

Unidades de captura y dispersión génica en la evolución de las β -lactamasas de espectro extendido

Ángela Patricia da Silva Novais Amorim

Directores: M^a Teresa Coque González y Fernando Baquero Mochales.

Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

La selección, expansión y persistencia de las poblaciones bacterianas resistentes a agentes antimicrobianos constituye un problema de gran impacto en salud pública, tanto en el ámbito hospitalario como comunitario. La evolución acelerada de la resistencia a antibióticos en los últimos años y el fallo de las medidas de control adoptadas ha motivado la necesidad de abordar este problema desde una perspectiva ecológica que considere la interacción entre distintas poblaciones. Los genes que codifican para β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas implicadas en resistencia a cefalosporinas de tercera generación, constituyen un modelo idóneo para analizar la resistencia a antibióticos desde esta perspectiva debido a su reciente aparición, su rápida expansión global y su distribución en distintos nichos ecológicos y hospedadores. Este estudio evaluó la contribución de la transmisión vertical (estructura poblacional de los aislados) y horizontal (caracterización de plásmidos, transposones e integrones) en la diseminación de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en una colección de aislados clínicos obtenidos en un amplio marco temporal (aislados obtenidos desde la primera descripción de resistencia a estos antibióticos en 1988 hasta nuestros días) y espacial (aislados representativos de distintos continentes). Este estudio incluye además una predicción de la capacidad de diversificación de las enzimas CTX-M o cefotaximasas (la familia de BLEE con diversificación y diseminación más notable) en relación con su espectro de actividad.

Esta tesis demuestra que el rápido y espectacular aumento de enterobacterias productoras de BLEE que se ha producido a nivel local y global es debido a la selección y expansión recientes de distintos clones y elementos de transferencia horizontal. La distribución temporal de BLEE de clase A (TEM, SHV, CTX-M) refleja un cambio epidemiológico caracterizado por i) un aumento de aislados de origen extrahospitalario, ii) la asociación a infecciones urinarias y iii) la selección de distintas variantes de BLEE. La diseminación de algunos tipos de BLEE se asoció a la expansión de clones de distintas especies (principalmente *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. aerogenes*). Los genes *bla*_{BLEE} se localizaron en plás-

midos conjugativos epidémicos específicos con alta afinidad para determinados ecotipos bacterianos, indicando un cierto grado de co-adaptación entre éstos vehículos y sus huéspedes. La caracterización del entorno genético de estos genes reveló su asociación a elementos específicos responsables de su expresión (secuencias de inserción) y dispersión (integrones, transposones mercuriales). La naturaleza modular de estas plataformas genéticas favorece los fenómenos de recombinación y transferencia horizontal, y en última instancia la persistencia y distribución equilibrada de los genes de resistencia. Además, la exposición continuada a antibióticos β -lactámicos parece haber contribuido a la diversificación de los genes *bla*_{CTX-M}, a través de la adquisición de mutaciones específicas responsables de aumentar el espectro hidrolítico de estas enzimas.

En resumen, el resultado de la actual diseminación y evolución de los genes *bla* parece ser debida a una combinación de la generación de variantes con mayor capacidad adaptativa, de la contribución de los elementos de transferencia horizontal en la dispersión de esos variantes y de la selección de clones con alta capacidad de transmisión o mantenimiento. Los estudios de genética multidimensional de poblaciones son esenciales para establecer estrategias eficaces de control de infecciones, identificar nuevas dianas terapéuticas y facilitar una visión integrada de los mecanismos evolutivos que permiten la biología adaptativa de los microorganismos.

Caracterización de proteínas con actividad antifúngica producidas por *Penicillium chrysogenum*

Andrea Rodríguez Martín

Directores: Miguel Ángel Asensio Pérez, Félix Núñez Breña, Raquel Acosta Guerrero.

Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura.

Las condiciones ambientales en que se procesan diversos alimentos favorecen el desarrollo superficial de mohos. En productos cárnicos y quesos madurados es frecuente el desarrollo de una población fúngica que contribuye al desarrollo de las características sensoriales del producto. Pero otros mohos son alterantes o pueden producir micotoxinas. Existen métodos eficaces para controlar el desarrollo de mohos en alimentos. Sin embargo, estos tratamientos no son adecuados para productos madurados donde la presencia de mohos es beneficiosa. Una solución en estos alimentos sería el empleo de proteínas antifúngicas que evitaran el desarrollo de mohos indeseables y que permitieran el crecimiento de los beneficiosos.

En estudios previos las cepas no toxigénicas RP42C y AS51D de *P. chrysogenum*, procedentes

de jamón curado, mostraron su capacidad de inhibir mohos toxigénicos. Además, se purificaron dos proteínas con actividad antifúngica, PgAFP y PgChP a partir de RP42C y AS51D, respectivamente.

El objetivo del trabajo ha sido caracterizar PgAFP y PgChP, incluyendo la determinación de sus secuencias aminoacídicas, las secuencias de los genes que las codifican; la evaluación preliminar de su toxicidad; el estudio de la influencia de diversos tratamientos y de compuestos comúnmente encontrados en alimentos sobre la actividad antifúngica.

Ambas proteínas han resultado ser muy diferentes. PgAFP tiene un peso molecular de 6,5 kDa, un punto isoelectrónico de 9,2, y no posee glicosilaciones. PgChP mostró un punto isoelectrónico de 5, y seis isoformas glicosiladas con pesos moleculares entre 30 y 31 kDa, separados por 162 Da que podría corresponder a un residuo de manosa o galactosa. La secuencia deducida del gen mostró dos posibles sitios de glicosilación (Asn-Phe-Thr y Asn-Asp-Cys) y la presencia de cadenas glucídicas se demostró mediante deglicosilaciones enzimáticas.

Las secuencias obtenidas de los genes *pgAFP* y *pgChP* tuvieron un tamaño de 276 y 912 pb, que codifican 92 y 304 aminoácidos, respectivamente. Además presentaron intrones pequeños con marcadores típicos de intrones fúngicos.

La secuencia aminoacídica de PgAFP presentó un 79% de identidad con Anafp de *A. niger* y PgChP un 60% de identidad con la familia de hidrolasas GH-75 compuesta por quitosanasas fúngicas. PgAFP y PgChP presentan un péptido señal y además PgAFP, al igual que Anafp y otras proteínas similares, presenta una prosequencia, que parece mantener la proteína inactiva hasta que este fragmento es eliminado durante su secreción.

La actividad antifúngica de PgAFP y de PgChP se inhibe por altas concentraciones (100 mM) de cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Al igual que las defensinas, el mecanismo de acción de PgChP y PgAFP podría deberse a receptores específicos en las membranas de los mohos sensibles. Los cationes podrían saturar estos receptores impidiendo que las proteínas ejercieran su acción antifúngica.

PgChP muestra actividad hidrolítica sobre quitosán, lo que puede hacer que su espectro de inhibición incluya a hongos con quitosán en su pared celular como los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, alterantes en alimentos madurados.

PgAFP y PgChP no mostraron toxicidad sobre larvas de *Artemia salina* ni glóbulos rojos a concentraciones superiores a las que poseen actividad antifúngica.

PgAFP y PgChP fueron estables a altas temperaturas, permaneciendo activas tras calentamiento a 100 °C 15 minutos y 80 °C 20 minutos, respectivamente. PgAFP además fue estable a valores de pH entre 1 y 12.

La actividad antifúngica de PgAFP y PgChP se mantuvo en presencia de altas concentraciones (100 mM) de Na y K, lo que puede ser de gran interés en alimentos madurados, donde abunda las sales de sodio y potasio. Los quelantes EDTA y EGTA no tuvieron un gran impacto en la actividad de PgChP y PgAFP, mientras que el fosfato sódico

a alta concentración (100 mM) sí pudo inhibir esta actividad. Los detergentes también inhibieron a PgChP, pero PgAFP se mantuvo activa a concentraciones de tween 20 o de tween 80 superiores a las empleadas en alimentos.

En definitiva, PgAFP y PgChP han mostrado alta estabilidad, inocuidad en los ensayos realizados y resisten componentes comúnmente encontrados en alimentos. Aunque es necesario profundizar en su estudio, estas proteínas y las cepas de *P. chrysogenum* productoras muestran características adecuadas para su utilización frente a mohos alterantes y toxigénicos en alimentos crudos madurados.

Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A

Amaia González Salgado

Directoras: **Dra. María Teresa González Jaén, Dra. Belén Patiño Álvarez.**

Departamento de Microbiología III.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Complutense de Madrid.

La ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario con propiedades neurotóxicas, inmunotóxicas, genotóxicas y teratogénicas sobre animales, y además ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer como un posible cancerígeno en humanos (del grupo 2B). Las principales especies de *Aspergillus* productoras de OTA son *A. ochraceus* en la sección *Circumdati*, y *A. carbonarius* y los dos miembros del agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. tubingensis*), en la sección *Nigri*. Se ha observado presencia de OTA en numerosos alimentos y bebidas, especialmente en cereales, café, uvas y vino, y sus límites máximos en diversos productos alimentarios están regulados por la Unión Europea. Para minimizar la entrada de OTA y otras micotoxinas en la cadena alimentaria, es muy importante la obtención de herramientas de diagnóstico rápido, para poder monitorizar los puntos críticos de control de forma efectiva. Sin embargo, el reconocimiento de las numerosas especies del género *Aspergillus* es difícil y requiere expertos en taxonomía, ya que tradicionalmente se han empleado métodos basados en características morfológicas. En este trabajo se describen ensayos, basados en la técnica de PCR, para la detección de las especies *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. ochraceus* y *A. flavus*, y dos ensayos de PCR a tiempo real para la especie *A. carbonarius* usando SYBR Green I y sonda TaqMan. Todos los cebadores están diseñados mediante la comparación de secuencias de la región espaciadora intergénica multicopia del rDNA, ITS, en diversas cepas y especies de *Aspergillus*, y han sido ensayados en un gran número de aislamientos de diferentes orígenes y hospedadores. Los ensayos de PCR son rápidos, sensi-

bles y específicos, y representan una buena herramienta para la detección temprana de algunas de las principales especies de *Aspergillus* toxígenas, y para la prevención de la entrada de micotoxinas en la cadena alimentaria. Además, los protocolos descritos anteriormente fueron aplicados en la detección de especies de *Aspergillus* en dos importantes agro-productos, como son las uvas de vino y los cereales (trigo blando y cebada). Por otra parte, se ha llevado a cabo la identificación y caracterización de genes implicados en la ruta biosintética de OTA en las especies *A. ochraceus* y *A. carbonarius*, y se ha cuantificado la expresión de algunos de estos genes en relación con la producción de OTA mediante RT-PCR a tiempo real. Por último, se estudió el efecto de fungicidas comerciales en el crecimiento, producción de OTA y expresión de los genes anteriormente mencionados. La clonación de posibles genes implicados en la biosíntesis de OTA en *A. ochraceus* y *A. carbonarius* proporcionará información adicional para la elaboración de nuevas estrategias de control de OTA en alimentos, y el conocimiento de los factores bióticos y abióticos que afectan a su producción.

Avances en el conocimiento del papel de la colina en *Streptococcus pneumoniae*

Ana González Moreno

Directores: **Pedro García González y José Luis García López.**

Departamento de Microbiología Molecular. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Streptococcus pneumoniae es una bacteria Gram-positiva que se considera un patógeno casi exclusivamente humano. Una de las características de esta bacteria es su auxotrofia por el aminoalcohol colina, ya que es incapaz de sintetizarlo de manera endógena, y es imprescindible para la correcta multiplicación de la bacteria. La colina forma parte exclusivamente de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de las estructuras periféricas de la bacteria, teniendo importantes funciones en el ciclo vital de esta bacteria. Se pueden destacar tres funciones principales de la colina para neumococo: una función estructural, basada en el requerimiento por parte de la bacteria para su normal multiplicación, una función fisiológica derivada del papel como sitio de anclaje no covalente sobre la pared de las proteínas de unión a colina (CBPs), y por último una tercera funcionalidad de la colina en la interacción con el hospedador, mediada por distintas proteínas del sistema inmune del mismo, tales como la proteína C reactiva (CRP) o el receptor del factor de activación plaquetaria (PAF).

El trabajo de esta tesis, se ha centrado en la importancia de la colina para neumococo, desde el punto de vista estructural y fisiológico, así como la utilización de análogos de colina como posibles compuestos antineumocócicos. Se ha determinado que el requerimiento de la colina está condicionado por la presencia del transportador TacF,

responsable de la salida de los precursores de ácido teicoico para formar parte de la pared bacteriana. Para la correcta funcionalidad de este transportador en neumococo es requisito *sine qua non* que dichos precursores de ácido teicoico lleven anclada covalentemente al menos una molécula de colina. Se ha comprobado que diferentes mutaciones del gen *tacF*, que implican determinados cambios de aminoácidos, permiten la salida de precursores de ácidos teicoicos libres de colina para formar parte de la pared bacteriana, salvaguardando así la auxotrofia para colina. Se han determinado 3 regiones de este sensor/transportador implicadas en dicho proceso; asimismo, diferentes combinaciones en los cambios de aminoácidos de la proteína confieren distintas eficiencias en la capacidad, por parte del transportador, de translocar precursores de ácidos teicoicos que no llevan anclada colina. También se ha determinado que el transportador TacF de la especie *Streptococcus pseudopneumoniae* presenta los mismos requerimientos que el TacF de neumococo, siendo por tanto, al igual que neumococo, auxotrofa para colina. Por otra parte, se ha descrito una nueva subfamilia de CBPs que está presente en todas las cepas de neumococo y en *Streptococcus mitis*; estas proteínas contienen un dominio C-terminal de unión a colina consenso y un dominio N-terminal compuesto por la repetición de motivos de unión a colina no canónicos. Dentro de esta subfamilia de CBPs se ha estudiado en profundidad la proteína CbpF, demostrándose que inhibe, *in vitro* e *in vivo*, tanto a la lisozima bacteriana LytC como a las lisozimas fágicas. Esto sugiere que CbpF puede tener una funcionalidad como regulador de la lisis y/o la reorganización de la pared de neumococo. Por último, se ha estudiado el posible papel como fármacos contra neumococo de compuestos análogos a la colina, tales como el ipratropio, determinándose que este compuesto tiene capacidad de inhibir diferentes CBPs, actuando así como bacteriostático. Además, ensayos con cepas de neumococo capaces de multiplicarse de manera independiente del aminoalcohol, pusieron de manifiesto que los efectos sobre la bacteria pueden ser más amplios que la citada inhibición de las CBPs, lo que abriría una nueva estrategia en la lucha contra neumococo.

Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes

Begonya Marcos Muntal

Directoras: **Margarita Garriga Turón y Teresa Aymerich Calvet.**

IRTA-Tecnología de los Alimentos.
Finca Camps i Armet.

La creciente demanda de productos mínimamente procesados y listos para el consumo plantea un importante reto para la seguridad ali-

mentaria y ha conducido al desarrollo de tratamientos post-procesado suaves, que permitan inhibir el crecimiento microbiano manteniendo la calidad y frescor de los alimentos. En este contexto adquiere una especial importancia el uso combinado de barreras contra el crecimiento de microorganismos que aseguren la calidad higiénica y la seguridad de los alimentos, sin afectar las propiedades organolépticas. En los trabajos recogidos en la presente tesis se plantearon diversas estrategias consistentes en la combinación de barreras al crecimiento microbiano para mejorar la seguridad de productos cárnicos listos para el consumo.

Durante la maduración, los embutidos crudos-curados se convierten en alimentos más estables y seguros como consecuencia de la sucesión de barreras al crecimiento microbiano. Sin embargo, en los embutidos poco ácidos, caracterizados por presentar valores finales de $\text{pH} \geq 5,3$, se ha minimizado una de las barreras al crecimiento de microorganismos. Con el objetivo de mejorar la seguridad de estos productos se valoró la aplicación del tratamiento por alta presión hidrostática (APH) y la adición de cultivos iniciadores en embutidos poco ácidos. El tratamiento APH (300 MPa), previo a la maduración de los embutidos, constituyó una barrera adicional para controlar la población de *Salmonella*, pero resultó contraproducente en el desarrollo de la microbiota de interés tecnológico y en el control de *L. monocytogenes*. La presurización (400 MPa), aplicada después del proceso de maduración, permitió obtener ausencia de *Salmonella* en el producto acabado. La adición de cultivos iniciadores permitió mejorar la higiene (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, aminas biógenas) y la seguridad (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) de los embutidos. Ambas tecnologías, aplicadas de forma combinada, ejercieron un efecto complementario, sin alterar la calidad final de los embutidos.

Por otro lado, el jamón cocido, es un alimento con un bajo contenido de sal (~2%), valores de pH en torno a 6,0 y actividad de agua superior a 0,94, factores incapaces de inhibir por sí solos los microorganismos relacionados con la contaminación post-procesado. Con el objetivo de reducir el riesgo de *L. monocytogenes* en el jamón cocido loncheado, se evaluó el efecto de antimicrobianos naturales (lactato-diacetato y enterocinas) y el tratamiento por alta presión hidrostática. Al aplicar los antimicrobianos como aditivos de fabricación, se observaron resultados óptimos en la combinación triple de tratamiento APH (400 MPa), antimicrobianos naturales y refrigeración a 1°C. Este tratamiento resultó eficaz, a pesar de la rotura de la cadena de frío, para reducir la contaminación inicial y evitar la recuperación de *L. monocytogenes* a lo largo de la vida útil del jamón. Por otro lado, al incluir las enterocinas en láminas biodegradables, el tratamiento combinado por alta presión hidrostática y envasado antimicrobiano, derivó en bajos niveles del patógeno (≤ 100 ufc/g) durante la vida útil del jamón conservado a 6°C. Finalmente, la combinación de APH envasado antimicrobiano y refrigeración a 1°C resultó efectiva, no sólo para controlar y reducir los recuentos de *L. monocytogenes*, sino para superar la rotura de la cadena de frío.

Estudio epidemiológico del virus de la hepatitis E (VHE) en trabajadores de explotaciones porcinas y en donantes voluntarios de la Comunidad Valenciana

Carolina Galiana Roselló

Directores: **María Teresa Pérez Gracia** y **Angel García Muñoz**.

Area Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad CEU Cardenal Herrera. Valencia. España.

El virus de la Hepatitis E (VHE) es el principal agente causal de las hepatitis no A no B de transmisión fecal oral. Esta infección está asociada a países en los cuales las condiciones higiénico sanitarias son deficientes, siendo las principales zonas endémicas Asia, África, y México. En los últimos años, en numerosos países desarrollados se han descrito casos de hepatitis agudas, no solamente casos esporádicos de personas procedentes de regiones endémicas, sino en individuos sin historia de viaje a zonas endémicas. Los objetivos de la tesis fueron detectar la presencia del VHE mediante técnicas inmunoserológicas y moleculares en muestras de suero de personas expuestas al ganado porcino y en personas sin exposición (donantes voluntarios) de la Comunidad Valenciana; así como determinar y valorar los factores de riesgo asociados a la presencia de marcadores del VHE (exposición a ganado porcino, viaje a zonas endémicas, ingesta de verduras crudas y marisco crudo e ingesta de agua no tratada) y contribuir al conocimiento de la epidemiología del VHE, aportando datos que ayuden a esclarecer las posibles vías de transmisión. Para ello, se obtuvieron muestras de suero de un total de 212 personas que se clasificaron en dos grupos según la exposición al ganado porcino. El grupo de expuestos estaba compuesto por 115 (54,2%) personas, entre las cuales se incluyen veterinarios, controladores de granjas, profesores y estudiantes que han tenido contacto con cerdos. El grupo de no expuestos estaba formado por 97 (45,8%) personas voluntarias de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad CEU Cardenal Herrera. No se identificó el virus en ninguno de los 212 individuos de este estudio. En lo que hace referencia a la detección de anticuerpos frente al VHE en los 212 individuos analizados, 25 personas (11,8%) presentaron anti-VHE de tipo IgG, siendo 21 expuestos y 4 no expuestos. Los anticuerpos anti-VHE de tipo IgM solamente fueron detectados en 1 persona (0,4%) sin exposición. Los anticuerpos de clase IgA resultaron positivos en 3 personas, 2 de ellas con exposición y 1 sin exposición. El análisis estadístico de las variables estudiadas en esta investigación mostró que tanto la exposición a ganado porcino como el consumo de agua no tratada han representado un factor de riesgo para la adquisición de la infección por el VHE. El análisis de las otras variables como el consumo de marisco crudo, verduras crudas y viaje

al extranjero no han supuesto un factor de riesgo para contraer el VHE. Asimismo, la elevada tasa de seroprevalencia descrita en el grupo de individuos expuestos a ganado porcino (18,5%), junto a la ausencia de viremia, puede sugerir que el VHE sea el responsable de infecciones subclínicas.

Este es el primer estudio en Europa que determina el consumo de agua no tratada como factor de riesgo para contraer la infección por el VHE. Además, es el primer estudio realizado en España, que analiza la presencia del VHE en personas que trabajan en contacto con el ganado sugiriendo que la infección por este virus podría tratarse como una enfermedad ocupacional en trabajadores del sector porcino y que deberían tomarse las medidas higiénico sanitarias correspondientes en este grupo para disminuir la exposición al VHE.

Caracterización molecular de la degradación anaeróbica de tolueno y *m*-xileno en *Azoarcus* sp. CIB

Blas Blázquez Castiñeira

Directores: **Eduardo Díaz Fernández** y **Manuel Carmona Pérez**.

Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC.

En esta Tesis, se ha identificado el cluster génico *bss/bbs* responsable de la degradación anaeróbica de tolueno en la bacteria desnitrificante *Azoarcus* sp. CIB. Se ha demostrado por primera vez que los genes *bbs* son imprescindibles para el catabolismo anaeróbico del *m*-xileno en esta bacteria.

El cluster de genes *bss/bbs*, se organiza en cuatro operones: un operón para los genes reguladores (*tdiS* y *tdiR*); dos operones catabólicos (*bss* y *bbs*) y un operón para el gen *tol*, el cual no es imprescindible para el crecimiento en tolueno/*m*-xileno. La expresión de los operones *bss* y *bbs* esta controlado por el sistema regulador de dos componentes *tdiS* (histidina-quinasa) que al recibir una señal se autofosforila y a través de una cascada de fosforilación transmite la señal y activa a la proteína reguladora *TdiR*. Esta proteína actúa como un activador transcripcional regulando positivamente la expresión de los promotores de los genes *bss* y *bbs*.

El gen *tol* codifica una proteína que presenta una arquitectura modular no descrita hasta la fecha, presentando un supradominio N-terminal con los dominios PAS, HK y REC, que estaría encargado de recibir una señal sensora; y un supradominio GGDEF y EAL, con actividad fosfodiesterasa que bajaría los niveles de di-GMPc en la célula. La bajada de di-GMPc en la célula interpondría en diversos factores como por ejemplo, la quimiotaxis, la formación de biofilms, etc.

En esta Tesis, también se ha caracterizado el primer gen *gcdH* bacteriano que codifica la actividad glutaril-CoA deshidrogenasa. Esta enzima cataliza un etapa clave en la ruta baja del benzoil-CoA con la conversión del glutaril-CoA en crotonil-CoA. En posición divergente al gen *gcdH* se

encuentra el gen *gcdR* que codifica un regulador transcripcional de la familia LysR y que controla la expresión del promotor del gen *gcdH* activando su expresión en presencia de los compuestos inductores glutarato y glutaconato.

Estudios de mecanismos de resistencia a tetraciclina, eritromicina y otros antimicrobianos no-beta lactámicos en bacterias anaerobias estrictas aisladas de infecciones humanas y animales.

María Lorenzo Sánchez

Directores: **Segundo Píriz durán** y **Alberto Quesada Molina**.

Dpto. de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Cáceres. Universidad de Extremadura.

En la actualidad, resulta incuestionable destacar la patogenicidad de muchas especies de bacilos anaerobios gramnegativos tanto en clínica humana como en la veterinaria. El tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos requiere el uso de antimicrobianos, sin embargo, éste no siempre resulta efectivo, pues los microorganismos pueden volverse resistentes a determinados antimicrobianos. La presencia en el hombre y animales de bacterias anaerobias estrictas gramnegativas que presentan marcadores de resistencia a antimicrobianos beta y no beta lactámicos es objeto de numerosos trabajos científicos.

En este trabajo, tras llevar a cabo el estudio del perfil de sensibilidad frente a antimicrobianos beta y no beta lactámicos en las cepas analizadas de origen humano y animal, nos planteamos determinar la presencia de los marcadores de resistencia a tetraciclinas, eritromicina y metronidazol, *tetQ*, *ermF* y genes *nim*, en estas cepas. Igualmente se llevó a cabo el estudio de las posibles variantes polimórficas de estos genes así como el estudio del entorno genético en las regiones "corriente arriba" de dichos marcadores. Finalmente nos planteamos identificar la existencia de posibles correlaciones entre los polimorfismos genéticos y los fenotipos de resistencia frente a tetraciclina, eritromicina y metronidazol.

La resistencia de los microorganismos anaerobios estrictos gramnegativos que fueron analizados frente al conjunto de antimicrobianos testados fue variable, siendo generalmente superior en las cepas de origen humano y resultando el imipenem y el metronidazol los compuestos más activos para la inhibición de su crecimiento. El gen *tetQ* resultó ser el principal determinante de resistencia a la tetraciclina en las cepas analizadas, tanto en las de origen animal como humano. A pesar de detectarse algunos polimorfismos en las secuencias codificantes de los genes *tetQ*, estas diferencias no se expresaban a nivel fenotípico. La resistencia a la eritromicina en estas cepas se

debía frecuentemente a determinantes de resistencia diferentes a *ermF*. En este estudio, la resistencia frente al metronidazol encontrada en algunas de las cepas parecía deberse a algún mecanismo desconocido, diferente a los que involucraban la presencia de genes *nim* o la sobreexpresión de actividad LDH. Finalmente señalar que los genes *tetQ* y *ermF* fueron transferidos horizontalmente entre algunos de los microorganismos analizados en este trabajo. Esta movilización se detectó incluso entre bacterias pertenecientes a diferentes especies aisladas a partir de distintos hospedadores, animales y humanos.

Estos resultados contribuyen a consolidar la hipótesis de la importancia de la transferencia horizontal de determinantes de resistencia entre bacterias de distintos géneros y especies pertenecientes al mismo o diferente ambiente, que constituyen reservorios para este tipo de secuencias incluso en ausencia de selección, planteando por tanto una seria amenaza para la salud humana y animal.

Evaluación del mecanismo de corte del RNA por la toxina bacteriana kid y de su actividad inhibidora de la traducción

Elizabeth Diago Navarro

Director: **Ramón Díaz Orejas**.

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Kid, la toxina del sistema Toxina-Antitoxina *parD* (*kis*, *kid*) del plásmido R1, es una endorribonucleasa que corta ARN con preferencia por la secuencia 5'-UA(A/C)-3' y también es un inhibidor de síntesis de proteínas. Se ha propuesto que la actividad ARNasa de Kid es similar a las ARNasas A y T1. El mecanismo propuesto se basa en el análisis de los productos de corte y en un modelado de un complejo de Kid con el sustrato 5'-AdUACA-3'. Se supone que la inhibición de la síntesis de proteínas por Kid se debe a la rotura del ARNm independientemente de ribosomas.

En esta tesis se ha realizado una evaluación del modelo de unión y corte del RNA por Kid y de la inhibición de traducción por esta toxina.

La evaluación del modelo de unión y corte del ARN por Kid se ha realizado analizado por espectrometría de masas el efecto en unión y rotura del RNA de mutaciones en residuos claves del modelo. Las mutaciones R73H, D75E, D75N y H17P que afectan a residuos del centro catalítico propuesto, inactivan la toxicidad de Kid. Ensayos de corte realizados con los sustratos 5'-AUACA-3' y 5'-UUACU-3', indican que las mutaciones anulan la actividad ARNasa de la toxina sin afectar su unión al sustrato 5'-AdUACA-3'. El análisis de variantes de Kid con mutaciones en residuos implicados en la unión al sustrato (A55G, T69G, T46G, R85W) indica que interaccionan con el sustrato 5'-AdUACA-3' con menor eficiencia que la proteína silvestre y que con la excepción de T46G, conservan una actividad de corte específica y medible sobre 5'-AUACA-3' y 5'-UUACU-3'. Los mutantes que retenían actividad ARNasa, mos-

traron inhibición de la síntesis de proteínas *in vitro* y de la toxicidad *in vivo*. Los resultados apoyan el modelo propuesto e indican que T46 es un residuo de unión a ARN que participa más directamente en la actividad ARNasa de la toxina.

El descubrimiento accidental de mutaciones en el gen *prfA* abrió la posibilidad de analizar las interacciones de Kid con componentes del ribosoma. *prfA* codifica el factor de terminación de la traducción RF1 de *E. coli*. Las tres mutaciones aisladas afectaban a residuos de este factor localizados cerca del sitio de reconocimiento de codones (G121S, G301S y R303H) y mostraban una reducción de ~10 veces de la eficiencia de terminación en codones UAG, sin afectar significativamente la estabilidad de RF1 *in vivo*. Los mutantes mostraban hipersensibilidad a antibióticos aminoglicósidos y sorprendente también a la toxina Kid cuya actividad ARNasa es, en principio, independiente del proceso de traducción. La hipersensibilidad a Kid, que es dependiente de su actividad ARNasa se suprimió al sobreproducir el RF1 silvestre o la antitoxina Kis. Estos datos aportan la primera evidencia de la participación del factor RF1 en la ruta de toxicidad de Kid, añadiendo complejidades adicionales a la actividad de Kid como inhibidor de la síntesis de proteínas.

La familia de las metalotioneínas en *Tetrahymena* y su aplicación en el desarrollo de biosensores celulares para la detección de metales pesados

Francisco Amaro Torres

Director: **Juan Carlos Gutiérrez Fernández**.

Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

Las metalotioneínas (MTs) constituyen las herramientas moleculares proteicas más importantes en la defensa microbiana frente al estrés originado por metales pesados. Uno de los objetivos de esta tesis doctoral fue el incrementar nuestro conocimiento actual sobre MTs en el ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*. Nuestra contribución ha sido el aislamiento y caracterización de 2 nuevos genes codificantes de MTs (*MTT3* y *MTT5*), que se suman a los 3 (*MTT1*, *MTT2* y *MTT4*) que han surgido paralelamente al desarrollo de este trabajo. Otros dos nuevos genes (*TrosMTT1* y *TrosMTT2*) de la especie *T. rostrata* han sido, igualmente, aislados y caracterizados en esta tesis. Actualmente conocemos un total de 11 genes codificantes de MTs en diferentes especies de *Tetrahymena*. Tanto el estudio *in silico* de sus secuencias aminoácidas, como sus niveles de expresión relativa (RT-PCR cuantitativa, frente a diferentes metales y otros agentes ambientales estresantes), y el análisis filogenético, han corroborado la división de la familia de MTs de ciliados en dos subfamilias (CdMTs y CuMTs). Las CdMTs de *Tetrahymena*, presentan

unas características únicas respecto de la mayoría de las MTs conocidas (mayor tamaño, motivos CCC casi exclusivos y un drástico carácter modular). La localización de módulos y submódulos a lo largo de sus secuencias aminoacídicas, probablemente explicaría su mayor tamaño y ha contribuido en la elaboración de un modelo sobre su posible historia evolutiva, extensamente basado en duplicaciones génicas. Igualmente, un intenso análisis de las regiones 5' y 3' UTRs de las CdMTs de *T. thermophila*, ha revelado la presencia de un motivo altamente conservado (MTCM1) presente en las regiones promotoras de *MTT5* (13 copias), *MTT1* (6 copias) y *MTT3* (2 copias). Este motivo encierra la secuencia consenso de unión a factores de transcripción de la familia bZIP (como el AP1). En el genoma de *T. thermophila* existen, al menos, 4 genes del tipo bZIP. Tras su análisis *in silico* se eligieron 3 para un análisis de expresión bajo la presencia de Cd. Concluyéndose, que eran buenos candidatos para considerarlos como factores implicados en la regulación de la expresión de los genes MTs. Experimentos de EMSA y *southwestern blotting* han mostrado que al motivo MTCM1 se unen proteínas procedentes de extractos celulares de *T. thermophila*, y sus masas moleculares son similares a algunas de las inferidas de los genes bZIP. El análisis de la región 3' UTR junto con el de moléculas de ADNc del gen *MTT5* mostraron la existencia de un intrón, el cual es diferencialmente procesado.

Otras moléculas de naturaleza peptídica, que pueden estar involucradas en la inactivación de metales, son las fitoquelatinas (FQs), moléculas sintetizadas por la enzima fitoquelatin-sintasa (FQS). Tras buscar en el genoma de *T. thermophila* encontramos un homólogo de FQS, se aisló el gen y se analizó su expresión (RT-PCRq) bajo el estrés de metales pesados. El gen se expresa exclusivamente cuando se induce por Cd, al igual que otras FQs de otros organismos, pero tras utilizar diversos métodos (HPLC, inmuno-western blotting, electroforesis capilar o HPLC-espectrometría de masas) no se ha detectado la presencia de FQs. La metodología HPLC-SM mostró que en muestras tratadas con Cd aparecen moléculas derivadas de la degradación del glutatión. Esta peculiaridad, junto con algunas características estructurales de la FQS de *Tetrahymena* y la ausencia de FQs, nos hace pensar que la función real de esta enzima no es la biosíntesis de FQs, sino más bien la degradación del glutatión o conjugados de glutatión (como se ha propuesto para FQs de procariontes).

Aprovechando la gran capacidad de respuesta a metales de los promotores de los genes *MTT1* y *MTT5* de *T. thermophila*, se ha llevado a cabo construcciones con diferentes genes reporteros (Green Fluorescent Protein-GFP o Luciferasa-LucFF), por ejemplo; $P_{MTT1}::GFP::MTT1$ y $P_{MTT1}::GFP::MTT5$ o $P_{MTT1}::LucFF$ y $P_{MTT5}::LucFF$, las cuales fueron introducidas en el ciliado por electroporación o transformación biolística, obteniéndose las cepas transformantes o recombinantes correspondientes. Estas cepas constituyen biosensores celulares que responden con una elevada sensibilidad a diversos metales pesados. Las cepas *MTT1Luc* y *MTT5Luc* representan los biosensores eucariotas capaces de detectar las menores concentraciones de metales pesados no esenciales (Cd, Pb, As, Hg), con una

sensibilidad de detección de 5-50 nM dependiendo del metal. La cepa *MTT5Luc* se encuentra entre los tres biosensores celulares, actualmente descritos, capaces de detectar las mínimas concentraciones de Cd (<10nM), detectando Cd (5 nM) a concentraciones 200 veces menores que *S. cerevisiae* y 20-5.000 veces menores que *C. elegans*. La validación de estos biosensores celulares (en bioensayos del tipo *turn-on*), usando tanto muestras artificialmente contaminadas como muestras naturales, ha mostrado su validez tanto en la detección de metales en muestras acuáticas como terrestres.

Díaz et al., 2007. *PLoS ONE* 2(3):e291. doi:10.1371/journal.pone.0000291.

Amaro et al., 2008. *Gene*.423: 85-91.

Amaro et al., 2009. *Com. Biochem. Physiol.*149: 598-604.

Gutiérrez et al., 2009. *BioEssays*. 31: 805-816.

Fuentes de bacterias para la colonización del intestino del neonato. Aplicación para el tratamiento de las mastitis lactacionales

Esther A. Jiménez Quintana

Directores: Juan Miguel Rodríguez Gómez y Leonides Fernández Álvarez.

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Al iniciarse esta Tesis Doctoral se desconocía la influencia del modo de nacimiento, la alimentación y el ambiente en el desarrollo inicial de la microbiota intestinal, y se consideraba que el intestino del feto a término era estéril. Por ello, el primer objetivo fue la investigación de las posibles rutas de adquisición de microorganismos durante el periodo perinatal, sin descartar una posible colonización del intestino fetal. Para ello se recogieron muestras de sangre de cordón umbilical de 20 niños sanos nacidos por cesárea electiva y se pudieron aislar bacterias de distintas especies, como *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* o *Streptococcus sanguinis*. Paralelamente, se consiguieron muestras del primer meconio de 21 niños sanos nacidos a término y las especies que se detectaron en un mayor número de muestras fueron *E. faecalis* y *St. epidermidis*; no obstante, también se aislaron otras como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Leuconostoc mesenteroides* o *Rothia mucilaginoso*. Posteriormente, se seleccionó una cepa de *E. faecium*, aislada de leche materna, y se sometió a un marcaje genético para confirmar la transferencia de bacterias comensales a través de la barrera placentaria empleando un modelo animal. La cepa marcada, administrada oralmente a un grupo de ratonas gestantes, se pudo aislar en muestras de líquido amniótico y de meconio, demostrándose así la existencia de un mecanismo de transferencia a través de la placenta.

También se investigó el papel del calostro y de la leche como fuente de bacterias para el intestino infantil. Se tomaron muestras de calostro de 36 mujeres. *St. epidermidis* fue detectado en 30 muestras mientras que los enterococos constituyeron el segundo grupo bacteriano en orden de frecuencia. Se estudió la composición microbiológica de 17 muestras de leche materna de mujeres sanas y de las heces de sus respectivos hijos, comparando estas últimas con 7 muestras de heces de niños alimentados con fórmula. *St. epidermidis* fue la especie con mayor prevalencia, tanto en las muestras de leche como en las heces de los niños amamantados, mientras que *E. faecalis* lo fue entre los aislados de heces de niños alimentados con fórmula. Se analizaron los factores de virulencia y la sensibilidad a los antibióticos de los aislados de estas dos especies y los resultados mostraron que pueden considerarse como seguros. Otro de los objetivos fue el aislamiento e identificación de bifidobacterias a partir de 23 muestras de leche humana y 23 muestras de heces de los respectivos hijos mediante técnicas de cultivo y moleculares (qPCR-RT, PCR-DGGE). Se aislaron bifidobacterias de 12 muestras de leche y 20 de heces. La mayoría pertenecían a las especies *B. breve*, *B. bifidum* y *B. longum*. Se detectó DNA bifidobacteriano en 22 de las muestras en un rango de entre 40 y 10.000 copias/ml. En conclusión, la leche humana es una fuente de bifidobacterias para el intestino infantil.

El último objetivo fue la aplicación de *Lactobacillus gasseri* CECT5714 y *Lactobacillus salivarius* CECT5713, aislados de leche humana, para el tratamiento de las mastitis lactacionales, causadas principalmente por estafilococos y estreptococos suponiendo una de las principales causas de destete precoz e indeseado. La antibioterapia únicamente logra la curación del 10-30% de los casos. En el ensayo participaron 20 mujeres lactantes con mastitis estafilocócica. La mejoría de las mujeres del grupo probiótico fue progresiva y se reflejó en una disminución significativa del recuento de estafilococos, un aumento del de lactobacilos y la desaparición de la sintomatología. Las cepas administradas se detectaron en leche a partir de la segunda semana de tratamiento.

Mecanismos moleculares de resistencia a arsénico en *Corynebacterium glutamicum*

Efrén Ordóñez del Amo

Directores: José Antonio Gil Santos y Luis Mariano Mateos Delgado.

Área de Microbiología. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León.

El arsénico (As) ha estado íntimamente ligado a la actividad humana a lo largo de la Historia. En la actualidad el As es uno de los metales más ubicuos en el medio natural (cerca del 0,0005%), formando parte de la composición de muchos mine-

rales. Este hecho, unido a su elevada toxicidad lo convierte en un problema de salud de primer orden a nivel mundial, y en el desastre medioambiental de mayor calado en muchas regiones.

Como resultado de la interferencia humana, el ciclo biológico del As se ha ampliado, por lo que cantidades enormes de este metaloide acaban finalmente en el ambiente y en los organismos presentes. Aunque el binomio As y vida parecen en sí mismo un contrasentido, son varias las aplicaciones del As en fármacos usados como quimioterápicos o antiparasitarios.

El As es utilizado por algunos microorganismos en su metabolismo como agente oxidante (aceptor de electrones) o como fuente de energía (agente reductor), si bien lo más común son los microorganismos que simplemente desarrollan estrategias para evitar su toxicidad. Son taxonómicamente diversos y metabólicamente versátiles. Así, por ejemplo, el arsénico reducido [arsenito, As(III)] es oxidado a arseniato [As(V)] por las bacterias oxidantes del As(III). Estos organismos quimiolitotóxicos utilizan oxígeno (respiración aerobia) y en algunos casos nitrato (respiración anaerobia) como aceptores terminal de electrones, a la vez que realizan la fijación de CO₂ atmosférico. Existen también microorganismos oxidadores de As(III) heterotróficos (mixotróficos), donde se utiliza el carbono orgánico como fuente de carbono.

La actinobacteria *Corynebacterium glutamicum* se caracteriza por presentar una elevada resistencia a arsénico. El arsenito [As(III)] entra en *C. glutamicum* por un sistema todavía desconocido, siendo expulsado a través de las permeasas de arsenito (CC₂Acr3s), canales transmembrana que actúan como antiportadores de As(III). El arseniato [As(V)], al igual que ocurre en otros organismos, entra en las células a través de los sistemas de transporte específicos e inespecíficos de fosfato (tipo Pst y Pit respectivamente). En el citoplasma de *C. glutamicum*, el As(V) es reducido a As(III) mediante la catálisis realizada por enzimas arseniato reductasas (CC₂ArsCs); estas enzimas presentan un mecanismo de acción basado en la presencia del pseudodisacárido micotiol (MSH) y la micorredoxina (Mrx1), enzima esta última descrita por primera vez en nuestro trabajo y que permite describir la presencia de una tercera subfamilia de arseniato reductasas celulares; el As generado en este proceso, As(III), es posteriormente eliminado por las permeasas de arsenito.

En *C. glutamicum* los procesos de resistencia a As están basados en la presencia de dos operones cromosómicos de resistencia, *ars1* y *ars2*, que contienen genes para tres productos proteicos: represor transcripcional (CC₂ArsR), arsenito permeasas (CC₂Acr3) y arseniato reductasas (CC₂ArsC). La expresión de los operones *ars* es inducible por As(III), pero no por As(V). La presencia de As(III) en el interior de la célula permite su interacción con el sitio de unión a metales del represor-metaloregulador CC₂ArsR, que está constituido por tres cisteínas. Esto provoca un cambio conformacional del represor, liberándose del operador y quedando ahora los promotores accesibles para que las RNA polimerasas expresen el resto de los genes de los dos operones *ars*. La reducción del As(V) citoplasmático depende

en *C. glutamicum* de las arseniato reductasas 1 y 2 (CC₂ArsC1 y CC₂ArsC2), cuyos genes están presentes en cada uno de los operones, y que a su vez utilizan el mecanismo de acción descrito anteriormente (MSH/Mrx1). Sin embargo una pequeña proporción de As(V) es reducido directamente mediante su interacción con micotiol (MSH), e independiente del mecanismo de las arseniato reductasas, lo cual justificaría que mínimas cantidades del As(III) generado pueda servir de sensor para inducir la expresión de los operones *ars* en *C. glutamicum*.

Role of Cfh3p in the morphogenesis of *Schizosaccharomyces pombe*

Mirza Mohammad Reza Sharifmoghdam

Directora: M^a Henar Valdivieso Montero.

Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Biología/Instituto de Microbiología Bioquímica (Centro Misto Universidad de Salamanca/CSIC).

En este trabajo se ha caracterizado la función de Cfh3p, una proteína de *Schizosaccharomyces pombe* que presenta similitud con Chs4p. Chs4p es una proteína de *Saccharomyces cerevisiae* que regula a la quitina sintasa Chs3p a varios niveles: es un activador bioquímico, ancla a Chs3p al anillo de septinas y regula la estabilidad de Chs3p en la membrana plasmática. El hecho de que en *Schizosaccharomyces pombe* no haya quitina nos llevó a investigar la función de Cfh3p. Los resultados han demostrado que Cfh3p es un regulador de Bgs1p, una enzima glucán sintasa que es necesaria para la síntesis del septo primario. La regulación de Bgs1p por Cfh3p se ejerce a nivel post-traduccional. En concreto, se ha demostrado en este trabajo que Cfh3p estabiliza a Bgs1p en la membrana plasmática.

Además en este trabajo se ha demostrado que la glucán sintasa Bgs1p es necesaria para la estabilidad de los anillos contráctiles, necesarios para la citocinesis, y que la regulación de Cfh3p juega un papel relevante en esta función.

Finalmente se ha visto que la regulación de Bgs1p por Cfh3p es más necesaria en condiciones de estrés, así se ha visto que en estas condiciones los anillos contráctiles son muy inestables tanto en una cepa mutante para *cfh3* como para una cepa mutante *cps1/bgs1*. Esto se ha observado en condiciones de estrés osmótico, nutricional y mecánico. Sin embargo, se ha visto que el daño producido en los anillos por el estrés se repara por las células y que este daño no es la causa de la sensibilidad de las células mutantes *cfh3*, *bgs1* y *cfh3 bgs1* al estrés. La razón para esta sensibilidad parece ser el hecho de que en estas condiciones la síntesis de la pared celular, y del b-glucano en particular, están reducidas significativamente.

Caracterización de un nuevo poliéster presente en las cepas lisas de *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium obuense*, *Mycobacterium parafortuitum*, *Mycobacterium chubuense* y *Mycobacterium gilvum*. Implicación en la morfología colonial, motilidad y formación de biofilms

Gemma Agustí Adalid

Directoras: Marina Luquin Fernández y Esther Julián Gomez.

Grupo de Micobacterias, Dept. Genética y Microbiología, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona.

Las micobacterias son un grupo de microorganismos de gran importancia clínica, ya que existen múltiples especies que son agentes causales de varias enfermedades humanas con unas importantes morbilidades y mortalidades. Entre este grupo de micobacterias patógenas destacamos *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, agentes causales de la tuberculosis y la lepra, respectivamente.

Por otra parte, aparte de los microorganismos que constituyen los complejos *M. tuberculosis* y *M. leprae* encontramos un grupo numeroso de micobacterias, formado por micobacterias ambientales (MNT). Este grupo engloba más de 130 especies micobacterianas entre las cuales, aproximadamente un tercio podrían estar relacionadas con enfermedades en humanos y ser las responsables de las denominadas micobacteriosis, aunque a diferencia del complejo *M. tuberculosis* y *M. leprae*, las especies de MNT no son patógenos obligados.

Las MNT tienen una gran capacidad de prevalencia en aguas de distribución y esto es debido principalmente a su capacidad de crecer en un amplio rango de condiciones ambientales y, sobre todo, a su capacidad de colonizar superficies. La motilidad y la capacidad de adherirse a superficies son algunas de las respuestas funcionales que se manifiestan en el proceso de colonización de una superficie. Por lo tanto el estudio de la motilidad y la capacidad de adhesión a diferentes materiales nos puede ayudar a entender y determinar los mecanismos de colonización, persistencia y transmisión de las MNT en el medio ambiente.

En el género *Mycobacterium*, los efectos de la morfología colonial en las funciones biológicas son múltiples. Diferentes estudios, en *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium smegmatis*, muestran una relación directa entre la morfología colonial, la motilidad, la hidrofobicidad, la adhesión celular y la formación de biopelículas en la interfase líquido-aire, además de relacionar estas funciones biológicas con la presencia en la pared celular de estas micro-

bacterias de un tipo específico de glicolípidos denominados glicopeptidolípidos.

Esta tesis se ha centrado en estudiar y relacionar la morfología colonial con las funciones biológicas (motilidad, hidrofobicidad, adhesión celular y formación de biopelículas en superficie), descritas inicialmente en *M. avium*, *M. abscessus* y *M. smegmatis*, en otro grupo de micobacterias ambientales, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium chubuense*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium obuense*, *Mycobacterium parafortuitum* y *Mycobacterium vaccae*. Estas especies micobacterianas tienen en común que son de crecimiento rápido, presentan originariamente una morfología colonial lisa y, según los estudios comparativos del 16S ARN, son filogenéticamente próximas entre ellas, a la vez que filogenéticamente distantes de las especies micobacterianas ya estudiadas.

En este sentido, nos propusimos obtener de forma espontánea, a partir de las colonias lisas de *M. aurum*, *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* y *M. vaccae*, variantes rugosas estables las cuales fueron aisladas en cultivo puro. Posteriormente, nos centramos en analizar los lípidos y glicolípidos de la pared celular de estas micobacterias mediante cromatografía en capa fina para comprobar si se observaban diferencias en la composición lipídica y glicolípida entre las dos variantes morfológicas. Además, se llevó a cabo el estudio comparativo de la capacidad de motilidad, de las características hidrofóbicas, de la adhesión celular y de la formación de biopelículas en la interfase líquido-aire entre las dos morfologías coloniales en las diferentes especies estudiadas. Y por último, se realizaron estudios genéticos con el fin de determinar las bases moleculares relacionadas con los cambios de morfología colonial en *M. vaccae*.

Bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos: análisis estructural de polisacáridos y detección molecular de estirpes que sintetizan β -(1³)(1²)-D-glucanos

Idoia Ibarburu López

Directoras: **Ana Jesús Irastorza Iribas y María Teresa Dueñas Chasco.**
Facultad de Ciencias Químicas de San Sebastián (UPV/EHU).

Entre los microorganismos presentes en la sidra natural producida en el País Vasco destacan algunas bacterias del ácido láctico (BAL) por su capacidad de producir exopolisacáridos (EPS). Los efectos deletéreos que causan los EPS en la sidra debido a un aumento de la viscosidad de la bebida, se traducen en pérdidas económicas para el sector sidrero. Sin embargo, la producción de EPS por estas cepas con status GRAS (*Generally recognized as safe*) despierta un interés biotecnológico en la industria alimentaria no sólo porque mejoran la textura de algunos productos fermentados, sino también porque algunos EPSs tienen efectos beneficiosos para la salud.

El primer objetivo de esta tesis ha sido el aislamiento y la identificación fenotípica y molecular de cepas productoras de EPSs a partir de sidra. De algunas cepas seleccionadas se realizó asimismo la caracterización estructural de sus exopolisacáridos. La mayor parte de las cepas resultaron ser productoras del mismo β -(1³)(1²)-D-glucano, mientras que algunas producían heteropolisacáridos. Además, se evaluó la influencia de la composición del medio de cultivo sobre la producción de EPS por la cepa *Oenococcus oeni* 14. Finalmente, se han puesto a punto métodos moleculares basados en la PCR para la detección de cepas productoras del β -(1³)(1²)-D-glucano. Estos métodos tienen como diana el gen *gtf*, que codifica para la única glicosiltransferasa necesaria para la síntesis del β -glucano.

Genetic and physiological characterization of two ISL3-like insertion sequences of *Pseudomonas stutzeri* AN10

Joseph A. Christie de Oleza

Directores: **Rafael Bosch y Balbina Nogales.**
Universitat de les Illes Balears.

Se han encontrado dos elementos de tipo ISL3 en *Pseudomonas stutzeri* AN10: ISPst9, una nueva secuencia de inserción descrita en este trabajo, y una isoforma de ISPpu12. Éstas se encuentran situadas próximas a los genes implicados en la degradación del salicilato en el cromosoma de esta cepa. Ambas son elementos móviles funcionales con genes que codifican para la transposasa y repeticiones invertidas similares, pero con genes acompañantes diferentes. Al igual que otras secuencias de inserción relacionadas de tipo ISL3, ISPst9 parece estar implicada en inactivación de genes catabólicos como se observó cuando este elemento móvil se insertó en el gen *nahH* de *P. stutzeri* AN142, un derivado de *P. stutzeri* AN10. Una actividad catabólica normal puede ser reestablecida cuando la secuencia de inserción es escindida de forma perfecta.

Se ha demostrado que la transposición de los elementos de tipo ISL3 presentes en *P. stutzeri* AN10 se activa fuertemente al sufrir la célula una interacción conjugativa. Dicho incremento de la transposición no se produce cuando es eliminado *tnpR*, gen que codifica para un regulador transcripcional de tipo MerR presente en ISPpu12. Ningún estímulo o regulación tan fuerte ha sido descrita para ninguna otra secuencia de inserción. De tal forma, se presume que la interacción conjugativa desencadena una cascada de señales dentro de la célula de *P. stutzeri* AN10 que activa *TnpR* de ISPpu12. La activación de *TnpR* daría lugar a un incremento de transcripción del gen que codifica para la transposasa incrementando así la transposición de la secuencia de inserción. La actividad de la transposasa de ISPpu12 puede actuar en *trans* sobre ISPst9 ya que presenta repeticiones invertidas similares a las de ISPpu12, pudiendo

ser ambas secuencias de inserción movilizadas tras el estímulo. Esta movilización no se observa en otras secuencias de inserción de tipo IS5 presentes en *P. stutzeri* AN10.

La transposición de ambas secuencias de inserción de tipo ISL3 se lleva a cabo mediante un mecanismo conservativo, formando intermediarios circulares. Estos círculos presentan las repeticiones invertidas de la secuencia de inserción confrontadas y separadas por una secuencia de 5 pb que proviene del DNA que flanquea el elemento móvil. La secuencia de inserción se escinde de su posición original de forma imperfecta, pese a que una escisión perfecta es posible. La actividad máxima de formación de intermediarios circulares se alcanza tras sólo 2,5 horas de iniciar el evento conjugativo.

Caracterización molecular de la ruta de degradación de ácido gálico en *Pseudomonas putida*

Juan Nogales Enrique

Director: **Eduardo Díaz Fernández.**
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Pseudomonas putida es una bacteria conocida por su capacidad para degradar una gran cantidad de compuestos aromáticos, incluido el ácido 3,4,5-trihidroxibenzoato (ácido gálico, GA), un compuesto muy abundante en la naturaleza que procede de la degradación de polímeros vegetales, tales como la lignina o los taninos. Dado que se desconocían los determinantes genéticos responsables del catabolismo del GA, el objetivo de esta Tesis ha sido el estudio molecular de la degradación de este compuesto en la bacteria modelo *P. putida* KT2440.

Se ha identificado el primer *cluster* génico, (*galTAPgalRgalBCD*), involucrado en la degradación completa de GA que se describe en la literatura, y se ha diseñado una casete génica *gal* móvil y capaz de transferir la capacidad de crecer en GA a otras bacterias, e.g., *E. coli*.

El gen *galA* codifica la primera galato dioxigenasa que se describe en la literatura, la cual actúa sobre GA para producir la forma ceto del ácido 4-oxalmesaconato (OMAceto) y cuya novedosa arquitectura molecular la convierte en el prototipo de un nuevo subgrupo de extradiol-dioxigenasas. El gen *galD* codifica una ácido 4-oxalmesaconato ceto-enol isomerasa, segunda etapa en la degradación de GA, siendo la primera vez que se describe esta actividad enzimática en la literatura y constituyendo el prototipo de un nuevo grupo de isomerasas no caracterizadas hasta ahora. Igualmente, se ha demostrado que el gen *galB* codifica una hidratasa, la cual actúa sobre la forma enol del OMA originando ácido 4-oxalcitromálico (CHA). Estudios sobre las relaciones estructura-función de GalB han demostrado que se trata de una zinc-hidratasa perteneciente a la superfamilia de las zinc-hidrolasas, representando el prototipo de un nuevo grupo de hidratasas. Finalmente, se ha demos-

trado que el gen *galC* codifica una CHA aldolasa que produce la rotura del CHA produciendo piruvato y oxalacetato.

Por otro lado, el gen *galT* codifica un transportador de la familia MFS que utiliza la fuerza protón-motriz para energizar el transporte, siendo esencial tanto para el crecimiento en GA como para la quimiotaxis hacia este compuesto. Además, se ha demostrado que el gen *galP* codifica una porina de membrana externa de la familia OpdK que contribuye a un eficiente transporte de GA cuando éste se encuentra a bajas concentraciones.

El cluster *gal* se organiza en tres unidades transcripcionales, *galTAP*, *galR* y *galBCD* controladas por los promotores *Pt*, *Pr* y *Pb*, respectivamente, estando regulados por el producto del gen *galR* que codifica un regulador transcripcional de la familia LysR (LTTRs). GalR actúa activando los promotores catabólicos (*Pt* y *Pb*) y reprimiendo a *Pr*, siendo el OMA el metabolito inductor. Estudios de estructura-función del regulador GalR, así como estudios de unión DNA-proteína, sugieren que GalR es el prototipo de un nuevo subgrupo de LTTRs, que posee dos dominios hélice-giro-hélice (HTH) en su extremo N-terminal y un mecanismo de activación diferente al establecido para los reguladores clásicos LTTRs. El sistema regulador GalR/*Pb* se ha utilizado para el diseño del primer biosensor celular de GA. Finalmente, un modelo sobre la evolución del cluster *gal* en bacterias ha sido propuesto.

Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: aplicaciones biotecnológicas

Laura Isabel de Eugenio Martínez

Directores: **Maria Auxiliadora Prieto Jimenez y Pedro Garcia Gonzalez.**
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros de reserva que muchas bacterias sintetizan en condiciones de desequilibrio nutricional y exceso de fuente de carbono, muy interesantes desde el punto de vista industrial por sus propiedades similares a las de los plásticos de la industria petroquímica. Además, todos los monómeros de 3-hidroxiácidos incorporados en la molécula son enantioméricamente puros y de la forma *R*, por lo que se ha planteado el uso de los PHAs como fuente de estos valiosos sintones. Dependiendo del microorganismo productor y de la fuente de carbono suministrada los PHA pueden ser scl-PHA (PHA de cadena corta, a partir de monómeros de hasta 4 átomos de carbono) o mcl-PHA (PHA de cadena media, con monómeros de 5 o más átomos de carbono). Los genes

implicados en la síntesis y degradación de PHA en las bacterias del género *Pseudomonas* son *phaC1* y *phaC2*, codificantes de polimerasas; *phaZ*, codificante de una despolimerasa; *phaD*, que codifica una proteína reguladora de la familia TetR y *phal* y *phaF*, codificantes de las fasinas PhaF y Phal. En esta Tesis Doctoral se ha analizado en profundidad la expresión del gen *phaZ* de la cepa modelo en biotecnología ambiental *P. putida* KT2442 en relación al resto de los genes del cluster mediante RT-PCR en tiempo real. Así, se ha determinado que existen dos promotores principales que dirigen la transcripción de los genes *pha*, P_{C1} y P_I . De igual modo, se ha estudiado el efecto del medio de cultivo sobre la transcripción de *phaZ* y la localización de la proteína PhaZ en el interior celular. Dicha enzima ha sido purificada a homogeneidad electroforética y caracterizada bioquímicamente. De igual modo, se han analizado los productos de reacción, mediante LC-MS y ESI-MS. En una siguiente aproximación se ha realizado una comparación entre despolimerasas intra y extracelulares del género *Pseudomonas*. De este análisis se extrajo la información necesaria para realizar experimentos de mutagénesis al azar sobre PhaZ de KT2442, obteniendo versiones mutantes de la enzima con actividad esterasa y despolimerasa aumentada. Por último, se han diseñado aplicaciones biotecnológicas para la obtención de 3-hidroxiácidos y oligómeros enantiopuros utilizando cepas productoras de despolimerasas intra y extracelulares de *Pseudomonas*.

Degradación de compuestos aromáticos en *Rhodococcus sp.* estirpe TFB

Laura Tomás Gallardo

Directores: **Eduardo Santero Santurino y Belén Floriano Pardo.**
Universidad Pablo de Olavide.

En esta Tesis Doctoral se ha realizado la caracterización taxonómica y fisiológica de una nueva estirpe bacteriana, denominada TFB, aislada de los fangos del río Rhin (Alemania) que se ha adscrito al género *Rhodococcus*.

Una de las características más importantes de la estirpe TFB es su capacidad de metabolizar un amplio rango de compuestos aromáticos utilizándolos como fuente de carbono y energía. En este trabajo se han descrito las rutas de degradación de los tres compuestos aromáticos seleccionados: ftalato, tetralina y naftaleno. Para la caracterización de la degradación de estos compuestos se ha empleado una aproximación proteómica, poniéndose a punto la metodología 2D-DIGE para comparar el proteoma de la bacteria en diferentes condiciones de cultivo. La identificación de proteínas específicamente inducidas en cada condición ha permitido tanto el establecimiento de las rutas de degradación para cada compuesto como el conocimiento de la respuesta fisiológica de la bacteria a los mismos. Mediante genética reversa se han determinado los genes implicados en cada ruta pudiéndose completar

el trabajo con estudios de regulación de la expresión génica de rutas catabólica en *Rhodococcus sp.* estirpe TFB.

Intervención de los probióticos en la modulación de funciones inmunes. Acción de *Lactobacillus plantarum* en la inducción de muerte celular

M^a Elena Puertollano Vacas

Directores: **Manuel A. de Pablo Martínez, M^a Ángeles Puertollano Vacas y Alfonso Ruiz-Bravo López.**
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad de Jaén.

A lo largo de los últimos años el interés por el efecto que los probióticos tienen sobre la salud y en especial sobre el sistema inmune ha crecido considerablemente. El término probiótico deriva del griego “pro bios” para la vida y con él se ha designado a distintos microorganismos que ejercen un efecto beneficioso en humanos y animales. En el 2001 la FAO/WHO definió a los probióticos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso en la salud del hospedador”. *Lactobacillus plantarum* es la especie del género *Lactobacillus* más frecuentemente aislada en el tracto gastrointestinal de humanos. Además aglutina varios de los requisitos deseables en un probiótico tales como la resistencia a pH ácido y sales biliares, producción de sustancias antimicrobianas (plantaricina) y adhesión a las células del epitelio intestinal.

En este trabajo de investigación trabajamos con una cepa de *L. plantarum* aislada de kéfir. Una vez comprobada la resistencia a ácidos y sales biliares (así como otras características deseables en un probiótico) nos propusimos evaluar el efecto que la administración oral del lactobacilo, tenía sobre el sistema inmune de animales sometidos posteriormente a un estado de shock séptico por el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*. Tras evaluar distintos parámetros relacionados con la función inmune (tasa de supervivencia tras infección con el patógeno, recuperación de *L. monocytogenes* viables desde bazo e hígado, actividad bactericida de macrófagos peritoneales y determinación de citoquinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y moléculas de adhesión) comprobamos que el tratamiento con el probiótico provocaba una disminución en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6) y un incremento de citoquinas involucradas en la defensa del huésped frente a patógenos intracelulares (IL-12 e IFN- gamma). Esta reducción de la respuesta inflamatoria en ningún momento comprometía la supervivencia del huésped ni empeoraba la respuesta del mismo frente a la infección por lo que concluimos que la administración de *L. plantarum* podría suponer un beneficio en el manejo de desórdenes de tipo

inflamatorio ya que disminuye la respuesta inflamatoria del huésped sin que se incremente la susceptibilidad de este a la infección.

Por otro lado también evaluamos el efecto *in vitro* que el sobrenadante procedente del cultivo de esta cepa de *L. plantarum*, tenía sobre la línea de células tumorales HL-60 y sobre una cepa patógena de *Escherichia coli*. En el caso de HL-60 comprobamos que el sobrenadante provocaba muerte celular en el cultivo mediante necrosis, hecho que confirmamos mediante la realización de distintos ensayos encaminados a evaluar los mecanismos de muerte celular que desencadenaba el sobrenadante, como la medida de lactatodeshidrogenasa, marcaje con iodo de propidio, externalización de fosfatidil serina y otras. Por último comprobamos que el sobrenadante de *L. plantarum* era capaz de producir un efecto bacteriostático en el crecimiento de una cepa patógena de *E. coli* y que este efecto estaba mediado por un incremento en la permeabilidad de membrana de la bacteria, hecho que comprobamos mediante marcaje fluorimétrico con sitox green.

Elementos genéticos móviles y resistencia a antimicrobianos en serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica*

Irene Rodríguez Fernández

Directoras: **M. Carmen Mendoza Fernández y M. Rosario Rodicio Rodicio.**

Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional; Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo.

La emergencia y diseminación de resistencias antimicrobianas supone un problema para la salud pública y la sanidad animal puesto que pone en serio peligro la eficacia del principal tratamiento contra las infecciones bacterianas. Por este motivo son especialmente interesantes los estudios centrados no sólo en la identificación de los determinantes de resistencia, sino también de los mecanismos que intervienen en su dispersión. En este contexto, la presente Tesis Doctoral profundiza en la incidencia y caracterización molecular de elementos genéticos implicados en la captura, diseminación y mantenimiento de genes de resistencia a antimicrobianos por cepas de serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica*, un patógeno bacteriano que, por su carácter zoonótico, podría estar ocupando un lugar relevante como donador y receptor de genes de resistencia. Los puntos desarrollados en este trabajo fueron fundamentalmente tres:

1.—Se demostró el importante papel que juegan los integrones de clases 1 y 2, constatando su presencia en un gran número de cepas multiresistentes (mayoritariamente clínicas), aisladas en el Principado de Asturias y el resto de España. Dos hechos destacables fueron: a) la nueva descrip-

ción de los integrones de clase 1 con las regiones variables: 2300 pb/*estX-smr-aadA1* y 2100 pb/*dfrA1-597pb-aadA24*; y b) la primera identificación de integrones de clase 2 en los serotipos *S. Virchow*, *S. Grumpensis*, *S. Panama* y *S. Worthington*. Se confirmó la asociación de estas unidades genéticas con elementos transponibles, observando diferentes configuraciones integrón de clase 1-transposón tipo Tn21 o integrón de clase 2-transposón tipo Tn7. Además, en la mayoría de los casos estas estructuras se encontraban localizadas en plásmidos conjugativos de gran tamaño, a veces portadores de resistencias adicionales no asociadas a integrones.

2.—Dada la creciente emergencia de las resistencias a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, se rastrearon β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y enzimas plasmídicas tipo AmpC en cepas alemanas procedentes de alimentos y animales. Subraya que la familia de cefotaximasas CTX-M-1 era la más frecuente, y se encontraba asociada a secuencias de inserción tipo ISEcp1. Tanto los genes de BLEEs como de enzimas AmpC, se localizaban en plásmidos de tamaño variable, la mayoría conjugativos.

3.—Otro hecho alarmante, dentro del panorama de la multiresistencia, es la aparición de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia. En esta Tesis Doctoral se identificó y caracterizó parcialmente un plásmido, denominado pUO-SeVR1, que se encontró en un aislamiento de *S. Enteritidis*, el serotipo con mayor incidencia en infecciones humanas. Los resultados obtenidos sugieren que deriva de pSEV (el plásmido de virulencia específico de *S. Enteritidis*) por haber adquirido genes de resistencia asociados a un integrón y a diversos elementos transponibles. A la vez se desvelan algunos de los mecanismos que controlan la transmisión estable del plásmido dentro de la población bacteriana.

Esta Tesis Doctoral ilustra el concepto de “ingeniería evolutiva” que, aplicado en este contexto, refleja la importancia que las secuencias “acompañantes” de un gen y sus propiedades combinatorias tienen en la adaptabilidad bacteriana.

Biology of *Ralstonia solanacearum* phylotype II in host and non-host environments

María Belén Álvarez Ortega

Directoras: **Dr. María Milagros López González y Dr. Elena González Biosca.**

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Universidad de Valencia.

The *Ralstonia solanacearum* species complex causes bacterial wilt, a plant disease affecting economically important crops and ornamentals worldwide. The phylotype (ph) II race 3 biovar (bv) 2 produces potato brown rot and bacterial wilt in solanaceous plants in temperate

climates and has recently been introduced to several areas of the European Union and the USA, where the pathogen has a quarantine status. Presence of *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 in these zones raised questions on biological and phytopathological aspects of this bacterium, some of them being addressed in this work. Thus behaviour, ability for survival and disease inducing capacity of European *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 have been assessed in a range of different plant species and diverse surface run-off water samples.

Behaviour of *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 *in planta* has led to a classification in susceptible or tolerant hosts and non-hosts, based on the pathogen histological localization and isolation. Susceptible and tolerant hosts were highly invaded in root xylem but, heavily or weakly colonized respectively in stem xylem. They are to be avoided as candidates for crop rotation. Non-hosts were not invaded in plant xylem but, occasional presence of the pathogen in root cortex or on surface might occur and so, some of them might act as reservoirs. They could be selected for crop rotation systems after being carefully tested in open field conditions.

Ability for survival of *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 in environmental water microcosms has been influenced by abiotic and biotic factors. When faced to oligotrophy as the only stressing factor the pathogen displayed a considerable endurance. It resorted to a number of survival strategies which enabled it to survive in environmental water microcosms over four years under starvation, retaining disease inducing capacity in the host even by watering. Adaptations to overcome nutrient limitation during the long period were starvation-survival responses, the entrance into a viable but non-culturable state, progressive transformation from the typical bacillar shape into coccoid forms reduced in size, filamentation and budding phenomena and aggregation.

Survival strategies were also successfully exhibited by the pathogen when exposed to environmental temperatures simultaneously to nutrient scarcity conditions. Thus, at 4°C a viable but non-culturable state dependent on water nutrient contents was cold-induced, whilst at 14°C and 24°C apparently similar starvation-survival responses revealed a distinct effect of temperature on coccoid formation.

On the other hand, indigenous freshwater protozoa, bacteria and/or phages with predatory, competitive or lytic activity reduced significantly pathogen persistence. Among them, lytic bacteriophages were the main responsible for the decrease in *R. solanacearum* populations, although protozoa and other bacteria also contributed. The effect was more appreciable at 24°C than at 14°C because of slower biotic interactions at the lower temperature. The pathogen was able to adapt itself, succeeding in surviving and keeping pathogenic in almost all conditions.

This work intends to contribute to the progress in the knowledge of the interactions between *R. solanacearum* ph II race 3 bv 2 and natural environments, which may allow to improve the strategies to prevent pathogen dissemination and bacterial wilt spread in natural settings.

Expresión heteróloga de la proteína mayor de la cápsida (L1) del virus del papiloma humano tipo 18. Purificación y caracterización de las proteínas recombinantes y partículas similares al virus (VLPs).

Mónica Martínez Martínez

Directoras: **Laura Benítez Rico y Marta Ortiz Rivera.**

Departamento de Microbiología-III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid y Servicio de Diagnóstico y Referencia de Retrovirus y Papilomavirus, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

La infección con el virus del papiloma humano (VPH) es la ETS más común en mujeres. Un tercio de los VPH mucosotrópicos, denominados de alto riesgo, están relacionados con el cáncer de cérvix, siendo el tipo 18 el segundo más frecuente. El 60% de las mujeres infectadas sufrirán seroconversión con anticuerpos neutralizantes dirigidos a epítopos conformacionales de la proteína mayoritaria de la cápsida (L1). Si bien los títulos de anticuerpos tras la infección natural son bajos, los adquiridos tras la vacunación son 40 a 100 veces superiores.

La producción de antígenos de VPH es necesaria para estudiar la respuesta humoral frente a la infección natural así como en población vacunada, dado que se desconoce la duración de la protección conferida por la vacunación. El objetivo del trabajo fue la comparación de la producción la proteína L1 de VPH18 como proteína recombinante en tres sistemas heterólogos: bacterias (*Escherichia coli*), levaduras (un sistema basado en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*) y en células de insecto (empleando baculovirus recombinantes).

En *E. coli* la expresión se realizó como proteínas de fusión con GST observándose la formación de cuerpos de inclusión. El tratamiento con lisozima, agentes reductores y detergentes durante la lisis y/o solubilización de la fracción insoluble, incrementó su recuperación. La purificación cromatográfica combinada con elución en PBS/urea, permitió eliminar proteínas bacterianas coprecipitantes. La proteína GST-ΔN7118L1 fue reconocida en Westernblot y ELISA por sueros comerciales y humanos de infección natural.

En *P. pastoris* se detectó transcripción específica de las proteínas a niveles basales no inducibles por metanol, pero no traducción, planteándose que puedan existir secuencias en la región de VPH18 que se va a expresar relacionadas con la terminación prematura de la transcripción en levaduras, que requerirán un análisis más detallado para su identificación.

Finalmente se purificaron *Virus Like Particles* (VLPs) de VPH18 en células de insecto empleando baculovirus recombinantes. Para optimizar la pro-

ducción de VLPs, se realizó un estudio previo de la cinética de expresión de la proteína en este sistema, ya que a diferencia del prototipo VPH16, la producción en este tipo es más costosa y menos eficiente. Para ello se analizaron diferentes parámetros que afectan a la expresión como las líneas celulares utilizadas (Sf9 y Sf21), presencia/ausencia de suero fetal bovino en el medio, los índices de multiplicidad de la infección (MOIs) empleados y el tiempo de infección. Los estudios de cinética pusieron de manifiesto los parámetros óptimos para la producción y purificación de VLPs de VPH18 (línea Sf21, medio suplementado con SFB, MOI 10 y tiempo de infección de 48 horas). Dichas partículas fueron analizadas cualitativamente por microscopía electrónica y *Dynamic Light Scattering* (DLS), observándose discordancias entre los resultados obtenidos por ambas técnicas cuando las muestras se diluyen a concentraciones inferiores al límite necesario para el ensamblaje.

Estudio de la interacción física y funcional de la proteína fosfatasa dual Msg5 con MAP quinasa en *Saccharomyces cerevisiae*

María Jose Marín Cuenda

Directores: **María Molina Martín y Humberto Martín Brieva.**

Dpt. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Las fosfatasas de especificidad dual (DUSPs) desempeñan un papel clave en la modulación de la activación de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs. Dentro de este grupo se encuadra Msg5, una DUSP de *Saccharomyces cerevisiae* que se expresa en la célula como dos isoformas de distinto peso molecular debido a la presencia de comienzos de traducción alternativos. En concreto, esta fosfatasa regula negativamente la activación de las MAPKs de la ruta de integridad celular, Slt2, y de la ruta de apareamiento, Fus3, tanto en condiciones basales como de estimulación de ambas cascadas.

En este trabajo, se ha comprobado que en ausencia de Msg5 se induce la expresión de genes regulados por la ruta de apareamiento y de integridad celular, lo cual indica que la actividad de esta fosfatasa regula la respuesta a daño en la pared y a la presencia de feromona. Sin embargo, los mutantes *msg5Δ*, aunque muestran una elevada fosforilación de Slt2, no muestran un elevado nivel de expresión de los genes regulados por la ruta de integridad celular. Es decir, que la fosforilación de la MAPK Slt2 ocasionada por la falta de Msg5 no se traduce en un aumento de la fosforilación de los sustratos sobre los que actúa; entre ellos, no se detecta fosforilación de Mkk1 o Msg5 dependiente de Slt2, ni del factor de transcripción Rlm1 y como consecuencia no se logra una respuesta transcripcional dependiente de Rlm1 plena.

Los ensayos de copurificación demuestran que la isoforma larga de Msg5 presenta más afi-

nidad de unión a las MAPKs Fus3 y Kss1 que la isoforma corta, mientras que ambas isoformas interaccionan de manera similar con Slt2. Esta mayor afinidad de la isoforma larga se traduce en mayor actividad fosfatasa hacia la MAPK Fus3. A pesar de que Msg5 es capaz de interaccionar con Kss1 y de regular su fosforilación en condiciones de sobreexpresión, el análisis transcriptómico y los ensayos de fosforilación en mutantes *msg5Δ* demuestran que esta fosfatasa no regula la actividad de Kss1 ni en condiciones basales ni en las condiciones de activación de Kss1 ensayadas. Mediante el sistema de doble híbrido se ha comprobado que los 125 primeros aminoácidos de Msg5 son esenciales para la interacción con las MAPKs Slt2, Fus3 y Kss1, y que tan sólo los 45 primeros aminoácidos son necesarios para la unión a las dos últimas MAPKs. Se han identificado dos posibles dominios de interacción con MAPKs (dominios *docking*) en esta pequeña región de 125 aminoácidos del extremo N-terminal de Msg5, y se ha demostrado que MD2 no juega un papel relevante en la unión a ninguna de las 3 MAPKs ni en la regulación de su actividad. Sin embargo, el primer dominio MD1, situado dentro de los 45 primeros aminoácidos, media la unión a Fus3 y Kss1. La integridad del CD (*common docking*) en Fus3 y Kss1, es necesaria para la interacción con Msg5, a diferencia de lo que ocurre en Slt2 en la que no parece estar implicado este dominio para su unión a la fosfatasa. Estos hechos sugieren que la interacción de Slt2 con Msg5 no viene mediada por interacciones tipo *docking* convencionales como en el caso de Fus3 y Kss1 y que otras regiones de la zona amino-terminal de Msg5 deben estar implicadas en la interacción ente Msg5 y Slt2.

Evaluación y optimización del carácter antimicrobiano de películas basadas en quitosano para su aplicación en envases activos y recubrimientos alimentarios

Patricia Fernández Saiz

Directores: **M^a José Ocio Zapata y Jose María Lagarón Cabello.** Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA, CSIC). Universidad Politécnica de Valencia.

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido el estudio del quitosano como antimicrobiano para su empleo como material de envase alimentario con el fin de mantener la seguridad microbiológica del producto envasado. Para ello se analizaron numerosas variables esenciales relacionadas con el microorganismo, con las características del polímero y las condiciones de formación y almacenamiento de sus películas, todas ellas capaces de influir en las propiedades biocidas del compuesto. Además, se analizó su mecanismo de acción mediante espectroscopía de infrarrojo, a través de los cambios en la inten-

sidad de dos bandas principales correspondientes a los grupos activos antimicrobianos. Dado que la elevada sensibilidad al agua de las matrices de quitosano podría suponer una restricción fundamental para su aplicación en el envasado de alimentos, se desarrollaron películas compuestas resistentes al agua incorporando quitosano en otras matrices insolubles. Las mezclas resultantes mantuvieron un efecto antimicrobiano significativo además de presentar una excelente mejora en sus propiedades barrera al agua. Por último, se confirmó la eficacia de las películas obtenidas sobre un alimento real, obteniéndose resultados satisfactorios y alcanzándose, por tanto, el objetivo fundamental planteado inicialmente de mantener la seguridad microbiológica del producto envasado y alargar su vida útil.

Análisis genómico y funcional de la interacción planta-*Pseudomonas putida* KT2440 en la rizosfera: colonización y resistencia sistémica

Miguel Ángel Matilla Vázquez

Directores: **Juan Luis Ramos Martín y María Isabel Ramos González.**
Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada).

El entorno de la raíz y la región del suelo que la rodea constituyen la rizosfera, un hábitat de elevada actividad microbiológica. Al inicio de este trabajo sabíamos que la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 es una eficiente colonizadora de la rizosfera y la espermosfera de plantas con relevancia agronómica (ej. *Zea mays*). En esta Tesis Doctoral se presenta el primer análisis genómico con microarrays llevado a cabo con una bacteria en la rizosfera. Este estudio tiene la originalidad de considerar el estilo de vida sésil y ha desvelado que el microorganismo ajusta su expresión génica a este particular estilo de vida. Entre los 90 genes *rup* ("rhizosphere up-regulated") con inducción preferencial identificados, resultaron de especial interés *rup2560*, perteneciente al sistema de secreción de una hemoperoxidasa extracelular codificada por el locus PP2561, y *rup4959*, que codifica un regulador de respuesta con dominios GGDEF/EAL. Estos dominios enzimáticos están implicados en la síntesis y degradación, respectivamente, del segundo mensajero intracelular diguanilato cíclico (di-GMPc), del que es conocido su papel en la transición de sesilidad a motilidad. Evaluando la eficiencia competitiva de algunos mutantes en genes *rup* se han identificado nuevas funciones bacterianas relevantes en colonización tales como el metabolismo de compuestos aromáticos y la resistencia a estrés oxidativo.

Aunque se habían descrito ciertas propiedades de KT2440 en la promoción del crecimiento, no se había explorado su potencial en biocontrol. Un aspecto importante de este trabajo ha sido evidenciar la capacidad de KT2440 para proteger

a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* de la infección por el fitopatógeno *P. syringae* mediante resistencia sistémica inducida (ISR). Excepcionalmente, la manifestación de resistencia sistémica en presencia de KT2440 requiere las vías de señalización de salicílico y de jasmónico/etileno intactas. Además, la utilización de un mutante PP2561 nos ha permitido establecer una relación entre colonización, ISR y composición de los exudados radiculares.

Un aspecto clave en colonización es la motilidad bacteriana. Hemos explorado la importancia de la motilidad en superficie en este contexto. La motilidad tipo "swarming" tiene lugar a temperatura inferior a 30°C, es dependiente de pili de tipo IV, de lipopolisacáridos y de la disponibilidad intracelular de hierro a través del sideróforo pioverdina. La sobreexpresión del gen *rup4959* inhibe completamente el "swarming" y tiene un efecto negativo sobre la colonización del ápice radicular. La transcripción de este gen depende de σ^{38} y se activa en presencia de exudados radiculares y en microaerobiosis. Nuestras evidencias bioquímicas indican que *Rup4959* presenta actividad diguanilato ciclasa. En la rizosfera, esta proteína es responsable directa o indirectamente de cambios en la transcripción de varios genes. Además del efecto sobre la motilidad, la sobreexpresión de este gen provoca la aparición de un fenotipo pleiotrópico consistente en, (i) la sobreproducción de exopolisacáridos, (ii) la mayor formación de biopeículas, tanto en superficies abióticas como en la interfase aire-líquido, y (iii) la aparición de una morfología de colonia rugosa. En la formación de biofilm es esencial la adhesina LapA, aunque un mutante en esta proteína todavía manifestaba alteración en los otros dos caracteres fenotípicos. Sin embargo un exopolisacárido específico de KT2440, aún sin caracterizar, y los lipopolisacáridos fueron esenciales para la implantación del fenotipo pleiotrópico causado por un incremento en los niveles de di-GMPc.

Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino

Nerea García Benzaquén

Directores: **José Francisco Fernández-Garayzábal Fernández, Joaquín Goyache Goñi y Ana Isabel Vela Alonso.**

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

Pasteurella multocida es una bacteria comensal del tracto respiratorio que puede dar lugar a diferentes patologías en distintas especies animales en todo el mundo. En el ganado porcino es el agente responsable de la rinitis atrófica progresiva (RAP) y de procesos neumónicos, formando parte del complejo respiratorio porcino, que es causa de importantes problemas sanitarios y económicos en las explotaciones de cría intensiva.

Además, en ocasiones, puede dar lugar a procesos septicémicos.

Se trata de una especie muy heterogénea en la que se distinguen tres subespecies (*multocida*, *gallicida* y *septica*), 14 biovars (1-14), 5 tipos capsulares (A, B, D, E y F) y 16 serotipos (1-16).

El principal objetivo de nuestro estudio fue el de caracterizar fenotípica y genéticamente aislados de *P. multocida* obtenidos a partir de diferentes muestras clínicas, principalmente neumónicas, de ganado porcino de diferentes regiones de España.

Se identificaron 205 aislados mediante el empleo de métodos bioquímicos (API 20E) y moleculares (PCR), confirmando que pertenecían a la especie *P. multocida*. Se determinó que existían diversos patrones bioquímicos, siendo algunos prevalentes, agrupando, de este modo, en 4 de ellos el 64% de los aislados.

Mediante diferentes pruebas bioquímicas se determinó que todos los aislados pertenecían a la subespecie *multocida*, siendo clasificados en un escaso número de biovars (1, 2 y 3). De ellos el biovar 3 fue el que se halló con una mayor prevalencia, resultado esperado, seguido del biovar 2 que, sin embargo, representaba una proporción considerablemente mayor (40%) a la hallada en estudios previos.

La determinación del tipo capsular mediante PCR permitió clasificar la mayoría de aislados en el tipo A (79%), siendo el resto de los tipos capsulares D (18,5%) y F (0,02%). Por otra parte, se detectó la presencia de la toxina dermonecrotica (PMT) únicamente en 16 aislados (7,8%). Estos resultados entran dentro de lo esperado, ya que la mayoría de las muestras procedían de procesos neumónicos en los que, generalmente, están implicadas cepas de tipo capsular A que carecen de la PMT. Además, la secuenciación del gen que codifica para la PMT de dos aislados de tipo capsular A, permitió comprobar que la secuencia era prácticamente idéntica a la del gen de cepas de tipo capsular D.

Respecto a la presencia de determinados genes asociados a la virulencia se demostró, utilizando para ello PCR simples y múltiples, que la mayoría de ellos estaban presentes en todos los aislados. Así, los genes *psl*, *ompH*, *oma87*, *ptfA*, *nanB*, *nanH*, *tonB*, *hgbA*, *sodA* y *sodC* estuvieron presentes en el 100% de los aislados, mientras que el gen *tbpA* no se encontró en ninguno de ellos. Sin embargo, la prevalencia de los genes *pfhA* y *hgbB* fue variable (40% y 60%, respectivamente) y curiosamente estuvieron asociados al biovar. De este modo todos los aislados del biovar 2 poseían el gen *pfhA* y los de biovar 3 tenían el gen *hgbB*.

Por último, se utilizó la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE), calificada como el método "gold estándar" para la caracterización molecular de cepas de *P. multocida*. Mediante dicho procedimiento se pudieron clasificar los 205 aislados en 69 patrones diferentes, lo que suponía una diversidad genética moderada (0,31). A pesar de la variabilidad de perfiles de PFGE se pudo destacar la presencia de ciertos patrones prevalentes que se distribuían por las diferentes empresas productivas y regiones geográficas, permaneciendo a lo largo del tiempo. Además, se evidenciaron dos grupos genéticos

(con una similitud del 45%), diferenciándose claramente la población de cepas del biovar 2 de la población de cepas del biovar 3.

Detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en alimentos vegetales mediante PCR a tiempo real

Patricia Elizaquível Bárcenas

Directora: **Rosa Aznar Novella.**

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.

La detección y cuantificación de microorganismos patógenos en alimentos es uno de los grandes retos a los que se enfrenta la industria alimentaria actualmente. Para minimizar riesgos y garantizar la calidad y seguridad de los productos, la aplicación de controles microbiológicos en la cadena de procesado es imprescindible. Los métodos tradicionales para la detección de patógenos en alimentos se basan en el aislamiento e identificación de colonias en medios selectivos tras varios pasos de enriquecimiento lo que alarga el proceso y, en ocasiones, el resultado no es concluyente. Como alternativa destacan los métodos inmunológicos y los de PCR. Entre los primeros, el VIDAS® es uno de los más utilizados por las empresas de alimentos por su facilidad de ensayo. Por otra parte, las técnicas de PCR constituyen una buena alternativa por su rapidez, sensibilidad y precisión. La PCR a tiempo real (RTi-PCR), además, ofrece la posibilidad de cuantificar los microorganismos presentes en la muestra automatizando el proceso, lo que permite procesar un número elevado de muestras.

En este trabajo se ha aplicado la RTi-PCR, para la detección de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *St. aureus*, evaluándose asimismo su utilidad como prueba diagnóstica en el control microbiológico de alimentos. La comparación de cuatro métodos comerciales de extracción de DNA, demostró que el método DNeasy Tissue Kit es el más eficiente para los cuatro patógenos, en las tres matrices vegetales ensayadas. La aplicación directa de la RTi-PCR en muestras de alimentos de contaminación natural permitió la cuantificación de los patógenos presentes en el 67% de las muestras que habían resultado positivas por PCR convencional tras el enriquecimiento correspondiente, revelando que *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 se encuentran generalmente en niveles de 10^3 ufc/g, *L. monocytogenes* de 10^2 ufc/g y *St. aureus* de 10 ufc/g. Las muestras restantes (33%) presentaron niveles inferiores a 10 ufc/g. La comparación de la RTi-PCR directa y el mini-VIDAS determinó que ambas técnicas presentan una

especificidad similar pero la RTi-PCR se comporta mejor en cuanto a “sensibilidad” y “seguridad”. En base a estos resultados, proponemos la utilización de la RTi-PCR para rastrear la presencia de patógenos en el análisis rutinario de alimentos ya que ha demostrado ser rápida y sensible. Sólo las muestras negativas se analizarían por PCR convencional, tras enriquecimiento, para asegurar la ausencia del patógeno.

Además, se diseñó un nuevo sistema de cebadores y sonda TaqMan para *Salmonella* spp. Combinando este sistema con los ensayos para *E. coli* O157:H7 y *St. aureus*, se ha puesto a punto una reacción de RTi-PCR múltiple para la detección simultánea y cuantitativa de los tres patógenos. La aplicación de la RTi-PCR múltiple, tras un paso enriquecimiento de tan sólo 6 horas permite la detección de hasta 1 célula de cada uno de los patógenos en 25 g. Por lo tanto, queda demostrada su validez como técnica analítica cuando la legislación exige “ausencia” del patógeno en 25 g, como es el caso de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 o de *St. aureus* en algunos alimentos.

Bacterias probióticas en leche fermentada. Viabilidad, capacidad competitiva y efecto en la evolución de patologías intestinales

Raquel Tabasco Rentero

Directoras: **Teresa Requena Rolanía y Carmen Peláez Martínez.**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos, Instituto del Frío - CSIC.

La presente Tesis Doctoral describe los posibles mecanismos por los que bifidobacterias y lactobacilos influyen en el equilibrio de la microbiota intestinal y su posible repercusión en la evolución de la diarrea asociada al tratamiento antibiótico. Para llevar a cabo el estudio, se trabajó en la obtención de una leche fermentada que contenía dosis elevadas de bacterias probióticas viables. Los métodos de evaluación de viabilidad se realizaron con medios de cultivo libres de antibióticos que permitían diferenciar las cepas probióticas (*Bifidobacterium lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Lactobacillus casei* LC-01) de las bacterias del yogur *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). La determinación de viabilidad de las bacterias en estudio sin previo aislamiento en medios de cultivo y, por lo tanto, con una mayor rapidez de detección y cuantificación, se realizó mediante PCR a tiempo real asociada con monoazida de propidio.

Se determinó la capacidad de las cepas probióticas para colonizar el intestino, analizando la capacidad de exclusión competitiva de *L. acidophilus* LA-5 frente a cepas patógenas intestinales, como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enterica*. Además, se analizó el metabolismo fermentativo de las bacterias probióticas y se observó que tenían actividad β -fructofuranosidasa únicamente cuan-

do se habían crecido en presencia de oligofruktosa. El análisis de la producción de ácidos orgánicos por las cepas probióticas detectó la formación de los ácidos láctico, acético y fórmico. Por otra parte, se demostró que *L. acidophilus* LA-5 producía la bacteriocina lactacina B cuando crecía en co-cultivo con células viables de *S. thermophilus* o *L. bulgaricus*. La expresión de lactacina B en esta cepa está regulada por un mecanismo señal de auto-inducción a través de un péptido inductor secretado por la bacteria que activa un sistema regulador compuesto por una histidin kinasas y un regulador de respuesta.

La evaluación de la eficacia de las cepas probióticas suministradas en leche fermentada para reducir la diarrea asociada a tratamiento antibiótico se llevó a cabo mediante un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo (leche fermentada sin las cepas probióticas) que se realizó en colaboración con investigadores del Hospital Universitario Fundación de Alcorcón. Se realizó el análisis de microbiota intestinal cultivable y presencia de las cepas probióticas, así como se determinaron el contenido de ácidos orgánicos y las actividades enzimáticas del contenido fecal. En conclusión, el consumo diario de las cepas probióticas en leche fermentada no causó modificaciones significativas en la composición de la microbiota intestinal ni en el metabolismo fermentativo intestinal de los pacientes y, a su vez, tampoco se observaron diferencias significativas en la aparición de diarrea en los pacientes.

Determinantes moleculares que participan en la interacción *Fusarium oxysporum* – tomate

Yolanda Pareja Jaime

Directores: **M. Isabel González Roncero y M. Carmen Ruiz Roldán.**
Departamento de Genética, Universidad de Córdoba.

En este trabajo se han investigado las bases moleculares que determinan la patogenicidad del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre plantas de tomate.

F. oxysporum produce la enzima tomatinasa Tom1, que degrada el compuesto antifúngico a-tomatina hasta derivados menos tóxicos. Para estudiar el papel de *tom1* en la virulencia de *F. oxysporum*, se ha realizado la interrupción dirigida y la expresión constitutiva del gen. El proceso de infección de plantas inoculadas con transformantes de expresión constitutiva resulta en un incremento en el desarrollo de los síntomas de enfermedad, mientras que las plantas infectadas con mutantes nulos muestran un retraso en el proceso de infección, sugiriendo que Tom1, aunque no es esencial para la patogenicidad, es necesaria para la virulencia completa de *F. oxysporum*. La actividad tomatinasa total en las estirpes deficientes se ve reducida solo un 25%, y se observa β -tomatina como el mayor producto de hidrólisis de la saponina *in vitro*. El análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum* revela la existencia de cuatro

posibles genes responsables de otras tomatinas, cuyos productos podrían ser los responsables de la actividad tomatinasa reminiscente en los mutantes *Dtom1*.

En otro capítulo se ha estudiado si la causa de la avirulencia del mutante *DchsV* de *F. oxysporum*, deficiente en un gen sintasa de quitina de clase V y capaz de penetrar la planta y colonizar los tejidos internos de la raíz, se debe a una rápida elicitación de la respuesta de defensa de la planta, que conduce a una restricción del crecimiento fúngico. La co-inoculación de plantas con la estirpe silvestre y el mutante *DchsV* resulta en una reducción significativa del desarrollo de la enfermedad, lo que sugiere que este mutante ejerce un mecanismo protector. La colonización de la planta por la estirpe silvestre queda restringida durante la co-inoculación, como demuestran los ensayos de cuantificación de la biomasa fúngica. Además, se ha comprobado el incremento en la expresión de genes de defensa de la planta y en la actividad quitinasa en plantas inoculadas con el mutante *DchsV*.

En el tercer capítulo se ha analizado el papel de *Con7* en la patogénesis de *F. oxysporum*. Se han identificado tres genes *con7* en *F. oxysporum*, ortólogos al gen *con7* del patógeno de arroz *Magnaporthe grisea*, que determina un factor transcripcional esencial para la morfogénesis y la patogénesis fúngica. Los mutantes deficientes en el gen *con7-1* de *F. oxysporum* muestran alteraciones en el crecimiento polarizado y la formación de ramificaciones, y no producen síntomas de enfermedad en plantas, lo que indica que este gen es esencial para la correcta morfogénesis y patogénesis de *F. oxysporum*. Sin embargo, el factor *Con7-1* de *F. oxysporum* no regula la transcripción de algunos genes relacionados con la biosíntesis de pared y el establecimiento de la polaridad celular.

Selección de microorganismos probióticos para su implantación en la elaboración de embutidos crudos curados de cerdo ibérico

Santiago Ruiz-Moyano Seco de Herrera

Directores: Alberto Martín González, María de Guía Córdoba Ramos y María José Benito Bernáldez.

Área de Nutrición y Bromatología, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura.

El objetivo de este estudio fue seleccionar bacterias ácido lácticas y bifidobacterias para su utilización como potenciales probióticos en la elaboración de embutidos crudos curados de cerdo ibérico. Un total de 1000 cepas se aislaron de embutidos crudos curados de cerdo ibérico (363),

heces humanas, (337) y heces de cerdo (300) en diferentes medios de cultivos. Aproximadamente un 30% de las cepas, principalmente aisladas de embutidos crudos curados en agar LAMVAB, se pre-seleccionaron para el estudio de sus propiedades probióticas, en base a su capacidad de crecimiento a las condiciones de pH y concentración de NaCl que se dan en este tipo de productos durante su procesado. En relación al estudio *in vitro* de la capacidad para tolerar las condiciones del tracto gastrointestinal, la exposición a valores de pH de 2,5 fue el criterio más selectivo. Sólo 51 de los 312 aislados preseleccionados toleraban adecuadamente este pH durante 1,5 h.

Todos los aislados ácido-tolerantes identificados como lactobacilos (18 cepas) fueron obtenidos de heces humanas (*L. casei* y *L. fermentum*) y heces de cerdo (*L. reuteri*, *L. animalis*, *L. murinus* y *L. vaginalis*). Las cepas identificadas como *P. acidilactici* (12 cepas) fueron aisladas de embutidos de cerdo ibérico principalmente y de heces de cerdo. Finalmente, trece de las quince cepas identificadas como enterococos fueron *E. faecium* y se aislaron de embutidos de cerdo ibérico, heces humanas y heces de cerdo. Estas cepas fueron evaluadas en lo referente a aspectos de seguridad y funcionales, como actividad hemolítica, susceptibilidad a antibióticos, presencia de genes de virulencia, producción de aminas biógenas y D-láctico, adhesión celular y actividad antimicrobiana frente a enteropatógenos y patógenos en alimentos.

Seis cepas mostraron las mejores propiedades probióticas: *P. acidilactici* S979, *P. acidilactici* S209, *E. faecium* S906, *L. reuteri* P519, *L. reuteri* P542, y *L. fermentum* H57. Las cepas *P. acidilactici* S979 y *P. acidilactici* S209 presentaron una capacidad de adhesión moderada a las células del epitelio intestinal, pero sólo la cepa *P. acidilactici* S979 fue capaz de inhibir competitivamente la adhesión de *S. choleraesuis*, y mostrar actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus in vitro*. *E. faecium* S906 fue capaz de adherirse moderadamente al epitelio intestinal y mostrar actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. Por último, *L. reuteri* P519, *L. reuteri* P542 y *L. fermentum* H57 mostraron una alta capacidad de adhesión a las células del epitelio intestinal, además de inhibir la adhesión de *E. coli* y *S. choleraesuis*. Estas cepas también mostraron actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. Las seis cepas se consideraron seguras para su utilización como potenciales probióticos en la elaboración de embutidos crudos curados de cerdo ibérico por su nula o baja capacidad de descarbonilación y producción de D-láctico, actividad hemolítica, resistencia a antibióticos y presencia de genes de virulencia en el caso de la cepa de enterococo.

Tres cepas, *P. acidilactici* S979, *L. fermentum* H57 y *L. reuteri* P519 se seleccionaron para la elaboración de embutidos crudos curados de cerdo ibérico en planta piloto. Los recuentos microbiológicos y propiedades sensoriales de los embutidos elaborados se compararon con un lote control. Las cepas inoculadas se identificaron a una concentración elevada, superior a 10^7 ufc/g en el producto final. Aunque no se detectaron diferencias significativas en la aceptación global de los lotes embutidos elaborados, algunos atributos

sensoriales, como color y textura, fueron mejor valorados en el caso del lote inoculado con la cepa *P. acidilactici* S979, siendo esta cepa seleccionada para su utilización como potencial probiótico en este tipo de productos.

Prevalencia de virus entéricos en moluscos cultivados en Galicia. Estudio de la fiabilidad de microorganismos indicadores de contaminación viral

Maria Luz Vilariño Becerra

Director: Jesús López Romalde.
Dept. Microbiología y Parasitología.
CIBUS-Fac. Biología. Univ. Santiago de Compostela.

En el medio acuático, se puede encontrar una gran variedad de especies de virus infecciosos para el ser humano, denominados “virus entéricos” y que se transmiten vía fecal-oral. Por ello, los moluscos obtenidos de zonas polucionadas, pueden estar contaminados con virus entéricos, constituyendo un riesgo potencial para la salud del consumidor.

La detección de virus entéricos a partir de tejidos de moluscos implica la concentración viral y la amplificación del ácido nucleico mediante RT-PCR, siendo necesaria la elección de métodos que presenten alta especificidad y sensibilidad. Los resultados obtenidos con los kits de RT-PCR evaluados en este estudio mostraron diferencias en la amplificación del RNA de HAV. La mayor sensibilidad (0,2-1 ufp/ μ L) se obtuvo con el kit Superscript™ One-Step RT-PCR System. Con respecto a los kits comerciales de extracción de RNA, los resultados mostraron que el kit Total Quick RNA Cells & Tissues (Talent) presentó mejores eficacias que el protocolo habitual usado de rutina en el laboratorio, con un límite de detección de 0,1-1 ufp/mg de tejido digestivo de mejillón.

La adecuada selección de los cebadores es otro de los pasos más importantes para lograr una sensibilidad y la especificidad adecuadas. De las parejas de cebadores evaluadas para la detección de virus de hepatitis A (HAV), la pareja con mayor sensibilidad fue HAV240/HAV68 (0,02-0,1 ufp/g de hepatopáncreas). y en la detección de Astrovirus (AsV), la mejor sensibilidad se encontró con la pareja de cebadores A1/A2 (0,1-1 ufp/g de hepatopáncreas).

La Unión Europea, establece controles para los moluscos y sus áreas de producción basados en indicadores bacterianos de contaminación fecal, específicamente *E. coli*. Sin embargo, muchos estudios demuestran que muestras que cumplen los criterios establecidos pueden no estar libres de virus. Se realizó un estudio de la contaminación viral en diversas especies de moluscos bivalvos, tanto cultivados como silvestres durante un período de 3 años mediante técnicas convencionales de RT-PCR y RT-PCR a tiempo real (rRT-PCR). Con el fin de establecer la validez de los indicadores, se determinaron las cantidades

de *E. coli* y bacteriófagos RNA F+ presentes en las muestras.

Se observó una mayor contaminación en las muestras silvestres (57,6%) que en las cultivadas (54,4%), detectándose coexistencia de diferentes virus en una misma muestra. El virus que se detectó en un mayor número de estas muestras fue HAV, seguido por el genogrupo II de Norovirus (NoV), nterovirus, AsV, NoV GI y Rotavirus. No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los recuentos de indicadores con la presencia viral en las muestras.

Por otro lado, en estudios de distintos tipos de depuración comercial, se demostró la pobre eliminación viral, encontrándose los mismos porcentajes de detección de HAV y NoV antes y después de la depuración (7,6% y 1,5% respectivamente). Los resultados de los bacteriófagos RNA F+ mostraron, no sólo la pobre eliminación de este posible indicador viral durante el proceso depurativo, sino una ausencia de correlación con la presencia de virus entéricos.

Por último, se realizó un estudio de detección de virus entéricos en muestras de moluscos importados desde áreas geográficas en desarrollo, detectándose alguno de los virus analizados en un porcentaje elevado (51,6%) de las muestras. El virus con mayor prevalencia fue NoV GI (32,3%), seguido de AsV (22,6%), NoV GII (9,7%) y HAV (6,4%).

Los resultados de este estudio indican la necesidad de una metodología específica y estandarizada para la detección de virus, así como de estudios sistemáticos de moluscos y sus áreas de producción, con el fin de evaluar la magnitud real de la contaminación viral en el medio y su relación con la epidemiología de las enfermedades entéricas de origen viral.

Estudios moleculares del sistema regulador de la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Gonzalo Durante Rodríguez

Directores: Eduardo Díaz Fernández y Manuel Carmona Pérez.

Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC.

Después de los carbohidratos, los compuestos orgánicos más extendidos en la naturaleza son los aromáticos. Los microorganismos juegan un papel crucial en la degradación de estos compuestos mediante dos estrategias principales dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno. Para incrementar conocimientos acerca del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, del cual se tienen menos datos que del aeróbico, se han estudiado los componentes responsables de la regulación del catabolismo anaeróbico del benzoato en la b-proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB. Este sistema consta del operón *bzdNOPQMS-TUVWXYZA* y del gen *bzdR* que codifican las enzimas implicadas en la degradación anaeróbica del

benzoato y el represor transcripcional BzdR, respectivamente, controlados a su vez por los promotores P_N y P_R , respectivamente.

Para ello, se analizó la regulación dependiente de oxígeno del cluster *bzd*, identificándose un nuevo regulador, denominado AcpR, en *Azoarcus* sp. CIB, que es miembro de la familia Fnr, cuyo papel es activar el promotor P_N en ausencia de oxígeno. Además, se caracterizó la expresión del promotor P_R que controla la expresión del gen *bzdR*, el cual controla su propia expresión mediante un sistema de *feedback* negativo.

Por otro lado, los estudios llevados a cabo con la proteína BzdR demostraron que posee una arquitectura modular constituida por dos dominios funcionales, el que se une al ADN en el extremo N-terminal y el que reconoce el inductor benzoil-CoA en el extremo C-terminal, conectados ambos por una región *linker*, los cuales demostraron ser capaces de mantener sus respectivas funciones tras ser purificados de forma independiente. También se determinó que el *linker* está implicado en la transmisión de información desde el dominio C-terminal, que sufre un cambio de conformación al unir el benzoil-CoA, al dominio N-terminal, que detecta dicho cambio conformacional y permite la expresión del promotor P_N .

De forma paralela, se exploró la posibilidad de construir quimeras artificiales con nuevas funciones reguladoras. El dominio N-terminal fue fusionado a la enzima siquimato quinasa I de *E. coli*, generando una proteína bifuncional con actividad enzimática y reguladora de la expresión del promotor P_N . El dominio C-terminal fue fusionado al dominio de unión a ADN del represor CI del fago I, obteniéndose un regulador capaz de controlar el ciclo lítico del fago dependiendo de la concentración de benzoil-CoA intracelular.

Los datos acerca de la caracterización bioquímica, así como la plasticidad de sus dominios funcionales han permitido la elaboración de un modelo sobre el origen evolutivo de la proteína BzdR.

Por último, se caracterizaron las tres regiones operadoras del promotor P_N , I, II y III, que reconoce la proteína BzdR, demostrándose que la unión del represor es cooperativa en forma de 4 dímeros, y que la región I es suficiente para que la regulación ejercida por BzdR tenga lugar.

Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*

Miguel Balado Dacosta

Directores: Manuel L. Lemos Ramos y Carlos Rodríguez Osorio.

Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela.

En *Vibrio anguillarum*, el principal agente etiológico de la vibriosis en peces marinos, se han descrito dos sistemas de asimilación de hierro mediante sideróforos que desempeñan un papel importante en el proceso infeccioso. Uno de ellos,

presente en gran parte de las cepas del serotipo 01, está codificado por plásmidos del tipo pJM1, mientras que el otro está codificado por genes cromosómicos y se ha descrito de forma preliminar en cepas de los serotipos O1 y O2 carentes de plásmidos. En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de este nuevo sistema. Se describe una región cromosómica que contiene 13 genes (denominados genes *vab*) que codifica la síntesis de un nuevo sideróforo de tipo catecol, la vanrobactina. Mediante la construcción de mutantes por delección de cada uno de estos genes, y su correspondiente complementación con el alelo salvaje, hemos demostrado que esta región cromosómica codifica la síntesis, regulación, transporte y utilización de la vanrobactina en la cepa RV22 del serotipo O2. El gen *vabG* codifica una DHP sintetasa que proporciona el aumento de corimato necesario para que *vabABC* catalicen su conversión en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA), que es el grupo funcional de los sideróforos de tipo catecol. El gen *vabD* codifica la fosfopanteteinil transferasa que activa las péptido-sintetasas no ribosómicas codificadas por *vabE* y *vabF*. Éstas ensamblan finalmente la vanrobactina a partir de DHBA, arginina y serina. La naturaleza química del sideróforo ha sido confirmada mediante su aislamiento, purificación y análisis estructural, y se corresponde con la N-[N'-(2,3-dihidroxibenzoil)-D-arginil]-L-serina. El gen *vabS* codifica un posible exportador de membrana que participa en el proceso de secreción y *vabH* codifica una posible esterasa del ferri-sideróforo necesaria para la utilización del hierro captado con este sistema. El cluster *vab* codifica también dos receptores de membrana externa dependientes de TonB: FvtA, que interviene en el transporte del complejo hierro vanrobactina, y ORF13, que parece no expresarse. La expresión de los genes *vab*, que se organiza en 6 unidades transcripcionales, es dependiente de la concentración de hierro, siendo el represor global Fur el principal regulador. Sin embargo, la regulación es un proceso complejo en el que la proteína VabR es necesaria para que la expresión de *vabG* alcance niveles máximos, siendo éste el único gen del sistema fuertemente reprimido por hierro sin la intervención de Fur. Además, se ha detectado la existencia de un mecanismo, dependiente de ferri-vanrobactina, que activa la expresión del receptor FvtA. El análisis de la presencia de los genes de este sistema en una colección de cepas de *V. anguillarum* representativa de los diferentes serotipos, mostró que todas las cepas poseen los genes de síntesis y transporte de vanrobactina, lo que sugiere que éste es el sistema de sideróforos ancestral en *V. anguillarum* y que el sistema codificado en el plásmido pJM1 es evolutivamente más reciente. Por último hemos demostrado que *V. anguillarum* puede utilizar, por medio del receptor FvtA, análogos sintéticos de vanrobactina como fuentes de hierro. Este hecho, junto con la expresión demostrada de *fvtA* en una colección de cepas de los principales serotipos patógenos, abre la posibilidad de explotar este sistema de transporte de hierro para el diseño de nuevos agentes antimicrobianos contra la vibriosis, basados en sideróforos conjugados con antibacterianos, que puedan utilizar la misma vía de entrada en la célula que el sideróforo nativo.