

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GENOMA DE *LACTOCOCCUS GARVIEAE*

Autora: Mónica Aguado Urda

Directores: M. Mar Blanco Gutiérrez, José F. Fernández-Garayzábal, Guillermo López Campos

Centro: Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Lactococcus garvieae es el agente etiológico de la lactococosis, una enfermedad con gran repercusión en acuicultura. Además, *L. garvieae* es una bacteria muy ubicua capaz de producir enfermedad en un amplio rango de hospedadores incluido el ser humano, considerándose actualmente como un agente potencialmente zoonótico. A pesar de la importancia creciente de este microorganismo, el conocimiento sobre las características y las propiedades de su genoma es limitado. Con el fin de aportar datos que contribuyan a un conocimiento más profundo sobre la biología y los mecanismos de patogenicidad de *L. garvieae*, se han planteado como objetivos generales de este trabajo de Tesis Doctoral, el estudio del contenido genético de esta bacteria y un análisis funcional del mismo.

Se realizó una primera aproximación al conocimiento del contenido genético de *L. garvieae* mediante hibridación genómica comparativa (CGH) inter-especie sobre microarrays de ADN, consiguiendo identificar por primera vez un gran número de genes en este patógeno. Posteriormente, la accesibilidad de las técnicas de ultrasecuenciación permitió la caracterización de los genomas de dos cepas clínicas de *L. garvieae* procedentes de humano (Lg21881) y de trucha arcoíris (Lg8831). La disponibilidad de los genomas de Lg21881 y Lg8831, así como de los de varias cepas más de *L. garvieae*, ha hecho posible realizar estudios de genómica comparativa intra-especie que han llevado a la identificación y caracterización molecular de elementos extracromosómicos únicos de la cepa Lg21881, que podrían estar implicados en su adaptación a un nicho ecológico específico. Además, los análisis de genómica comparativa han evidenciado una elevada variabilidad intra-especie en *L. garvieae* y han posibilitado una primera aproximación hacia la filogenia y evolución de este microorganismo. Por otra parte, y en relación con esta variabilidad intra-especie, se ha evaluado la utilidad de determinados caracteres propuestos como biomarcadores para la clasificación de aislados de *L. garvieae* en función de su origen.

El conocimiento del genoma de *L. garvieae* también ha permitido diseñar un microarray de ADN que demostró ser eficaz en el análisis de la expresión global en esta bacteria. Así, sobre dicho microarray se han realizado estudios funcionales de las cepas Lg21881 y Lg8831 en los que se han analizado los cambios de expresión global en función de la temperatura. Se ha observado que Lg21881 y Lg8831 presentan diferentes patrones de expresi-

ón, y se han detectado genes potencialmente implicados en su patogenicidad.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevos conocimientos sobre esta bacteria de importancia creciente en medicina veterinaria y humana, y abren camino hacia una comprensión más profunda de su biología y su evolución.

MECANISMOS MOLECULARES DE RESPUESTA AL ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR EN *LACTOCOCCUS LACTIS*

Autor: Clara Rocés Rodríguez

Directores: Beatriz Martínez Fernández y Ana Rodríguez González

Centro de realización: Departamento de Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa (Asturias).

Centro de presentación: Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo, Oviedo (Asturias).

En este trabajo hemos identificado mecanismos desarrollados por *Lactococcus lactis* como respuesta y resistencia al estrés sobre su pared celular, con objeto de mejorar su aptitud tecnológica como *starter* en quesería. Como herramienta para provocar este estrés utilizamos la lactococina 972 (Lcn972), una bacteriocina que bloquea la síntesis de peptidoglicano en el septo de división en *Lactococcus*.

Hemos demostrado que los genes *llmg0169* y *llmg2164-2163* son prescindibles, pero contribuyen a garantizar la viabilidad de *L. lactis* en condiciones de estrés tecnológico (acidez, temperatura, sal, liofilización, compuestos antimicrobianos y bacteriófagos).

Por otro lado, la caracterización genética y fenotípica de mutantes de *L. lactis* resistentes a Lcn972 desveló la flexibilidad de *L. lactis* para modificar su peptidoglicano y reducir así su sensibilidad a antimicrobianos que actúan sobre la pared celular como Lcn972, nisina y lisozima. Además, se detectaron reorganizaciones genéticas mediadas por secuencias de inserción; entre ellas, la activación del gen *llmg2447*, un supuesto factor anti-sigma de función extracelular que confiere resistencia a Lcn972.

Asimismo, hemos descubierto que la ausencia de la proteasa de membrana FtsH impide la liberación de viriones del bacteriófago TP712 que son incapaces de lisar la pared de su huésped, reduciendo la carga viral en el ambiente.

Estos resultados establecen las bases para obtener cepas de *L. lactis* más robustas y optimizar su aplicación tecnológica como cultivo iniciador.

Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

SEM@foro publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM (secretaria.sem@semicrobiologia.org) o al Director Editorial (vicjid@farm.ucm.es) por correo electrónico, siguiendo el formato: Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación (si es distinto) y Resumen (máximo, unas 200 palabras).

SEM@foro se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la Microbiología.

CARACTERIZACIÓN DE ARQUEAS HALÓFILAS BASADA EN EL ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS POLARES Y OTROS MÉTODOS TAXONÓMICOS

Autor: Paulina Corral Villa

Directores: Antonio Ventosa Ucero y Carmen Guitérrez Navarro

Centro de realización: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

Centro de presentación: Universidad de Sevilla

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la biodiversidad cultivable de haloarqueas de hábitats hipersalinos geográficamente separados, en concreto a partir de cinco lagos salinos de Mongolia Interior y del Tíbet en China, del lago Aran-Bidgol en Irán y de las salinas de Isla Cristina en Huelva. Los resultados han permitido la descripción de cuatro nuevas especies de haloarqueas: *Natronorubrum sediminis*, *Halorubrum aquaticum*, *Natronococcus roseus* y *Halostagnicola bangense*. Los estudios detallados de la composición de lípidos polares en las haloarqueas alcalófilas han permitido la caracterización de una nueva cardiolipina presente en la membrana celular de especies de *Natronococcus*. Esta molécula está constituida por cadenas de diferente longitud nunca descritas previamente en haloarqueas y está involucrada en funciones bioenergéticas y en procesos de adaptación osmótica y de pH.

Debido al elevado número de especies pertenecientes al género *Halorubrum* y a la alta frecuencia con la que se aíslan, hemos utilizado como modelo las cepas aisladas del lago Aran-Bidgol en Irán para realizar un estudio comparativo mediante análisis por secuenciación multilócica (MLSA), el perfil de lípidos polares y el estudio filogenético basado en la comparación de secuencias del ARNr 16S. Los resultados se contrastaron con estudios de hibridación ADN-ADN que permitieron determinar si las cepas que constituyen tres grupos monofiléticos según el estudio MLSA (pero que no pudieron ser diferenciados en base a la comparación de secuencias del ARNr 16S) constituyen nuevas especies. Dicho estudio comparativo ha puesto de manifiesto una clara correlación entre los resultados obtenidos mediante MLSA y los perfiles lipídicos de las cepas estudiadas, pertenecientes a tres grupos filogenéticos bien diferenciados. Los estudios de hibridación ADN-ADN corroboran y validan los resultados previos y nos permiten proponer que en futuros estudios de taxonomía del género *Halorubrum* y de

otros géneros de haloarqueas se utilice el análisis de secuenciación multilócica, en contraste con los actuales estudios filogenéticos basados exclusivamente en la comparación de secuencias del ARNr 16S. Por último, la caracterización polifásica ha permitido describir taxonómicamente las cepas asignadas mediante MLSA a los tres grupos filogenéticos, como nuevas especies del género *Halorubrum*, para las que proponemos las denominaciones: *Halorubrum valerae*, *Halorubrum iranicum* y *Halorubrum halodurans*.

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE) EN LAS DIFERENTES FASES DE TRATAMIENTO DE PURINES EN PLANTAS DE COMPOSTAJE

Autor: Mario García Andrés

Directora: María Teresa Pérez Gracia

Centro: Área de Microbiología. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad CEU Cardenal Herrera.

El VHE es el agente causal de la hepatitis E, enfermedad autolimitada en la mayoría de casos, siendo la vía oral-fecal su principal vía de transmisión, en concreto por bebida de agua contaminada. En países como España, el ganado porcino actúa como reservorio de la enfermedad y constituye un foco de diseminación de la misma mediante la gran cantidad de purines que son generados en las granjas, en los que se detecta una amplia presencia del VHE.

El principal objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia en la eliminación del VHE en plantas de tratamiento de purines de la provincia de Castellón, así como analizar filogenéticamente las cepas aisladas para compararlas con otras de origen porcino y humano.

No se detectó el VHE en los productos finales obtenidos en estas plantas tras depurar los purines, lo que sugiere que el tratamiento llevado a cabo en las mismas es eficaz en la eliminación del VHE, reduciéndose así los riesgos de transmisión de la enfermedad.

En el estudio filogenético, se observó una elevada similitud de las cepas aisladas en las plantas, con cepas humanas de pacientes de España y Francia, lo que refuerza, que el VHE es un agente zoonótico que puede suponer un problema de salud pública en países desarrollados como España, debido entre otras causas a la gran cantidad de purines que se generan.

COLILOQUIO by Víctor

