

Tesis Doctorales

Caracterización de mutantes atenuados de *Lactococcus garvieae* seleccionados mediante mutagénesis de marcaje (*Signature-tagged mutagenesis, STM*)

Aurora Menéndez González

Director: **José Agustín Guijarro Atienza**

Departamento de Biología Funcional. Facultad de Medicina. IUBA. Universidad de Oviedo.

La lactococosis, cuyo agente causal es la bacteria *Lactococcus garvieae*, es uno de los procesos infecciosos de mayor importancia en la producción intensiva de trucha. Se puede considerar una enfermedad emergente con gran repercusión económica. Sin embargo, los conocimientos acerca de este microorganismo y de sus mecanismos de patogenicidad son aún limitados.

El objetivo inicial del presente trabajo fue el desarrollo y optimización de un sistema para la manipulación genética de *L. garvieae*. Las técnicas genéticas establecidas permitieron abordar el segundo de los objetivos que fue la identificación, mediante la técnica conocida como mutagénesis de marcaje (*Signature tagged mutagenesis, STM*), de genes que estuviesen implicados en el proceso infeccioso de esta bacteria.

La primera fase del presente estudio fue el establecimiento de un protocolo de transformación de células de *L. garvieae* mediante electroporación. Las eficiencias de transformación obtenidas para diferentes cepas se situaron alrededor de 10^5 ufc/mg ADN. A continuación, se desarrolló un sistema de mutagénesis insercional utilizando los genes *sodA* y SAH910L, que codifican respectivamente la enzima superóxido dismutasa y una proteína con homología con la proteína M de *Streptococcus pyogenes*. Con posterioridad, se estableció un procedimiento de mutagénesis por transposición utilizando el elemento móvil Tn917 insertado en el plásmido pTV408. Para validarlo, se obtuvo un mutante incapaz de fermentar el manitol. Su estudio mostró que la transposición en *L. garvieae* tenía lugar aparentemente al azar.

Sentadas las bases para la manipulación genética de *L. garvieae*, se abordó el objetivo final del trabajo, la selección de genes implicados en la virulencia. Para ello, se utilizó la técnica de mutagénesis por marcaje (STM). Este método se basa en un sistema de infección experimental que permite, utilizando la bacteria y el hospedador de interés, seleccionar un conjunto de mutantes en

genes que son necesarios para el crecimiento y supervivencia en el hospedador, y que por tanto, presentan una virulencia atenuada en relación a la cepa parental. Para su aplicación en *L. garvieae* se utilizó nuevamente el plásmido pTV408 portador del transposón Tn917. En una primera etapa, se obtuvo mediante transposición una genoteca de mutantes específicamente marcados. En una segunda etapa, se seleccionaron aquellos mutantes de la genoteca que presentaban un crecimiento limitado en el pez. Se identificaron así un total de 29 mutantes de virulencia atenuada. El análisis de la región del cromosoma donde tuvo lugar la integración del transposón en estos mutantes, mostró la implicación en la patogenicidad de la bacteria de genes que codifican proteínas implicadas en regulación, en rutas metabólicas, en sistemas de transporte, y en diversos procesos celulares, además de otras de función desconocida. Como era de esperar, la capacidad de crecimiento *in vivo* de cada uno de los mutantes en relación con la cepa parental estaba muy disminuida, y por ello, todos se comportaron como atenuados.

En conclusión, en este trabajo se han sentado los fundamentos técnicos que permiten la manipulación genética de *L. garvieae*, y se ha llevado a cabo el primer acercamiento al estudio de sus mecanismos de patogenicidad específicos, mediante la identificación de algunos genes implicados en el desarrollo de la infección en peces.

Estudio de la actividad antimicrobiana producida por cepas enológicas de *Lactobacillus plantarum*

Beatriz Rojo Bezares

Directores: **Carmen Torres Manrique** y **Fernanda Ruiz Larrea**

Área de Bioquímica y Biología Molecular. Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja.

En la microbiología enológica existe una gran diversidad de microorganismos (bacterias y levaduras) tanto beneficiosos como perjudiciales para los procesos fermentativos relacionados con la elaboración y conservación del vino. Las bacterias lácticas (BAL) de la especie *Lactobacillus plantarum* se encuentran ampliamente diseminadas, pudiendo colonizar diversos nichos ecológicos y se utilizan en multitud de fermentaciones industriales por la producción de ácido láctico. También son importantes por su capacidad de producción

de sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica llamadas bacteriocinas, activas frente a microorganismos de la misma especie o especies con estrecha relación taxonómica.

Uno de los objetivos de esta tesis fue el análisis del efecto de varios agentes antimicrobianos propios del vino como son el etanol, el metabisulfito y el pH ácido, frente a diversos géneros de bacterias y levaduras enológicas así como el posible uso de la nisina en el vino, ya que actualmente se usa como conservante alimentario. Como resultado se observó un efecto sinérgico de la nisina y el metabisulfito en la inhibición del crecimiento de las BAL enológicas, lo que indica que la combinación de ambos antimicrobianos puede constituir un nuevo método de conservación del vino que permitiría la utilización de menores concentraciones de metabisulfito que las empleadas actualmente. También se estudiaron algunos mecanismos de resistencia a antimicrobianos en cepas enológicas de BAL, detectándose por primera vez en BAL los genes de resistencia a los aminoglucósidos (*aac(6')-aph(2'')*), *ant(6)* y *aph(3')-IIIa*) en cepas de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *O. oeni*. Así como los genes *ermB* y *tet(L)*, que confieren resistencia a eritromicina y tetraciclina respectivamente, en cepas de *Pediococcus*.

El estudio de la producción de sustancias antimicrobianas por cepas *L. plantarum*, ha concluido con la caracterización bioquímica y genética de la actividad antimicrobiana de la cepa enológica *L. plantarum* J23. La producción bacteriocina de J23 fue inducida por la presencia de ciertas cepas de BAL en el medio de cultivo. Por otro lado, esta bacteriocina se caracteriza por su naturaleza peptídica, su amplio espectro de actividad frente a cepas enológicas de BAL de las especies: *O. oeni*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *L. pentosus*; por ser activa en un amplio rango de pH, termoestable y resistente al tratamiento con disolventes orgánicos. Estas propiedades de la plantaricina J23 le confieren enormes posibilidades para ser utilizada como bioconservante alimentario.

Además se llevó a cabo la caracterización genética del locus *pln* de *L. plantarum* J23 y se estudió la expresión de genes incluidos en dicho locus que estaban relacionados con la producción de bacteriocinas. Este estudio reveló que el locus *pln* J23 contiene 20266 pb (número de acceso DQ323671) y está formado por 6 operones: *plnNC8IF-plnNC8HK-plnD*, *plnJLR*, *plnMNOP*, *plnEFI*, *plnGHSTUVWXY* y un nuevo operón formado por *orfZ1*, *orfZ2* y *orfZ3*. Multitud de cambios aminoácidos se localizaron en la secuencia del locus *pln* J23 cuando se comparó con otras secuencia del

locus *pln* de *L. plantarum* previamente publicadas. El locus *pln* de la cepa J23 es un híbrido de los loci *pln* de las cepas previamente descritas C11 y NC8, presentando diferencias importantes en el módulo de la regulación. El estudio de expresión reveló que los genes del operón regulador se expresaban de manera constitutiva tanto en condiciones normales como en condiciones de inducción, y por otro lado genes de los operones relacionados con la producción de bacteriocinas se sobreexpresan en la cepa J23 en presencia de un extracto inductor.

Como resultados de esta tesis se han publicado los siguientes artículos:

- Rojo-Bezares B., Y. Sáenz, P. Poeta, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea, C. Torres. 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int J Food Microbiol* 11: 234-240.
- Rojo-Bezares B., Y. Sáenz, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea, C. Torres. 2007. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int J Food Microbiol* 116: 32-36.
- Rojo-Bezares B., Y. Sáenz, L. Navarro, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea, C. Torres. 2007. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiol* 24: 482-491.
- Rojo-Bezares B., Y. Sáenz, L. Navarro, R. Jiménez-Díaz, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea, C. Torres. Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. *Arch. Microbiol.* enviado.

Análisis funcional de la proteína SigD de *Salmonella* e identificación de nuevos factores de virulencia en un sistema modelo de levadura

Ainel Alemán Pérez

Directores: **María Molina Martín** y **Rafael Rotger Anglada**

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

En los últimos años, el estudio de la virulencia de un buen número de bacterias patógenas ha puesto de manifiesto una estrategia de infección común basada en el aprovechamiento de las rutas de transducción de señales de la propia célula hospedadora. En el caso concreto de *Salmonella*, cuando las células bacterianas entran en contacto con las células del epitelio intestinal dirigen la translocación de una serie de proteínas a la célula

hospedadora mediante un sistema de secreción especializado, el sistema SIP-1 (SST-III). Esto provoca, en primer lugar, la reorganización localizada de actina que promueve la formación de filopodios (ruffling) y la internalización de la bacteria en la vacuola fagocitaria., mediante la acción de proteínas de unión a actina (SipA) y proteínas reguladoras de Cdc42 y Rac1: SopE que es una GEF (moduladora positiva) y SigD, que es una inositol fosfatasa.

En este trabajo nos hemos centrado en la caracterización funcional de este último. La sobreexpresión de SigD fusionada a GFP fue tóxica para las células de mamíferos, alterando el citoesqueleto de actina pero sin causar apoptosis, ni alteración del ciclo celular. El estudio de varias versiones mutagenizadas de este efector bacteriano, permitió el hallazgo de un dominio de baja complejidad existente entre los residuos del 118 al 142 de la región aminoterminal no catalítica de SigD, responsable de este efecto de toxicidad y alteración de las fibras de actina. Es la primera evidencia descrita del carácter bifuncional de SigD. Un estudio detallado trabajando con varios de estos alelos de SigD arrojó que la formación de ruffles y la vacuolización inducida por SigD en células HeLa es dependiente de su actividad fosfatasa, así como que la expresión de este efector provoca la asociación de la GTPasa Rac1 a la membrana plasmática de células HeLa y por tanto su activación. Se ha observado además, a partir de estudios de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos que SigD colocaliza con estructuras del tráfico endocítico, principalmente con endosomas tardíos, siendo para ello importante la presencia del dominio baja complejidad de la región amino-terminal. Al trabajar con mutantes de *Salmonella* en esta proteína de virulencia se observó que la expresión de SigD provoca la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 y está implicada en la secreción de interleuquina 8 durante la infección por *Salmonella* de células epiteliales en cultivo. Otro de los objetivos de este trabajo de tesis fue caracterizar la influencia de SigD en el metabolismo de fosfoinosítidos en la célula hospedadora. A partir de estudios de infección con cepas de *Salmonella* silvestre y deficientes en SigD pudimos observar que La desaparición de PI(4,5)P₂ y la acumulación de PI(3,4,5)P₃ y PI(3,4)P₂ en los ruffles inducidos en células HeLa por el contacto con *Salmonella* es dependiente de SigD e insensible a inhibidores farmacológicos de fosfatidil inositol 3-quinasas (PI3K), lo que indica que PI(4,5)P₂ es un sustrato de SigD *in vivo*. Además, La formación de PI(3)P en las SCV es también dependiente de SigD y a su vez sensible a inhibidores farmacológicos de las PI3K. Hasta

ahora se había establecido que la formación de este último fosfoinosítido era el resultado de la desfosfatización de PI(3,4,5)P₃ por SigD. No obstante, en nuestras condiciones, la eliminación de PI(3,4,5)P₃ mediante la expresión de la fosfatasa PTEN en células infectadas con *Salmonella* no impide la formación de PI(3)P en las SCV, lo que constituye una evidencia de que la desfosforilación de PI(3,4,5)P₃ no es la vía utilizada por SigD para la generación de PI(3)P. Un descubrimiento interesante fue observar que el reclutamiento de la GTPasa humana Rab5 en las SCV (*Salmonella-Containing Vacuoles*) es también dependiente de esta fosfatasa bacteriana (SigD). La experiencia en nuestro grupo de investigación trabajando con el modelo celular de la levadura nos permitió además descubrir potenciales factores de virulencia bacterianos de *Salmonella* a partir de la sobreexpresión de una genoteca de *S. typhi* y *S. typhimurium*. Entre ellos, el efector de función desconocida SteC, y el factor de virulencia conocido de *Salmonella*, SseF de *S. typhimurium*, que inhiben el crecimiento de las células de levadura.

Biodeterioro fúngico bacteriano de resinas terpénicas utilizadas en pintura y otras artes plásticas

Julio Romero Noguera

Directores: **Fernando Bolívar Galiano, María Antonia Fernández Vivas e Inés Martín Sánchez.**

Departamento de Pintura, Facultad de Bellas Artes, Universidad de Granada.

Las resinas terpénicas son productos de origen natural que por sus propiedades ópticas y su capacidad adhesiva y filmógena cumplen una importante función técnica, protectora y estética como componentes de medio aglutinantes y capa final de acabado y conservación en obras de arte pictóricas y escultóricas.

Difieren notablemente en cuanto a su procedencia y composición, si bien todas son mezclas orgánicas de sustancias originadas a partir del isopreno, estableciéndose dos grupos principales, diterpenos y triterpenos, que constan de cuatro y seis unidades de isopreno, respectivamente.

Los procesos de envejecimiento de estas sustancias constituyen uno de los mayores problemas para la conservación de obras de arte. Las resinas cambian su composición y propiedades con el tiempo, materializándose dichas transformaciones en fenómenos como el amarilleo, patrones de craquelado y microfractura (los pasmados del barniz), aumento de la fragilidad y cambios en la solubilidad,

por lo que en la mayoría de casos se hace necesaria su eliminación total o parcial. Dado su dificultad y carácter irreversible, las operaciones de limpieza están consideradas como etapas críticas en el proceso de restauración de la obra de arte, a las que se llega por su insuficiente conocimiento de los complejos procesos degradativos que afectan a estos materiales y de los procedimientos para evitarlos.

Esta tesis doctoral se centra en el estudio del desarrollo de microorganismos sobre los barnices terpénicos naturales de mayor uso artístico y en las alteraciones químicas que son capaces de producir. Para ello se han seleccionado seis resinas: colofonia y trementina veneciana (diterpénicas predominantemente abietánicas), sandárica y copal de Manila (diterpénicas predominantemente labdánicas) y dammar y almáciga (triterpénicas) y sobre estos materiales se ha inoculado diversos hongos y bacterias procedentes de colección y de obra real, frecuentemente citados como agentes de biodeterioro en materiales artísticos, de cara a evaluar su grado de proliferación y capacidad de alteración química. Las técnicas de análisis empleadas han sido microscopía, cromatografía de gases-espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y pirólisis-cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Por último, se ha incluido un estudio del empleo de biocidas de amplio uso en restauración de bienes culturales (cloruro de benzalconio, nftenato de tributil estaño y ortofenilfenol) para evitar estos fenómenos, y sus posibles interacciones con los barnices.

Procesos de biodeterioro en pinturas sobre lienzo del Museo de Bellas Artes de Granada: Examen visual y gráfico

Fernando Poyatos Jiménez

Directores: **Fernando Bolívar Galiano, Inés Martín Sánchez, María Antonia Fernández Vivas.**

Departamento de Pintura. Facultad de Bellas Artes. Universidad de Granada.

El biodeterioro de obras pictóricas es un fenómeno complejo, todavía bastante desconocido. Indagar en los agentes de deterioro y en las principales causas que lo provocan requiere de nuevos estudios que se encaminen en este sentido con el fin de identificar que alteraciones se producen y que tratamientos se necesitan.

El interés de este tema contrasta con la escasez de bibliografía, en especial aquella que se refiere en exclusiva al biodeterioro de materiales artísticos

tradicionales en pintura sobre lienzo, ya que la mayoría de los trabajos consultados se refieren a sustancias inorgánicas y a obras de arte contemporáneas, dejando casi sin explorar sustancias orgánicas usadas tradicionalmente en obras pictóricas más antiguas. De ahí la necesidad de establecer nuevas metodologías analíticas dedicadas al control de los procesos de biodeterioro y de las causas específicas que los provocan.

Más recientemente, se ha suscitado mayor interés sobre este tema, apareciendo trabajos que explican los procesos de biodeterioro de materiales artísticos tradicionales, y que distinguen las alteraciones que tienen lugar en los diferentes estratos de una obra pictórica y en los distintos materiales orgánicos que la componen.

Son pocos los estudios que se dedican de forma directa a analizar las especies de microorganismos, los materiales que deterioran y el tipo de daño que provocan. Por otro lado, son interesantes los trabajos que se han dedicado al empleo de determinados métodos analíticos de estudio e identificación del efecto ejercido por estos agentes de deterioro (SEM, cromatografía, electroforesis, pirólisis).

Hay que resaltar también la importancia de los trabajos que exponen las condiciones ambientales como elemento imprescindible para que tengan lugar los procesos de biodeterioro.

Aunque se alejen de nuestro campo son diversos y muy numerosos los estudios sobre deterioro microbiológico en pinturas murales. Estos trabajos pueden proporcionarnos algunas pistas para su aplicación en obras de arte constituidas principalmente por materiales orgánicos y para acercar metodologías analíticas al estudio de estas obras.

Esta revisión aporta datos sobre trabajos dedicados al análisis de las causas de biodeterioro que afectan a obras de arte pictóricas y de manera explícita a los soportes textiles –que suministran el mayor porcentaje de materia orgánica a una pintura-, a las sustancias naturales empleadas como aglutinantes (resinas, aceites, emulsiones y colas), así como a los agentes que afectan a los materiales filmógenos que cumplen una función estética y de protección (barnices).

Producción de β -glucano por *Pediococcus parvulus* 2.6: vías metabólicas, optimización de su síntesis y caracterización reológica del glucano.

Susana Eugenia Velasco Arbide

Directores: **Ana Jesús Irastorza Iribas y María Teresa Dueñas Chasco**

Departamento de Química Aplicada, Facultad de Ciencias Químicas de San Sebastián

Las bacterias lácticas han sido y son utilizadas para la formación de productos alimenticios, y a su vez para mejorar la preservación de los mismos. La aparición de los alimentos funcionales ha hecho resurgir enormemente el interés por el desarrollo de alimentos beneficiosos para la salud. *Pediococcus parvulus* 2.6 sintetiza un exopolisacárido (EPS) cuya estructura es (1→3)-β-D-glucano. Los β-D-glucanos han suscitado un mayor interés debido a su amplio rango en la aplicación industrial y particularmente por sus propiedades bioactivas y medicinales.

La producción de β-D-glucanos por bacterias lácticas es en general baja. Con el objeto de aumentar su producción, en esta tesis se han estudiado los diferentes factores que influyen

tanto negativa como positivamente en el crecimiento y en la producción de exopolisacárido por esta cepa. Para la comprensión de la formación de EPS y del crecimiento bacteriano se han estudiado las vías metabólicas de asimilación de azúcares y la vía de formación de EPS a partir de ciertos azúcares.

Los EPS en la industria están siendo utilizados como espesantes y gelificantes de productos alimentarios, gracias a que no aportan sabor ni olor al alimento. Un punto importante para el desarrollo de nuevos alimentos es el conocimiento de las propiedades reológicas del EPS, por ello se ha llevado a cabo la caracterización del β-glucano. Estas características e incluso sus aplicaciones médicas vienen determinadas por el peso molecular. Por ello, se ha determinado el peso molecular del β-glucano sintetizado por *P. parvulus* 2.6 en diferentes condiciones de cultivo.