosómicos (crCzc) anotados en los genomas de otras cepas *P. syringae* pv. *syringae* previamente secuenciadas. El análisis filogenético llevado a cabo usando los genes de housekeeping (*gyrB* y *rpoD*) y usando los genes *czc* (crCzc y pCzc) reveló una distribución filogenética diferente de los genes pCzc en comparación con la historia evolutiva natural de *P. syringae* pv. *syringae*. Mediante el análisis de la concentración

mínima inhibitoria, ensayos de transformación y qRT-PCR, se confirmó el papel de los genes *copG* y *czcCBA* en el incremento de la resistencia a cobre. Por último, se ha descrito una nueva etiología de la necrosis apical del mango producida por cepas patógenas de *Pantoea agglomerans* en las Islas Canarias. El análisis genético llevado a cabo sobre estas cepas de *P. agglomerans* reveló que las mismas formaban un grupo filogenéticamente relacionado que aparecía diferenciado de otras cepas de *P. agglomerans* patógenas descritas en otros hospedadores.

USO DE LEVADURAS SELECCIONADAS OSMOTOLERANTES, LIBRES Y COINMOVILIZADAS, PARA LA PRODUCCIÓN DE VINOS DULCES

Autor: María Teresa García Martínez.

Directores: Juan Carlos García Mauricio y Rafael Peinado Amores.

Centro: Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba.

Algunos vinos dulces se obtienen por fermentación parcial de mostos con elevada concentración de azúcar. Esta elevada concentración de azúcar causa numerosos problemas: difícil arranque de fermentación, paradas prematuras, elevado riesgo de contaminación microbiana. En Andalucía, la mayoría de los vinos dulces se elaboran añadiendo alcohol vínico al mosto, sin fermentación. Estos vinos poseen aromas de pasificación pero carecen de aromas fermentativos. Este trabajo plantea la utilización de levaduras osmotolerantes y la aplicación de un nuevo sistema de inmovilización celular efectivo con estas levaduras. Esta técnica de inmovilización consiste en inducir una co-inmovilización espontánea entre un hongo filamentoso GRAS, *Penicillium chrysogenum* H3 y una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Bajo condiciones especiales, se favorece una simbiosis obteniéndose unas esferas que hemos denominado «biocápsulas de levaduras». Se han aislado y seleccionado cepas de *S. cerevisiae* osmoetanoltolerantes y se han realizado estudios microscópicos, proteómicos y metabólicos con levaduras libres y coinmovilizadas. Los resultados obtenidos revelan que los vinos dulces parcialmente fermentados mediante la aplicación de biocápsulas de levadura presentan una relación de compuestos volátiles cualitativa y cuantitativamente mayor con respecto a los vinos elaborados de forma tradicional, ello influye positivamente en las características organolépticas y supondría una mejora tecnológica innovadora en procesos fermentativos frente a la utilización de levaduras en forma libre.

ORGANIC AMENDMENTS IN AVOCADO CROP: INFLUENCE ON SOIL MICROBIOTA AND IMPLICATIONS FOR THE SUPPRESSION OF ROSELLINIA NECATRIX

Autor: Nuria Bonilla Ruiz.

Directores: Antonio de Vicente Moreno y Francisco M. Cazorla López.

Centro: Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM, UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga.

La aplicación de enmiendas orgánicas es una práctica agrícola muy extendida en el cultivo ecológico del aguacate. En esta tesis doctoral se ha estudiado el efecto de diversas enmiendas

orgánicas sobre la microbiota del suelo de cultivo de aguacate y cómo estas enmiendas pueden modificar el crecimiento y el estado fitosanitario de este cultivo. El estudio de diversas fincas de aguacate indicó que el tipo de suelo o la historia de cada finca es un factor determinante de la composición de la microbiota del suelo. La utilización de fincas experimentales reveló además un efecto directo de las enmiendas en el suelo. Los métodos dependientes de cultivo permitieron identificar a las enmiendas con efectos más evidentes, principalmente el compost comercial de origen animal. Sin embargo la técnica independiente de cultivo PCR-DGGE fue la más resolutoria ya que permitió determinar que todas las enmiendas incluidas en el estudio afectan a la composición de la microbiota en la capa superficial del suelo.

Se realizaron ensayos de invernadero con inoculaciones artificiales del hongo *Rosellinia necatrix*, causante de la podredumbre blanca radicular del aguacate. Todas las enmiendas orgánicas redujeron los síntomas de podredumbre blanca. La cáscara de almendra y los restos de jardinería, previamente compostados, mostraron el efecto más evidente. Además algunas enmiendas favorecieron el crecimiento de las plantas de aguacate. Los suelos modificados se analizaron y compararon en base a sus características físico-químicas, microbiológicas y enzimáticas. Varios de los tratamientos mostraron mayores niveles poblacionales que el control, en suelo y rizosfera, de bacterias heterótrofas, pseudomonas, bacterias aerobias esporuladas y actinomicetes, especialmente en los que contenían gallinaza o restos de jardinería compostados. Los perfiles de PCR-DGGE mostraron variaciones tanto en la complejidad como en la composición de las comunidades bacterianas de suelo y rizosfera dependiendo del tratamiento. Sin embargo, cambios más pronunciados en los niveles poblacionales, la diversidad o la composición de la microbiota no se relacionaron directamente con un mayor efecto supresivo. Los cambios fisiológicos revelados mediante Biolog Ecoplates™ fueron evidentes incluso para los tratamientos que mostraron mínimas diferencias con el control en el análisis estructural realizado por PCR-DGGE. Las enmiendas orgánicas produjeron además una estimulación general de la actividad hidrolítica en los suelos. Algunas de las enzimas afectadas están relacionadas con la degradación de quitina y por lo tanto podrían estar particularmente implicadas en la capacidad de estos suelos para controlar al hongo *R. necatrix*.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que el efecto supresivo de las enmiendas no está relacionado con cambios masivos en las comunidades microbianas de los suelos, y que es más probable que el efecto se deba a cambios puntuales en poblaciones microbianas clave o bien en las actividades enzimáticas llevadas a cabo por la comunidad microbiana.

líquidos (biorreactores), condiciones en las cuales no hay esporulación y se asumía que no había diferenciación. En esta tesis hemos analizado el desarrollo de esta bacteria en cultivos líquidos demostrando la existencia de un proceso de diferenciación en el que un micelio joven completamente compartimentalizado (MI) sufre procesos de muerte celular programada y se diferencia a un micelio multinucleado (MII), que es el productor de metabolitos secundarios. También hemos demostrado la aplicación biotecnológica de este ciclo de desarrollo en cuanto a la monitorización y optimización los procesos de producción de antibióticos.

Mediante biología de sistemas (proteómica y transcriptómica), hemos caracterizado las fases de MI, MII, demostrando que los proteomas y transcriptomas de estas fases en cultivos líquidos son comparables a los de cultivos sólidos. También hemos analizado la fase de MCP, demostrando que se trata de un proceso de competencia esencial para la diferenciación de la fase reproductiva productora de antibióticos y esporas (MII).

BIODIVERSIDAD BACTERIANA MARINA: NUEVOS TAXONES CULTIVABLES

Autor: Teresa Lucena Reyes.

Directores: David R. Arahal, María J. Pujalte y M. Carmen Macián.

Centros: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia.

En esta Tesis Doctoral se presenta un estudio sobre la diversidad cultivable del ambiente marino empleando técnicas de cultivo tradicionales e identificación mediante secuencia parcial (aproximadamente 1000 bases) del gen ribosomal de la subunidad menor de aislados bacterianos quimioheterótrofos obtenidos a partir de agua del Mar Mediterráneo y ostra cultivada.

Dado el enfoque taxonómico del estudio, las cepas consideradas de interés han sido aquellas cuya secuencia del gen 16S rRNA presentaban una semejanza menor del 98,0% con las de las cepas tipo de las especies más cercanas. Las bacterias marinas seleccionadas por su novedad taxonómica se han sometido a una caracterización polifásica para su descripción y propuesta como nuevos taxones (géneros y especies). La caracterización fenotípica se ha realizado mediante determinación del perfil de actividades enzimáticas y metabólicas, caracteres fisiológicos (rangos de temperatura y salinidad, requerimientos iónicos específicos, relaciones con el oxígeno), caracteres nutricionales (fuentes de carbono, nitrógeno y energía, requerimiento de factores de crecimiento), caracteres morfológicos celulares y coloniales, movilidad (mediante microscopía óptica y electrónica), pigmentos, etc. Se ha complementado mediante sistemas multiprueba (galerías API y Biolog) y con el análisis de proteínas por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) con el fin de permitir una rápida diferenciación de los taxones. Además, se ha realizado la caracterización quimiotaxonómica, que incluye el perfil de ácidos grasos celulares (determinación por cromatografía de gases mediante el sistema MIDI), la composición de lípidos polares mayoritarios mediante cromatografía en capa fina (TLC) y el contenido en quinonas isoprenoides por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La caracterización genotípica ha incluido la determinación del contenido en bases guanina y citosina (G+C) del DNA. Además, se ha completado la secuencia del gen 16S rRNA (>1400 nucleótidos). Con las secuencias obtenidas se han elaborado los estudios filogenéticos basados en la comparación con las secuencias génicas de las especies tipo y representativas de los géneros más

CARACTERIZACIÓN MEDIANTE BIOLOGÍA DE SISTEMAS DEL CICLO DE DESARROLLO DE STREPTOMYCES Y SUS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Autor: Paula Yagüe Menéndez.

Directores: Prof. Jesús Sánchez Martín y Dr. Ángel Manteca Fernández

Centro: Dpto. Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo

Streptomyces es una bacteria micelial que produce aproximadamente dos tercios de los antibióticos de interés en biomedicina. Tiene un ciclo de desarrollo complejo, que en cultivos sólidos incluye procesos de muerte celular programada (MCP) y esporulación. La mayoría de las fermentaciones industriales se realizan en cultivos

cercanos, permitiendo la reconstrucción filogenética empleando los algoritmos NJ, MP y ML disponibles en el paquete informático ARB. En algunos casos y con el fin de profundizar y resolver mejor las relaciones filogenéticas, se han analizado otros genes esenciales o «housekeeping» (*gyrB*, *recA*, *pyrH*, etc...) tanto de forma individual como concatenados. Cuando la secuencia del gen 16S rRNA no bastaba para delimitar especies, se ha determinado el valor ANI (identidad nucleotídica media). Esta es una técnica de reciente aplicación en taxonomía bacteriana para la comparación de parejas de genomas, y que da la identidad de secuencia promedio que muestran todos los genes ortólogos compartidos.

Este estudio ha permitido identificar a las proteobacterias como las bacterias quimioheterótrofas cultivables más abundantes en el agua de mar del Mediterráneo y confirmar la dominancia del género *Vibrio*, mientras que las bacterias pertenecientes a otros filos son de más difícil recuperación. La selección de las cepas de interés taxonómico y la caracterización taxonómica de éstas ha permitido reconocer siete nuevos taxones dentro de la clase Alphaproteobacteria y la descripción formal de dos nuevos géneros (*Actibacterium* y *Phaeomarinomonas*) y cinco nuevas especies (*Actibacterium mucosum*, *Phaeomarinomonas mediterranea*, *Phaeomarinomonas litorea*, *Roseovarius litoralis* y *Tropicibacter multivorans*). Del mismo modo, se han reconocido y descrito cuatro nuevas especies dentro de la clase Gammaproteobacteria, *Haliea mediterranea*, *Photobacterium aphoticum*, *Vibrio aestivus* y *Vibrio quintilis*. Además, se ha descrito un nuevo género y dos nuevas especies pertenecientes al filo Bacteroidetes, *Euzebyella saccharophila*, género nuevo con una sola especie, y *Marinifilum flexuosus*. El análisis comparativo genómico, utilizando parámetros no dependientes de anotación (ANIb, ANIm y TETRA) sobre datos de secuenciación masiva al azar, ha permitido delimitar especies de acuerdo con los umbrales propuestos, de modo satisfactorio.

Este estudio ha puesto de manifiesto la existencia de taxones no descritos entre las poblaciones bacterianas fácilmente cultivables y procedentes de nuestro entorno inmediato.

ANÁLISIS GENÉTICO Y FUNCIONAL DE GENES ESPECÍFICOS PARA PRODUCCIÓN DE MANGOTOXINA

Autor: Víctor José Carrión Bravo.

Directores: Antonio de Vicente Moreno, Francisco Manuel Cazorla López y Eva María Arrebola Díez.

Centro: Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea «La Mayora» (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga.

Pseudomonas syringae es una bacteria fitopatógena capaz de producir diferentes factores de virulencia, entre los que podemos destacar las fitotoxinas. Este trabajo se centra en el estudio de una toxina antimetabolito descrita por nuestro grupo de investigación y a la cual denominamos mangotoxina. Dicha toxina es producida principalmente por cepas de *P. syringae* pv. *syringae*, aisladas de mango. Estudios previos han mostrado que la mangotoxina es un pequeño oligopéptido que inhibe a la enzima ornitina N-acetil transferasa, paso clave en la ruta de biosíntesis de ornitina y arginina.

Con el objetivo de identificar los genes implicados en la producción de mangotoxina, en trabajos anteriores de nuestro grupo, se realizó una mutagénesis al azar usando el transposón *miniTn5*, obteniéndose una serie de mutantes defectivos en la producción de mangotoxina. El análisis de los genes interrumpidos puso de manifiesto la participación de un grupo de genes, posteriormente denominado operón *mgo*, y que incluye, entre otros genes, el gen *mgoA* que codifica una posible NRPS. El operón *mgo*, y concretamente el gen *mgoA*, participan en la producción de man-

gotoxina y contribuyen a la virulencia de las cepas productoras, tal y como ya ha sido descrito por nuestro grupo. El estudio de otros mutantes defectivos en la producción de mangotoxina nos permitió la identificación de los genes implicados en la biosíntesis de mangotoxina en nuestra cepa modelo UMAF0158. Estos genes se encuentran en una región cromosómica que no está presente en cepas de *P. syringae* secuenciadas y caracterizadas como no productoras de mangotoxina. Mediante un análisis más detallado de esta región, se determinó que presentaba una organización en forma de operón formado por seis genes, y denominado «*mbo*» procedente de las siglas de *mangotoxin biosynthetic operon*. Para determinar la funcionalidad del operón *mbo*, éste fue clonado incluyendo los seis genes, el promotor y el terminador, y posteriormente transformado en varias cepas del género *Pseudomonas* no productoras de mangotoxina. El resultado fue que todas ellas ganaron la capacidad de producir mangotoxina, confirmando la funcionalidad de este operón y que contiene toda la información genética específica necesaria para la biosíntesis de mangotoxina. Por lo tanto, esta región cromosómica ha sido descrita en este trabajo como directamente implicada en la biosíntesis de mangotoxina de forma específica y esencial.

Debido al carácter específico y esencial de este operón para la producción de mangotoxina, se ha desarrollado un sistema de detección del operón *mbo* basado en técnicas moleculares de PCR, el cual se ha contrastado con el análisis fenotípico de la producción de mangotoxina en un grupo de 93 cepas pertenecientes a *P. syringae*. Los cebadores seleccionados amplificaban 692 pb del operón *mbo* en las cepas productoras de mangotoxina. Esta técnica nos ha permitido desarrollar un método fácil y rápido de detección del operón *mbo* y por tanto, cepas productoras o potencialmente productoras de mangotoxina. Por otro lado, en este trabajo se han realizado análisis filogenéticos basados en las secuencias de genes *housekeeping*, para intentar resolver la historia evolutiva del operón *mbo* y precisar la relación filogenética entre las cepas usadas en este estudio. El resultado de este análisis sugiere que el operón *mbo* ha sido adquirido una sola vez a lo largo de la evolución por un ancestro común de los patovares *aptata*, *avellanae*, *japonica*, *pisi* y *syringae* pertenecientes a la genomoespecies 1.

Finalmente, con el fin de profundizar en los aspectos genéticos de la producción de mangotoxina, se realizó un estudio de la regulación de la producción de dicha toxina. Para ello, se llevó a cabo un análisis transcripcional de la cepa silvestre y de los mutantes en *gacA* y *mgoA*, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR). Se realizó una cuantificación de la expresión relativa de genes de los operones *mbo* y *mgo*, *gacS/gacA*. Ambos mutantes, tanto en *gacA* como en *mgoA*, mostraron una disminución de los niveles de expresión relativa, o lo que es lo mismo, una disminución de la transcripción de los genes *mbo*. Además, se detectó una menor expresión relativa de los genes *mgo* en el mutante en *gacA*. Posteriormente se llevaron a cabo experimentos de sobreexpresión de los operones *mgo* y *mbo* en los diferentes mutantes del sistema *gacS/gacA* y en la cepa silvestre. Los resultados mostraron que la sobreexpresión del operón *mgo* en los mutantes *gacS/gacA* no restauró la producción de mangotoxina. Este resultado indica que la ruta de regulación no es lineal, sino que existen ramificaciones con intermediarios entre ambos sistemas reguladores. Para intentar determinar el papel del operón *mgo* en la producción de mangotoxina y si presenta alguna acción directa en el operón *mbo*, se llevaron a cabo experimentos de expresión de β -galactosidasa usando una construcción del promotor del operón *mbo* en el mutante en *mgoA*. Los resultados mostraron que el promotor del operón *mbo* no fue capaz de alcanzar los niveles de actividad β -galactosidasa de la cepa silvestre en el mutante en *mgoA*, por lo tanto estos resultados parecen indicar que alguno de sus productos ejerce una función activadora del operón *mbo*. El análisis en conjunto de todos los resultados obtenidos, nos

ha permitido establecer un modelo simplificado y provisional de la ruta de regulación durante la producción de mangotoxina, el cual se basa en que el sistema de dos componentes GacS/GacA regula a nivel transcripcional los operones *mbo* y *mgo*, permitiendo la traducción de ambos, y además los productos del operón *mgo* parecen actuar potenciando la transcripción del operón *mbo*.

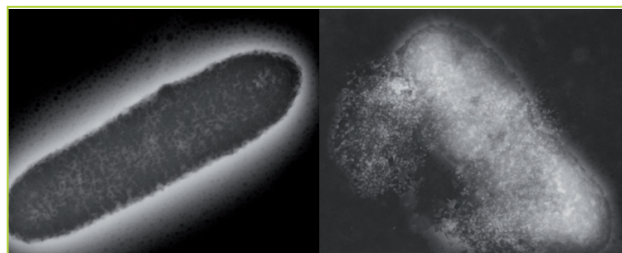
MECANISMOS DE ACCIÓN Y DETERMINANTES BACTERIANOS IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD DE BIOCONTROL DE *BACILLUS*

Autor: Houda Zeriuoh.

Directores: Alejandro Pérez García, Antonio de Vicente Moreno y Diego Romero Hinojosa.

Centro: Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga.

El control biológico de plagas y enfermedades vegetales es, en principio, una estrategia de control respetuosa con el medio ambiente, por lo que se ha convertido en un interesante método de control: En este sentido, la popularidad creciente de los programas de manejo integrado de plagas y enfermedades, ha contribuido al incremento del uso de estos agentes de biocontrol. El control integrado tiene como principal objetivo, la racionalización del empleo de pesticidas, haciendo énfasis en la contribución que otros métodos de control tales como el biocontrol puedan aportar al manejo de las enfermedades. Por tanto, el conocimiento amplio de los mecanismos de acción de un agente de biocontrol es un requerimiento clave para su posterior desarrollo como producto de control biológico. Diversas especies del género *Bacillus* se encuentran entre los biopesticidas de mayor éxito en el control de diferentes enfermedades de plantas debido, entre otras propiedades, a su capacidad de producir diferentes compuestos antimicrobianos. Los antibióticos lipopéptidicos han recibido especial atención por su amplio espectro de acción, frente a hongos y bacterias patógenas responsables de enfermedades en raíces, partes aéreas de la planta y en condiciones de postcosecha; y que además pueden contribuir al control de las enfermedades mediante diferentes mecanismos de acción. En nuestro laboratorio se seleccionaron dos cepas de *B. subtilis* por su capacidad antagonista frente a un amplio rango de patógenos fúngicos, demostrándose que estas dos cepas de *B. subtilis* producían las tres principales familias de lipopéptidos (fengicinas, iturinas y surfactinas). Se confirmó la implicación de fengicinas e iturinas en la capacidad de control de la enfermedad fúngica más importante de cucurbitáceas, el oídio. Dado que la actividad antifúngica de estas cepas estuvo principalmente asociada a la producción de lipopéptidos, se planteó como primer objetivo evaluar el espectro de acción de estas cepas de *B. subtilis* frente a otros patógenos aéreos de origen bacteriano y analizar el papel de los lipopéptidos en la posible actividad supresora. Se llevaron a cabo ensayos de biocontrol que revelaron que dos enfermedades bacterianas, la mancha bacteriana y la podredumbre blanda causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* y por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* respectivamente, eran eficazmente controladas por estas cepas de *B. subtilis*. En los ensayos de biocontrol utilizando una colección de mutantes simples incapaces de producir iturina, bacilomicina o fengicina, y en los estudios microscópicos confirmamos el papel esencial de los lipopéptidos de la familia de las iturinas en la actividad de biocontrol de estas cepas de *B. subtilis* (Zeriuoh, H., Romero, D., García-Gutiérrez, L., Cazorla, F.M., de Vicente, A., Pérez-García, A. (2011) The iturin-like lipopeptides are essential



Xanthomonas sin tratar (izquierda) y en presencia de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* (derecha). Imagen de la tesis de Houda Zeriuoh.

components in the biological control weaponry of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. Mol. Plant-Microbe Interact 24: 1540–1552). Además, evaluamos el papel de las surfactinas en la colonización del filoplano de melón. Los estudios de colonización que se llevaron a cabo con las cepas de *B. subtilis* y un mutante defectivo en la producción de surfactina, demostraron que las surfactinas estaban implicadas en la formación de biopelícula sobre las hojas de melón, ya que en los mutantes defectivos en surfactina se observó la desaparición de la formación de matriz extracelular y una disminución en la capacidad de colonización y en la capacidad de control biológico con respecto a las cepas silvestres de *B. subtilis*. Estos resultados resaltan que las surfactinas son esenciales para la formación de biopelículas sobre hojas de melón y la colonización eficaz del filoplano, ambas características indispensables en un agente de biocontrol eficaz. Por otro lado, demostramos que el fenómeno *quorum quenching* no está implicado en la capacidad de biocontrol de *B. subtilis* frente a bacterias fitopatógenas.

PREDICTIVE MYCOLOGY AND USE OF NATURAL ANTIFUNGALS TO PREVENT THE MYCOTOXIN FOOD HAZARD

Autor: Daiana García.

Directores: Dr. Antonio J. Ramos Girona y Dra. Sonia Marín Sillué.

Centro: Unidad de Micología Aplicada del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida.

Los hongos filamentosos pueden causar deterioro en las materias primas, piensos y alimentos varios pero, además, algunos sintetizan toxinas llamadas micotoxinas las cuales son un riesgo para la salud humana y animal. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, en la relación moho-toxina-alimento sólo las micotoxinas, como peligro químico, son relevantes. Sin embargo, pese a la ausencia de una relación directa entre el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas, la prevención del crecimiento de mohos en los alimentos conduce a la prevención de la presencia de micotoxinas.

Debido a que los hongos filamentosos pueden contaminar los alimentos desde las materias primas hasta su producto final, se deberían emplear diferentes estrategias de prevención en los distintos pasos de la cadena alimentaria. Las estrategias de pre-cosecha incluyen el uso de variedades de resistencia, rotación del cultivo, la preparación del suelo, una irrigación óptima, el uso de fertilizantes, herbicidas, insecticidas y la aplicación de agentes químicos y biológicos. Por otro lado, las estrategias de postco-

secha incluyen el mejoramiento de las condiciones de secado y almacenamiento junto con el uso de agentes químicos y naturales. Conjuntamente, los modelos predictivos podrían utilizarse como una estrategia para la predicción y prevención del crecimiento de mohos y la acumulación de micotoxinas.

Esta tesis se centra en dos principales estrategias de control del desarrollo fúngico:

- a) El uso de antifúngicos de origen natural para la prevención de mohos y micotoxinas.
Dos extractos vegetales, de *Equisetum arvense* y *Stevia rebaudiana*, fueron estudiados como posibles agentes inhibidores del crecimiento de mohos toxigénicos y sus correspondientes micotoxinas. Las cepas estudiadas de *Aspergillus* y *Fusarium* fueron completamente inhibidas *in vitro* por un extracto de *E. arvense* al 3%. Sin embargo, este efecto se vio disminuido en el estudio *in vivo* en semillas de maíz, donde *E. arvense* fue efectivo en la inhibición del crecimiento de *Aspergillus* sección *Flavi* y *Fusarium* sección *Liseola* a los mayores niveles de actividad de agua ensayados y para los mayores niveles de infección. A pesar de esto, los niveles de micotoxinas no se vieron significativamente afectados.
- b) La evaluación de la utilidad de los modelos predictivos para el manejo del problema de las micotoxinas.
En un trabajo inicial fueron identificados cuatro puntos específicos que merecen un estudio en profundidad para evaluar la viabilidad de la microbiología predictiva en el campo de los mohos, y en concreto en el almacenamiento de materias primas y alimentos: 1) los modelos predictivos deberían ser útiles para predecir durante largos períodos de tiempo; 2) los alimentos y las materias primas propensos a la contaminación por micotoxinas generalmente están almacenadas bajo condiciones marginales para el crecimiento fúngico; de esta forma el desarrollo de los modelos debería probarse bajo dichas condiciones; 3) el impacto del tamaño del inóculo debería de tenerse en cuenta en el desarrollo de los modelos; y 4) el impacto de la potencial variabilidad intraespecífica en las predicciones entre aislados de una misma especie.

La predicción del tiempo hasta el inicio del crecimiento mediante modelos cinéticos se ve claramente influida por el tamaño del inóculo. Por otro lado, los modelos de predicción se vieron comprometidos bajo las condiciones marginales estudiadas para el crecimiento fúngico; la gran variabilidad de los resultados bajo dichas condiciones trae como consecuencia la necesidad de la utilización de un gran número de repeticiones, especialmente para los modelos cinéticos. Por último, se demostró una gran variabilidad intraespecífica en el crecimiento y los niveles de micotoxinas para las cepas estudiadas: *A. carbonarius* y *P. expansum*. Por este motivo, debería incluirse un gran número de cepas para el desarrollo de modelos tanto para el crecimiento fúngico como para la producción de micotoxinas; el aumento del número de cepas en un experimento aumenta la variabilidad explicada mucho más que incluir más repeticiones.

Finalmente, se hizo un primer intento de modelización para la producción de aflatoxinas en función de los parámetros de crecimiento y el tiempo. En dicho experimento se demostró que la acumulación de aflatoxinas se correlacionaba mejor con el área de la colonia que con el diámetro de la colonia o la biomasa. Para el modelo de la producción de aflatoxinas se utilizó el modelo de

Luedeking-Piret, obteniéndose razonables porcentajes de variabilidad explicada.

Para concluir, los modelos de probabilidad aplicados en esta tesis, ya sea para el crecimiento fúngico o para la producción de micotoxinas, pueden ser una herramienta valiosa en la gestión de la seguridad alimentaria a través de la cadena alimentaria.

MICOTOXINAS EN ALIMENTO PARA TILAPIA: EVALUACIÓN DEL NIVEL DE CONTAMINACIÓN Y EFECTO SOBRE PARÁMETROS DE DAÑO OXIDATIVO EN CÉLULAS Y TEJIDOS LINFOIDES DE TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*)

Autor: Carlos Humberto Rodríguez Cervantes.

Directores: Dr. Antonio J. Ramos Girona y Dr. Manuel Iván Girón Pérez.

Centro: Unidad de Micología Aplicada del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida y Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas de la Universidad Autónoma de Nayarit (México).

El cultivo de tilapia (*Oreochromis* spp.), el pez dulceacuícola más importante de México por su captura, se realiza principalmente en ambientes subtropicales. Estas condiciones ambientales, por un lado, favorecen el cultivo comercial de este pez y, por otro, son propicias para la contaminación del alimento empleado en acuicultura por hongos como *Aspergillus* y *Fusarium* spp., productores de aflatoxinas (AFs) y fumonisinas (FBs), respectivamente. En este estudio, se recolectaron muestras de alimento para tilapias utilizado en 10 granjas del estado de Nayarit, México, durante tres temporadas estacionales (primavera, verano e invierno) entre 2009-2010. En cada muestra se determinó la actividad de agua (a_w) y concentración de AFs y FBs por ELISA y HPLC. Los resultados no mostraron contaminación por AFs; respecto a las FBs, se detectaron 19 muestras positivas (60%) por ELISA y 14 muestras positivas (46%) por HPLC, con niveles de 0.148 a 2.587 mg/kg, los cuales se encuentran por debajo de los límites permisibles en la Recomendación 2006/576 de la Unión Europea. En base a la concentración de FBs encontrada, se utilizaron dos concentraciones (1.0 y 2.5 ppm) de FBs (FB₁+FB₂ ratio 3:1) para evaluar el daño oxidativo (concentración de proteína oxidada e hidroperóxidos lipídicos) y actividad de las enzimas antioxidantes glutatión-S-transferasa (GST), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Para las exposiciones *in vitro* se expusieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) durante 24, 48 y 96 h, mientras que para las exposiciones *in vivo* se expusieron CMSP, células de bazo y tejido hepático durante 4, 14 y 21 días. Los resultados de las exposiciones *in vitro* e *in vivo* demostraron que FBs afecta negativamente la actividad de CAT en las células y tejidos expuestos. Por otro lado, la actividad de SOD solamente se ve afectada en CMSP y bazo expuestos *in vivo* a FBs. En cuanto al daño oxidativo, FBs provoca aumento en la concentración de proteínas oxidadas en las células y tejidos expuestos, mientras que la concentración de hidroperóxidos lipídicos aumentó solo en CMSP. Estos resultados sugieren que la exposición aguda a FBs produce modificaciones en los parámetros de estrés oxidativo de las células y tejidos expuestos, lo cual pudiera afectar la fisiología de este organismo e influir posteriormente en el crecimiento y producción de este pez.