

## Caracterización microbiológica y molecular de cepas de *Colletotrichum* responsables de la antracnosis en fresas

Carlos Garrido Crespo

Directores: **Jesús Manuel Cantoral Fernández y María Carbú Espinosa de los Monteros.**

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz.

El género *Colletotrichum* engloba a un gran número de especies y constituye uno de los hongos fitopatógenos más importantes en todo el mundo. Uno de los cultivos afectados por este hongo es el cultivo de fresa, en el cual tres especies han sido descritas como responsables de causar la enfermedad conocida como antracnosis, *C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*. Este hongo es responsable de más del 80% de la muerte de las plantas en los invernaderos, y ocasiona pérdidas que alcanzan los 100 millones de euros al año en el suroeste de España (Huelva y Cádiz).

En primer lugar se realizó un muestreo de las provincias de Huelva y Cádiz, donde se tomaron muestras de plantas y frutos presentando síntomas típicos de antracnosis. Se aislaron más de 300 cultivos monoconidiales y se identificaron mediante PCR. Se puso de manifiesto que *C. acutatum* era la especie responsable de la antracnosis en fresa en esta región. Se realizó una caracterización morfológica de los aislados y se estudió la patogenicidad de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* mediante un bioensayo *in planta*, en las variedades de fresa *Fragaria ananassa* var. Camarosa y var. Ventana. Las cepas de *C. acutatum* presentaban niveles similares de patogenicidad y las cepas de la especie *C. gloeosporioides* presentaron una mayor patogenicidad que las de *C. acutatum*.

Una amplia colección de cepas de *C. acutatum* procedentes de diferentes orígenes geográficos fue estudiada y caracterizada usando tres estrategias o metodologías: i) análisis del gen 5.8S y los espaciadores ITS1-ITS2; ii) estudio de la variabilidad genética mediante la hibridación *Southern-blot* usando una sonda específica para la secuencia telomérica y iii) establecimiento del cariotipo electroforético mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE). El análisis de PFGE estableció que las cepas presentaron entre seis y nueve cromosomas, con tamaños genómicos totales entre 36 y 29 Mb. El análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante la hibridación *Southern-blot* corroboró los resultados anteriores.

Tras la caracterización molecular, se realizó el diseño y la optimización de un protocolo para la identificación y detección temprana de *Colletotrichum*, y que supusiera una mejora en tiempo y sensibilidad de los métodos empleados hasta la fecha. La metodología elegida fue la PCR a tiempo real, con tecnología TaqMan®.

La detección e identificación de *Colletotrichum* spp. se completó con la optimización de un protocolo de extracción de ADN directamente de material vegetal. La sensibilidad del nuevo método de detección fue del orden de 10 a 100 veces más sensible que los protocolos de PCR convencional publicados hasta la fecha. Este nuevo sistema de detección se comparó con la metodología de detección existente para la especie *C. acutatum* basándose en el ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), y se puso de manifiesto la mayor robustez y fiabilidad que supone el nuevo protocolo frente a los disponibles hasta la fecha para la detección de este hongo, incluso directamente de material vegetal.

Parte de este trabajo ha sido publicado en: Garrido *et al.*, *European J. of Plant Pathology*, DOI 10.1007/s10658-007-9224-7.

## Implicación de la proteína DivIVA en el crecimiento polar de *Corynebacterium glutamicum*

Michal Letek Polberg

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

Universidad de León, Facultad de Biología, Departamento de Biología Molecular.

Los promotores de los genes *gnt* de *Corynebacterium glutamicum* han servido para controlar la expresión de genes esenciales en este microorganismo. Utilizando estos promotores se ha conseguido reducir la expresión del gen esencial *divIVA*, obteniéndose cepas con morfología cocoide como consecuencia de una ausencia total de crecimiento polar. La falta de *DivIVA* en las cepas de expresión reducida de *C. glutamicum* sólo fue complementada por *DivIVAs* de otros actinomicetos, pero no por proteínas *DivIVA* de *Bacillus subtilis* o *Streptococcus pneumoniae*. Las cepas de corinebacterias de expresión reducida también pudieron ser complementadas por proteínas *DivIVA* quimera que presentaban un dominio de *DivIVA* de *B. subtilis*, a pesar de las diferencias de tamaño entre las respectivas regiones *coiled-coil*. Los cambios en la expresión del gen *divIVA* conducían a una segregación aberrante del cromosoma, aunque la proteína *DivIVA* no parecía estar directamente implicada en este proceso ya que se localizaba en el septo de división una vez iniciada la biosíntesis de peptidoglicano y cuando los nucleoides se encontraban totalmente segregados. Además, se ha observado que en *C. glutamicum* la localización de *FtsZ* en el septo de división no está regulada por el sistema de oclusión por nucleóide o por cualquier otro regulador temporal o espacial conocido. Finalmente, como aplicación práctica de los resultados obtenidos, se ha utilizado el gen *divIVA* como diana de amplificación por PCR con objeto de identificar corinebacterias patógenas.

The *gnt* promoters from *Corynebacterium glutamicum* were used to control the expres-

sion of essential genes in this microorganism. Using these promoters we obtained partially depleted *DivIVA* strains, which showed coccoid morphology as a consequence of the total lack of polar growth. The partial depletion of *DivIVA* in *C. glutamicum* was complemented by *DivIVAs* from actinomycetes, but not by *DivIVAs* from *Bacillus subtilis* or *Streptococcus pneumoniae*. The partially depleted *Corynebacterium* strains were also complemented by quimeric versions of the *DivIVA* protein, in which a conserved region was exchanged with the corresponding domain of *DivIVA* from *B. subtilis*, despite the great difference in size of the respective coiled-coil regions. Changes of the *divIVA* level of expression lead to an aberrant chromosome segregation, but *DivIVA* seems to be indirectly involved in this process because it localizes at the midcell only when the peptidoglycan synthesis has started and nucleoids are completely segregated. In addition, in *C. glutamicum* the localization of *FtsZ* at the septum is not negatively regulated by nucleoid occlusion or other temporal and spatial known regulators. Finally, as a practical application of these results, the *divIVA* gene was used as a target for PCR amplification in order to identify pathogenic corynebacteria.

## Modificación de la respuesta biológica por telitromicina

M<sup>a</sup> Magdalena Leiva Arjona

Directores: **Alfonso Ruiz-Bravo López y María Jiménez Valera**

Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

Numerosas clases de antimicrobianos, particularmente los macrólidos y algunas quinolonas han demostrado poseer efectos moduladores en células inflamatorias. El creciente número de estudios clínicos y experimentales llevados a cabo ha demostrado la relevancia de los efectos inmunomoduladores de los agentes antimicrobianos en la terapia de infecciones, principalmente en las del tracto respiratorio. La telitromicina es el primer miembro de una nueva familia de antibióticos, los ketólidos, estructuralmente relacionados con los macrólidos. Fue diseñada específicamente para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio. En el presente estudio se demuestra que la telitromicina, independientemente de su actividad antimicrobiana, posee una interesante actividad antiinflamatoria. La telitromicina inhibe la producción de mediadores de inflamación, entre los que se encuentra la citokina proinflamatoria TNF- $\alpha$  o la quimioquina murina MIP-2, homóloga de la IL-8 humana, por macrófagos y por células epiteliales; también modifica la producción de radicales oxidantes como el NO. Esta actividad antiinflamatoria la ejerce actuando a nivel de la activación de los factores de transcripción implicados en la respuesta inflamatoria, como es NF- $\kappa$ B entre otros; además favorece la apoptosis, implicada en la resolución de los procesos inflamatorios.

## Desarrollo de sistemas vector/hospedador en bifidobacterias

Pablo Álvarez-Martín

Director: **Baltasar Mayo Pérez.**

Tutora: **Covadonga Barbés Miguel.**

Centro de Realización: **Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC).**

Centro de Presentación: **Facultad de Biología, Universidad de Oviedo.**

Las bifidobacterias constituyen una de las poblaciones microbianas dominantes en el intestino humano y de otros animales, donde ayudan a mantener el equilibrio microbiano por medio de sus variadas actividades metabólicas y contribuyen a preservar el estado de salud. El conocimiento de los mecanismos de probiosis es fundamental para apoyar científicamente su acción beneficiosa, así como para la utilización racional de las bifidobacterias en el diseño de productos probióticos. Para llevar a cabo estos propósitos son necesarias diversas herramientas genéticas, cepas hospedadoras adecuadas y mecanismos eficientes de transferencia de ADN. En estos momentos, los plásmidos son la única fuente de replicones para el género *Bifidobacterium*. De esta forma, el conocimiento de éstos y su caracterización molecular se revela fundamental para el desarrollo de nuevas y más versátiles herramientas genéticas.

En esta Tesis, analizamos en busca de plásmidos una serie de 72 aislados intestinales pertenecientes a siete especies distintas. Se encontraron plásmidos en 19 aislados con 6 perfiles distintos: dos perfiles con un solo plásmido y cuatro con, al menos, dos. Debido a su pequeño tamaño, el buen rendimiento plasmídico de la cepa portadora y su estabilidad, el plásmido pBC1 de la cepa *Bifidobacterium catenulatum* L48 fue seleccionado para una posterior caracterización. Su secuenciación reveló una molécula circular de 2.540 pb con un contenido G+C del 64%. En el origen de replicación se identificaron una repetición de 24 nucleótidos repetida tres veces y media y cinco repeticiones invertidas, con una organización similar a la de los plásmidos que replican por el modo theta. El análisis de la secuencia reveló también la presencia tres ORFs capaces de codificar péptidos de más de 50 aminoácidos: *repB*, que codifica una replicasa de 315 aminoácidos, un gen transcripcionalmente acoplado (*orfX*-like) similar a los genes *orfX* de los plásmidos de lactococos, y *copG*-like con un dominio conservado de las proteínas de la familia CopG. La homología de RepB de pBC1 mostró una gran similitud con la de los plásmidos pMB1 y pDOJH105 de *B. longum*, y un parentesco lejano con la de los plásmidos theta-replicativos ColE2 de *Escherichia coli* y pXZ10142 de *Corynebacterium glutamicum*. Mediante hibridación se demostró que el replicón de pBC1 no estaba relacionado con el resto de los plásmidos detectados.

Para determinar el replicón mínimo de pBC1 y la funcionalidad de las distintas ORFs y secuencias, se amplificaron fragmentos del plásmido mediante PCR y se clonaron en el vector pBif (derivado de pUC que no replica en las bifidobacterias). Todos los derivados que incluían

*repB* y las regiones inmediatas anteriores replicaban en bifidobacterias. Sin embargo, la interrupción de *repB* suponía la pérdida de la replicación. El número de copias de pBC1 se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real y resultó ser de 30 por cromosoma equivalente. Alguno de los derivados, sin embargo, presentaba un número de copias menor (entre 3 y 23), de lo que dedujimos que *orfX*-like y *copG*-like juegan un papel importante en la replicación y estabilidad del plásmido.

Basados en pBC1, se desarrollaron varios vectores de clonación; capaces, la mayoría, de replicar en *E. coli* y bifidobacterias. Todas las construcciones mostraron una estabilidad segregacional y un número de copias similar a los del plásmido original. El vector pAM4 se introdujo en ocho especies de bifidobacterias, incluyendo *B. dentium*, *B. pseudolongum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. pseudocatenulatum*, *B. thermophilus*, *B. animalis* y *B. adolescentis*. Con el propósito de comprobar la funcionalidad de los vectores, el gen de la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa de *B. longum* B667 se clonó en pAM1 y se expresó en cepas de *E. coli* y *B. pseudocatenulatum*, en las que presentó una actividad enzimática unas 100 veces mayor que en la cepa original.

## Estudio de la función y regulación de las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 de la ruta de integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*

María Jiménez Sánchez

Directores: **Víctor Jiménez Cid y María Molina Martín**

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

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* responde a daños en la pared celular y otros estreses gracias a la activación de la ruta de integridad celular. Esta ruta consiste en un módulo de tres quinasas que consta de la MAPK Slt2, las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 y la MAPKKK Bck1, que es activada por la proteína quinasa C, Pkc1. La activación de esta ruta da lugar a la expresión de genes necesarios para el mantenimiento de la homeostasis de la pared celular. Esta ruta de MAPKs es la única en *S. cerevisiae* que presenta dos MAPKKs. En este trabajo hemos comprobado que tanto Mkk1 como Mkk2, así como proteínas químicas obtenidas por el intercambio de sus dominios catalíticos y regulatorios, son capaces de mantener eficientemente la transmisión de la señal, confirmando que ambas tienen una función equivalente en la ruta. Además, en respuesta a la activación de esta ruta, Mkk1 y Mkk2 son fosforiladas de manera dependiente tanto de sus activadores como de su propia diana de fosforilación, la MAPK Slt2. Hemos demostrado que Slt2 es capaz de fosforilar in vitro a Mkk1 y Mkk2 y que la serina en 50 de Mkk2 es una diana directa de esta fosforilación. Sin embargo, Mkk2 es fosforilada en otros residuos adicionales que, aunque diferentes de los residuos consenso de fosforilación por MAPK, (S/T)-P, dependen también de Slt2. Se ha caracterizado un dominio D (*Docking*) de interacción con MAPKs en el extremo N-terminal de Mkk2,

esencial para su interacción con Slt2 y para la retrofosforilación. Nuestros datos demuestran que las MAPKKs de la ruta de integridad celular son sustratos de su MAPK, sugiriendo la existencia de un complejo mecanismo de regulación por retroalimentación a este nivel.

## El bucle microbiano en las lagunas someras esteparias de Castilla y León: importancia ecológica e influencia de la eutrofización

Ana Conty Fernández

Director: **Eloy Bécares Mantecón**

Área de Ecología, Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental, Universidad de León

Esta tesis aborda el estudio del bucle microbiano en lagunas someras esteparias de Castilla y León. El objetivo fue estudiar como influye la eutrofización así como el porcentaje del volumen de la laguna ocupado por macrofitos sumergidos (PVI) en la estructura de la red trófica microbiana (MFW) y en sus relaciones con el resto de organismos planctónicos. Para ello se seleccionaron 34 lagunas situadas en un amplio rango de valores de fósforo total (PT) y clorofila a planctónica (Cla). Los muestreos se realizaron en el verano de los años 2003 (34 lagunas) y 2004 (23 lagunas). El análisis de abundancia y biomasa de bacterias se realizó mediante tinción DAPI y análisis de imagen, y el análisis de la comunidad se efectuó mediante CARD-FISH. La cuantificación de flagelados heterótrofos (HNF) se realizó mediante tinción con primulina y el análisis de ciliados mediante QPS. Los principales resultados de la tesis indican que: 1) La Cla es más importante que la concentración de PT al describir las variaciones de la biomasa de los componentes del MFW. 2) En las lagunas más eutrofizadas, la alta depredación de los protozoos sobre las bacterias no sólo controla su biomasa sino que parece contribuir al desarrollo de bacterias de mayor tamaño resistentes a la depredación. 3) Las variables que determinan la composición de la comunidad bacteriana dependen del estado trófico de las lagunas así como del PVI. Los ciliados y los cladóceros son los principales grupos depredadores que condicionan la estructura de la comunidad bacteriana. 4) Los HNF parecen estar controlados fundamentalmente por depredación por cladóceros en las lagunas menos eutróficas, mientras que las bacterias y la competencia con los ciliados serían las variables de control en las lagunas más eutróficas. 5) El PVI condiciona los efectos de la eutrofización sobre los valores de diversidad y riqueza de taxones de la comunidad de ciliados. 6) El valor de la pendiente de la recta de regresión entre la abundancia de ciliados y la Cla indica que en las lagunas someras analizadas existe una mayor abundancia de ciliados para una misma concentración de Cla con respecto a los lagos de latitudes mayores, hallándose valores más parecidos a los encontrados en lagos de zonas subtropicales. 7) Tanto en PVI como el estado trófico de las lagunas condiciona la estructura de la comunidad de ciliados, la cual se define fundamentalmente

por variables relacionadas con los recursos. La depredación, especialmente por cladóceros, parece tener importancia en la estructura de los tamaños de los ciliados. 8) Los cladóceros dominan la biomasa del zooplancton en las lagunas menos eutrofizadas, siendo responsables fundamentales en la estructura de las comunidades de ciliados, así como del control de las poblaciones de HNF. 9) Los protozoos, y de forma especial los ciliados, tienen su principal papel en ambos extremos del gradiente de Cla, y de forma especial en las lagunas más hipereutróficas donde llegan a suponer el hasta 70% de la biomasa del zooplancton. Dado el carácter somero y el uso agrícola-ganadero de su entorno, el papel de las bacterias y sus depredadores parece ser fundamental para la transferencia de materia orgánica y nutrientes inorgánicos hacia niveles tróficos superiores. Obviar su estudio en el análisis del plancton supone un sesgo importante en los resultados que se obtengan.

### **Application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of *Haemophilus parasuis***

**Alexandre Olvera van der Stoep**

Directora: **Virginia Aragón Fernández**  
Centro de realización: *Centre de Recerca Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA.*  
Centro de presentación: *Departament de biologia molecular i bioquímica.*

*Haemophilus parasuis* is the etiological agent of Glässer's disease, but this bacterium causes other clinical outcomes and can also be isolated from the upper respiratory tract of healthy pigs. Isolates of *H. parasuis* differ in phenotypic features (e.g. protein profiles, colony morphology or capsule production) and pathogenic capacity. Differences among strains have also been demonstrated at the genetic level. Several typing methods have been used to classify *H. parasuis* field strains, but they showed resolution or implementation problems. To overcome these limitations, different DNA sequence based techniques were evaluated. Consequently, the final goal of this study was to improve *H. parasuis* typing and examine the association of groups of strains with disease outcome.

In the first chapter of this work, a partial sequence from the heat shock protein 60 kDa (*hsp60*) gene was assessed as epidemiological marker in a single locus sequence typing (SLST). We compared enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR patterns, partial sequences of *hsp60* and 16S rRNA genes from 103 strains of *H. parasuis* and other related species. In the second chapter of this work, we developed a multilocus sequence typing (MLST) system using partial sequences of the house-keeping genes *mdh*, *6pgd*, *atpD*, *g3pd*, *frdB*, *infB* and *rpoB*. Eleven reference strains and 120 field strains were included in this latter study.

Our results showed that *hsp60* is a reliable marker for epidemiological studies in *H. parasuis*, and the analysis of its sequence is a better approach than fingerprinting methods. Surprisingly, the 16S rRNA gene showed enough

variability to be used, not only for species identification, but also for typing. Furthermore, the analysis of the *hsp60* and 16S rRNA sequences revealed the presence of a separated lineage of disease-associated strains. Both SLST and MLST studies indicated the occurrence of lateral gene transfer among *H. parasuis* and *Actinobacillus* strains invalidating the use of single gene approaches in the phylogenetic analysis of these species. MLST analysis revealed the existence of 6 clusters. When the clinical background of the isolates was examined, one cluster was statistically associated with nasal isolation, while another cluster was associated with isolation from lesions. The latter cluster was the same disease-associated cluster identified by *hsp60* and 16S rRNA gene analysis. Finally, although a freely recombining population structure was reported, two divergent branches were found when a neighbour-joining tree was constructed with the concatenated sequences. The latter, supports the results obtained by 16S rRNA gene sequencing and indicate that *H. parasuis* is more likely to have a cryptic speciation than a true panmictic population structure.

### **Diversidad microbiana de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba.**

**Félix Daniel Andueza Leal**

Directoras: **Carmen De la Rosa y Angeles Mosso**  
Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Se ha estudiado la diversidad microbiana de cinco manantiales de aguas mineromedicinales pertenecientes a los Balnearios de Serón, Sicilia y La Virgen, en la localidad de Jaraba (Zaragoza). Las muestras se tomaron durante las distintas estaciones del año, en un período de dos años. Con el fin de conocer la composición y características de la microbiota de interés sanitario y ecológico de estos manantiales, se han estudiado los microorganismos indicadores de calidad así como diferentes grupos microbianos que intervienen en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre. El número de microorganismos totales ha sido bajo, con valores entre  $1 - 25 \times 10^4$  microorganismos por mL, estando la mayoría vivos (71 - 100 %), con un valor medio de 90 %. Se observó muy poca fluctuación estacional, lo que evidencia una población microbiana constante en el tiempo. El número de bacterias heterótrofas aerobias ha sido inferior a 14 ufc/mL, manteniéndose constante a lo largo de las estaciones del año. No se han detectado microorganismos de interés sanitario como: coliformes totales, coliformes fecales, enterococos, *Clostridium* sulfito reductores, *Salmonella*, *Legionella pneumophila* ni *Staphylococcus aureus*. El número de cepas de bacterias heterótrofas aisladas ha sido de 478 de la que se han identificado el 87 % que corresponden a bacterias Gram. negativas (66,1 %) y bacterias Gram positivas (33,9%). En las bacterias Gram negativas han predominado las Gammaproteobacterias (45,7 %) Los géneros principalmente identificados han sido: de los bacilos Gram negativos, *Enterobacter* (34,7 %) y

*Pseudomonas* (29,5 %), de los cocos Gram positivos, *Staphylococcus* (66,2 %), y de los bacilos Gram positivos, *Cellulomonas* (8,3 %). La mayoría de los manantiales presentan una gran diversidad microbiana, excepto el manantial La Peña. En relación a los microorganismos de interés ecológico, los más abundantes han sido los amonificantes (media anual: 42 -296 NMP/100 mL), seguidos de los amilolíticos (media anual: 8,2 - 100,9 NMP/100 mL,) y proteolíticos (media anual: 11 - 61 NMP/100 mL). Los celulolíticos se han detectado en número muy bajo (media anual: 0,7 - 20 NMP/mL). No se han detectado bacterias sulfato-reductoras. Las bacterias halófilas se han detectado en número muy bajo, con un promedio anual entre 1 y 5,8 ufc por 100 mL de agua. Se han identificado como pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Photobacterium*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Se han encontrado mohos en todos los manantiales en número bajo, con un valor medio anual entre 0,8 - 5 ufc/100 mL. Los principales géneros aislados son *Penicillium*, y *Cladosporium*. No se han detectado actinomicetos en ningún manantial. Se encontraron algas y cianobacterias en los manantiales San Vicente y San José, donde se aislaron en otoño cianobacterias del género *Synechocystis* y algas verdes del género *Chlorococcum*. En los depósitos calcáreos formados en los manantiales se han observado microorganismos endolíticos, pertenecientes a cianobacterias esféricas (*Synechocystis* y *Chroococcus*) y filamentosas (*Anabaena* y *Lyngbya*).

### **Estudio de CaCwt1 de *Candida albicans* homólogo al factor de transcripción Rds2 de *Saccharomyces cerevisiae*.**

**Inmaculada Moreno Gimeno**

Directores: **Eulogio Valentín Gómez, Rafael Sentandreu Ramon y Luis Carlos Castillo Barahona**  
Centro de Realización: *Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia.*  
Centro de Presentación: *Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.*

*Candida albicans* es el principal hongo patógeno en el ser humano, principalmente en pacientes en los que su sistema inmunitario está comprometido. En la actualidad la candidiasis invasiva es la causa más común de infecciones nosocomiales, asociada a una mortalidad del 40%. *C. albicans* es un hongo polimórfico que presenta la facultad de crecer como levadura, hifa y pseudohifa.

Uno de los aspectos por los que *C. albicans* puede comportarse como comensal o como agente patógeno es su capacidad para responder a los cambios del medio ambiente. Para comprender los mecanismos de adaptación en hongos patógenos a los cambios ambientales continuos dentro del ser humano, es especialmente importante que factores transcripcionales y/o mediadores estén implicados.

Mediante un análisis *in silico* del genoma de *C. albicans*, se han detectado 70 teóricos facto-

res transcripcionales de la familia Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>. Uno de ellos, IPF3781 (a partir de aquí Cwt1), se eligió para su estudio dada la elevada homología que presenta con el factor de transcripción Rds2 de *Saccharomyces cerevisiae*. El análisis fenotípico del mutante nulo *cwt1/cwt1* indica que Cwt1 está implicado en la arquitectura de la pared celular de *C. albicans*, así como en la morfogénesis de esta levadura, sobre todo en medios sólidos. Adicionalmente a los estudios sobre pared celular realizados, se ha estudiado la expresión y regulación, mediante micromatrices de ADN, de diferentes genes en las fases exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento con el fin de poder elucidar más fehacientemente el papel de Cwt1. Un total de 460 genes en fase exponencial y 666 genes en fase estacionaria tenían alterada su expresión, de los que 121 genes eran comunes a ambas fases de crecimiento de la levadura. Este distinto perfil transcripcional podría explicar el pleiotropismo encontrado en el mutante nulo *cwt1/cwt1*. El estudio *in silico* de las regiones promotoras de los genes cuya expresión estaba alterada indica que las secuencias AGGGCT/AGCCCT podría ser la secuencia de unión de Cwt1 a ADN.

Cabe señalar que gran parte del estudio realizado versa sobre la pared celular, dada la importancia que esta estructura tiene en los primeros pasos de una infección, así como para el diseño de nuevos fármacos antifúngicos.

### **Detección molecular de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo. Estudio de la diversidad genética y virulencia de cepas aisladas.**

**Jaime Navas Fernández**

Directores: **Joaquín V. Martínez Suárez y Victoria López Alonso**

Centro de realización: **Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos.**

Centro de presentación: **Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria.**

Entre los factores importantes a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos cabe destacar:

- a) La elevada incidencia de *L. monocytogenes* en algunos alimentos (como los productos elaborados con carne picada de pollo), en los cuales suele estar presente, sin embargo, en números muy bajos.
- b) La dificultad del cultivo de las células de *L. monocytogenes* que pueden encontrarse dañadas debido al procesado de los alimentos.
- c) La presencia en un mismo alimento contaminado de cepas diferentes, que pueden tener diferente capacidad patogénica.

Teniendo en cuenta lo expuesto, el trabajo presentado en esta tesis doctoral consistió en:

**1. Detectar en carne de pollo células de *L. monocytogenes* sometidas a tratamiento térmico y de altas presiones, comparando la detección mediante cultivo y PCR. Únicamente mediante la combinación de 24 horas de enri-**

quecimiento selectivo y la detección por PCR fue posible lograr un nivel de sensibilidad próximo al de los métodos microbiológicos convencionales. La detección de células de *L. monocytogenes* dañadas subletalmente en carne de pollo procesada mediante altas presiones se logró empleando el medio cromogénico ALOA.

**2. Analizar la contaminación natural por *L. monocytogenes* en productos comerciales elaborados con carne picada de pollo, empleando protocolos de enriquecimiento selectivo y PCR a tiempo real.** Se encontraron muestras con resultados discrepantes entre ambos métodos de detección. El principal factor relacionado con la obtención de resultados negativos falsos por PCR fue el bajo número de células de *L. monocytogenes* presente en la muestra. La presencia de un número elevado de UFC de otras especies de *Listeria* se pudo relacionar con algunos resultados negativos falsos de la detección de *L. monocytogenes* por cultivo.

**3. Estudiar la diversidad genética de cepas de *L. monocytogenes* aisladas a partir de productos frescos elaborados con carne de pollo.** El análisis de los subtipos moleculares de 120 aislados mediante el estudio por PCR de los grupos de serotipos principales y la técnica de electroforesis en gel en campo pulsante, permitió diferenciar 11 pulsotipos o cepas (R1-R11).

**4. Caracterizar la capacidad patogénica de un grupo de cepas genéticamente diferentes de *L. monocytogenes* aisladas de hamburguesas de pollo comerciales.** La presencia de codones prematuros de parada en la secuencia del gen de la internalina A de tres de las cepas (R1, R8 y R10) (40% de los aislados) se relacionó con la ausencia de la proteína completa, así como con la escasa invasión de células humanas. La cepa R10 (4'4% de los aislados) fue la única que careció de actividad hemolítica y lecitinasas, fue incapaz de multiplicarse intracelularmente en células en cultivo, y fue avirulenta en ratones inmunocomprometidos. La secuenciación del gen del regulador central de la virulencia PrfA de la cepa R10 reveló la existencia de una inserción de 7 nucleótidos en el codón 171, mutación que permite explicar la pérdida de la capacidad patogénica en esta cepa de *L. monocytogenes* aislada de alimentos.

### **Estudio epidemiológico y caracterización genética del virus de la hepatitis E en explotaciones porcinas**

**M. Salceda Fernández-Barredo y del Amo**

Directores: **María Teresa Pérez Gracia y Ángel García Muñoz**

**Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Cardenal Herrera-CEU.**

This study describes the distribution of Hepatitis E virus (HEV) in a naturally infected swine population and the genetic relatedness of HEV strains on swine farms in Spain. Of fecal and serum samples collected from 191 pigs and manure-ditch samples collected from 21 farms, HEV was detected in 19%, 12%, and 38%, respectively, for an overall prevalence rate of 25%. The maximum prevalence rates for feces and serum

were in pigs 13 to 16 wk old. A high prevalence of the virus in feces (18%) was observed in sows. Gene sequencing was performed on 30 strains from feces, serum, and manure ditch: the nucleotide identities varied from 85% to 99% when compared with those of other strains of genotype 3 isolated from swine. This is the first study in Europe to show the variation in virus distribution by age in feces and serum in a naturally infected swine population.

### **Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas**

**María Esther Rodríguez Jiménez**

Directores: **Jesús Manuel Cantoral Fernández y Laureana Rebordinos González.**

**Laboratorio de Microbiología y Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz.**

El empleo de cepas de levaduras autóctonas para producir vinos con propiedades organolépticas típicas de una región productora es una práctica que cada vez tiene más importancia en las bodegas. Hasta el año 2001, en una Bodega situada en el suroeste de España se realizaban las fermentaciones de un vino joven de la Tierra de Cádiz de forma espontánea. Dada la importancia comercial de este vino surgió la necesidad de controlar el proceso de fermentación mediante la selección de levaduras autóctonas y producir así un vino con propiedades sensoriales mejoradas.

Para este fin se llevó a cabo la caracterización genética de las cepas de levaduras implicadas en la fermentación espontánea del vino objeto de estudio mediante la utilización de la técnica molecular de Electroforesis en Campo Pulsante (PFGE), y tener así un conocimiento más amplio de las cepas de levaduras más representativas del proceso. Tras este estudio se preseleccionaron cuatro cepas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* de entre aquellas que mostraron los patrones moleculares o cariotipos electroforéticos más abundantes.

Posteriormente, se aplicaron algunos criterios de interés enológico como por ejemplo inhibición por etanol, poder fermentativo, factor "killer" y capacidad de implantación para seleccionar, de las cuatro cepas elegidas inicialmente, las más adecuadas para conducir las fermentaciones en condiciones industriales. Se seleccionaron por tanto 3 cepas con cariotipos P2, P3 y P5 para inocular las fermentaciones durante 5 años consecutivos. El seguimiento de las levaduras inoculadas se realizó mediante la técnica de PFGE, una vez finalizadas las vendimias, comprobándose que la cepa con patrón P5 fue la que predominó en las fermentaciones de tres de las vendimias estudiadas, obteniéndose en ellas un producto final con características organolépticas mejoradas con respecto al obtenido de las fermentaciones espontáneas.

A medida que se fueron obteniendo los resultados de las fermentaciones inoculadas y se mostró el comportamiento de las cepas de

levaduras seleccionadas en condiciones industriales fueron surgiendo nuevas cuestiones, como por ejemplo, si estas cepas se mantenían estables genéticamente durante las fermentaciones. Analizando la estabilidad del cariotipo de las levaduras seleccionadas se comprobó que la de patrón P5 era estable genéticamente. Por otro lado, ante la posibilidad de que, durante las fermentaciones inoculadas, la cepa seleccionada no fuera la conductora de la fermentación, fue necesario aplicar un método de control microbiológico que nos pusiera de manifiesto si la cepa inoculada era la que estaba llevando a cabo la fermentación o no. La técnica molecular del Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt) a muestras tomadas directamente del mosto fermentando sin necesidad de realizar aislamientos fue decisiva para este fin y tener un mayor control del proceso.

## Respuesta inmunitaria protectora frente a *Candida albicans*. Análisis del transcriptoma, proteoma y tráfico intracelular tras su interacción con el macrófago.

**Elena Fernández-Arenas Hervás**

Directora: **Concha Gil García.**

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

*Candida albicans* es un hongo patógeno oportunista capaz de causar varios procesos infecciosos que dependen del estado inmunitario del paciente (1). Especial importancia tiene la contribución de las respuestas innata (macrófagos) y adaptativa celular en la resolución de las candidiasis sistémicas (2), sin embargo, actualmente la contribución de la respuesta humoral está siendo reevaluada (3).

En un primer lugar se analizó el papel de los anticuerpos en la resolución de las candidiasis sistémicas utilizando un modelo murino de infección sistémica y diferentes cepas avirulentas del hongo, como posibles “cepas vacunales”. Con estos experimentos se demostró que no todas las cepas de baja virulencia presentan una capacidad para vacunar, indicando que la estimulación de una respuesta inmune protectora es debida a la expresión de determinados epítopos antigénicos dependientes del fondo genético de la cepa mutante empleada. Es más, ensayos de vacunación con el mutante de *C. albicans* de baja virulencia CNC13 se puso de relieve la importancia de la colaboración entre las respuestas inmunitarias celular y humoral en la inducción de una protección duradera.

En paralelo, mediante el empleo de técnicas proteómicas (2D-PAGE [geles bidimensionales] en combinación con “immunoblotting” y espectrometría de masas) se definió por primera vez un *inmunoma* protector de *C. albicans*. Algunas de estas proteínas antigénicas identificadas podrían ser posibles candidatos en el diseño de una futura vacuna o ser empleados como marcadores de diagnóstico (4, 5).

Para entender mejor la compleja interacción entre *Candida* y el hospedador, se estudió la respuesta del hongo tras su interacción con el

macrófago. Para ello se puso a punto a) un modelo *in vitro* de fagocitosis, b) un método de tinción diferencial para poder distinguir entre levaduras internalizadas y no-internalizadas, y c) un protocolo de enriquecimiento en las levaduras fagocitadas. En dicha muestra se realizó por primera vez un análisis conjunto del transcriptoma y del proteoma de *Candida* y así obtener una visión global e integrada de los estadios iniciales del proceso infeccioso. Mediante la integración de los datos genómicos y proteómicos junto con el empleo de herramientas bioinformáticas (redes de interacción):

-hemos descrito como diferentes procesos biológicos (metabolismo y energía, defensa frente a estrés oxidativo y morfogénesis y diferenciación celular) modulan su expresión, en un intento de adaptación de la levadura al entorno hostil que la rodea (el fagosoma).

-además, hemos formulado por primera vez un modelo hipotético de muerte celular por apoptosis de *Candida* tras interaccionar con el macrófago, poniendo de relieve la interconexión entre el citoesqueleto de actina, la mitocondria y la autofagia en la regulación de dicho proceso (6).

Por último, y con objeto de profundizar en el estudio de la interacción *Candida*-macrófago (comentado previamente), e investigar el papel de diferentes factores de virulencia en el proceso de maduración del fagosoma, realizamos un estudio comparativo del tráfico intracelular de dos cepas (virulenta/avirulenta) de *C. albicans* mediante microscopía confocal. Dicho estudio nos permitió definir:

-mecanismos de supervivencia comunes a ambas cepas relacionados con el proceso de maduración del fagosoma (bloqueo de la acidificación e inhibición de la síntesis de óxido nítrico).

-mecanismos de supervivencia específicos de la cepa virulenta ligados a su capacidad de filamentación (rotura de la membrana fagosomal y plasmática del macrófago) y de bloqueo de la fusión del fagosoma con el lisosoma (Fernández-Arenas E. et al., enviado).

### BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Pfaller, M.A. and Yu, W.L. (2001). *Infect. Dis. Clin. North Am.* 15, 1227-1261.
- (2) Romani, L. (1999). *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 363-367.
- (3) Cassone, A., et al., (2005). *Curr. Mol. Med.* 5, 377-382.
- (4) Fernández-Arenas, E., et al., (2004). *Proteomics* 4 (10), 1204-1215.
- (5) Fernández-Arenas, E., et al., (2004). *Proteomics* 4 (10), 3007-20.
- (6) Fernández-Arenas, E., et al., (2007). *Mol. Cell. Proteomics* 6, (3) 460-478.

## Factores de virulencia y patogénesis de *Vibrio vulnificus* biotipo 2 serovar E

**Esmeralda Valiente Conejero**

Directores: **Carmen Amaro González**

y **Jesús Lamas Fernández**

Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia.

*Vibrio vulnificus* biotipo 2 comprende las cepas de *Vibrio vulnificus* capaces de causar vibriosis en peces. En los últimos años, se han realizado avances importantes en el conocimiento de la biología de este patógeno, sin embargo, no se han estudiado los factores de virulencia importantes en la patogénesis de la

vibriosis producida por esta bacteria. En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado el papel del plásmido pR99, recientemente descrito, y el de factores de virulencia seleccionados, la cápsula, el LPS y la metaloproteasa Vvp en la patogénesis de la vibriosis causada por este patógeno. Para ello se ha obtenido una cepa deficiente en el plásmido pR99, así como cepas deficientes en cada uno de los factores y se han comparado con la cepa parental en ensayos de virulencia así como de colonización y de resistencia a las defensas innatas de la anguila.

Hemos demostrado que la metaloproteasa en *V. vulnificus* biotipo 2 es un factor de colonización que media quimiotaxis hacia el moco que recubre la agalla, probablemente al unirse a mucina y degradarla. Los estudios histopatológicos realizados con el mutante en metaloproteasa nos indican que esta proteína no tiene ningún papel en la producción de hemorragias. El antígeno-O tiene un papel en el establecimiento de agrupaciones bacterianas en la superficie de las agallas que, al estar recubiertas de moco, resistirán mejor las condiciones adversas. En contraposición, la cápsula no tiene un papel tan claro en la colonización de la superficie externa. Ambas estructuras de naturaleza polisacárida son muy importantes en el proceso de colonización del medio interno. Con respecto al plásmido, éste codifica para un sistema de resistencia a los mecanismos de inmunidad innata que es específico de hospedador.

También, hemos demostrado que *Vibrio vulnificus* produce autoinductores del tipo acil-homoserinas lactonas (AHL) implicados en el sistema de *quorum sensing*. Estos compuestos se producen cuando se simulaban las condiciones de supervivencia en el medio natural y se sobreexpresan añadiendo compuestos de la sangre que la bacteria puede utilizar como fuente de hierro para crecer, pudiendo tener un papel en la virulencia. Los intentos por demostrar la base genética para la producción de AHL en la especie fueron infructuosos, aunque los resultados sugieren que podrían radicar en genes completamente nuevos. Finalmente demostramos que todos los biotipos pueden producir AI-2, detectando en ellos el gen *luxS*. El árbol construido a partir de las secuencias reportadas en varias especies de vibrios para este gen reconstruye el árbol filogenético de los vibrios lo que sugiere que puede tratarse de un gen ancestral conservado a nivel de especie.

El patógeno causa una vibriosis que se diferencia de la vibriosis clásica en que la sintomatología está asociada a muy pocas bacterias. Ésta consiste en hemorragias externas e internas. Los síntomas principales de esta vibriosis pueden ser simulados inyectando los productos extracelulares, lo que sugiere que los factores tóxicos que produce la bacteria durante su crecimiento *in vivo* están presentes en los productos extracelulares y que no se requiere de la bacteria viva para simular el proceso infeccioso.

Con el objeto de detectar portadores sanos y disminuir el riesgo para el consumidor que la presencia de una bacteria zoonótica puede suponer en el pescado, hemos puesto a punto un método de detección que no requiere el sacrificio del animal.

En conclusión, los factores de virulencia estudiados juegan un papel importante en la virulencia de *V. vulnificus* biotipo 2 serovar E.

Este patógeno desarrolla diversas estrategias para la invasión de su hospedador generando fuertes hemorragias en los tejidos. Un método de detección rápido y eficaz que no requiere el sacrificio del animal supone un gran avance para la lucha frente a este patógeno en anguicultura.

## Glicoproteínas y viabilidad celular en *Campylobacter jejuni*. Relación del proceso de glicosilación con el proceso de supervivencia

Cecilia Girbau Iturralde

Directores: **Aurora Fernández-Astorga** y **Rodrigo Alonso Monsalve**

Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

*Campylobacter jejuni* está considerado como una de las principales causas de gastroenteritis de origen microbiano en humanos. Bajo condiciones ambientales adversas, como la limitación nutricional o las bajas temperaturas, *C. jejuni* es capaz de entrar en el estado viable no cultivable (VNC) como estrategia de supervivencia. Bajo este estado pierde la capacidad de crecer en los medios de cultivo no selectivos en los que normalmente crece pero mantiene actividad metabólica detectable. Además del interés científico intrínseco, el estudio del estado VNC cobra interés a la hora de valorar sus repercusiones en salud pública.

Durante mucho tiempo la glicosilación proteica ha sido considerada un fenómeno específicamente eucariota, sin embargo en la actualidad la existencia de glicoproteínas procariontas es un hecho firmemente establecido. *C. jejuni* posee dos sistemas de glicosilación proteica: el sistema de glicosilación de la flagelina y el sistema de glicosilación general o N-glicosilación, en la que se centra este trabajo.

Los genes responsables de la N-glicosilación están englobados en el locus genético *pgl*. El enzima clave de este sistema de glicosilación es la proteína PglB, que probablemente actúe como una oligosacárido transferasa responsable de la transferencia del azúcar a la cadena peptídica.

Está demostrado que la lectina SBA se une específicamente a los residuos N-acetilgalactosamina de las N-glicoproteínas de *C. jejuni*. Este hecho ha permitido elaborar útiles herramientas para la purificación de N-glicoproteínas.

El objetivo global de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar la relación existente entre la N-glicosilación y la supervivencia de *C. jejuni* en condiciones adversas de nutrientes y baja temperatura.

Para la consecución de este objetivo se construyó una cepa de *C. jejuni* con el gen *pglB* inactivado por la inserción de un casete de resistencia a kanamicina. Posteriormente se estudiaron los efectos derivados de dicha inactivación sobre el crecimiento y la capacidad de supervivencia de la cepa mutante y de su homóloga salvaje. Mientras que la inactivación del gen *pglB* no afectó a los parámetros de crecimiento de la cepa mutante, sí afectó negativamente a su capacidad de supervivencia, acortando el tiempo

promedio de entrada en el estado VNC. Estos resultados son, por tanto, indicativos de la implicación de la N-glicosilación proteica en la supervivencia de *C. jejuni*.

Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue la caracterización del glicoproteoma de *C. jejuni* mediante el análisis comparativo de los perfiles de glicoproteínas reactivas frente a la lectina SBA, así como la identificación de glicoproteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en células cultivables y viables no cultivables.

El estudio comparativo de los perfiles de glicoproteínas puso de manifiesto una clara disminución de la capacidad de glicosilar proteínas en la cepa mutante, confirmando la implicación del gen *pglB* en el proceso de N-glicosilación. La ausencia de glicosilación en la cepa mutante de ciertas proteínas como serin-proteasa HtrA, SucD o PEB3, sí glicosiladas en la cepa salvaje, justificaría la menor capacidad de supervivencia de la cepa mutante. De este modo, se establece una relación entre la N-glicosilación proteica y la supervivencia bajo condiciones adversas de nutrientes y baja temperatura en *C. jejuni*.

La identificación de las proteínas ADK, DnaK, CheW, PEB4, Ycel, RibH, serin-proteasa HtrA y SucD, no descritas hasta este trabajo como N-glicoproteínas de *C. jejuni*, contribuye a la ampliación del conocimiento del glicoproteoma de este organismo, poniendo a su vez de manifiesto la necesidad futura de un estudio más pormenorizado en el campo de la N-glicosilación.

## Estudio de la lisogenia doble de fagos-STX2

Ruth Serra Moreno

Directores: **Joan Jofre Torroella** y **Maita Muniesa Pérez**  
Universitat de Barcelona.

*Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) es agente causal de enfermedades como la colitis hemorrágica, el Síndrome de Uremia Hemolítica y la Púrpura Trombótica Trombocitopénica.

Su principal reservorio es el ganado de vacuno y la vía de transmisión al hombre es por consumo de alimentos contaminados o mal cocinados.

El principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga. Estructuralmente es similar a la que expresa *Shigella dysenteriae* serotipo I. Esta toxina se encuentra codificada en el genoma de fagos de tipo lambdaoide, que se establecen como profagos en STEC (fagos-stx) y se expresa tras la activación del ciclo lítico.

Cierto porcentaje de las STEC aisladas de medio ambiente y/o de alimentos es portador de más de un profago-stx en su genoma, lo que hace necesario el estudio de la doble lisogenia en estas cepas, así como posibles interacciones entre estos fagos y sus repercusiones en la patogenicidad.

Por este motivo los objetivos de la tesis doctoral fueron:

1. Caracterizar fagos-stx de origen animal atendiendo a su morfología, tamaño del genoma, patrón RFLP, secuencia del gen *stx*, espectro de huéspedes y capacidad de conversión lisogéni-

ca en cepas de laboratorio. Los resultados muestran heterogeneidad de los fagos analizados, si bien el gen *stx* estaba muy conservado (Muniesa et al., 2004. Microbiol).

2. Obtención de fagos-stx recombinantes, a los que se les introdujo un gen de resistencia a antibiótico que permitiera la mejor selección de lisógenos y que a su vez pudiera hacer distinguible un fago-stx de otro (recombinante). (Serra-Moreno et al., 2006. BMC Mol. Biol.)

3. Estudio de la lisogenia doble de fagos-stx. A partir de este conjunto de fagos pudimos realizar experimentos de conversión lisogénica en los que seleccionamos la presencia del fago recombinante. Nuestros resultados muestran que en la mayoría de los casos la incorporación del segundo profago está más favorecida que si éste mismo se incorporara en la misma cepa, pero sin el primer profago. Con una frecuencia similar se observó la sustitución del primer fago-stx por el segundo. Y en sólo tres casos de ochenta la incorporación del fago recombinante en la cepa sin profago-stx fue superior. Esto nos indicó que, existía algún tipo de interacción génica entre los dos profagos que facilitaba la inserción del segundo (en los casos en que la doble lisogenia era favorecida). Los análisis posteriores de mutagénesis dirigida demostraron que el gen *cl* del primer profago está implicado en esta función. Su eliminación implicaba la no generación de dobles lisógenos mientras que su complementación restituía los valores iniciales. Además se observó que los dobles lisógenos tienen una tasa menor de inducción del ciclo lítico, lo que supone una menor producción de partículas víricas y de toxina Shiga, tal y como mostraron nuestros análisis. (Serra-Moreno et al., 2008. J. Bacteriol. en revisión).

4. Lugares de inserción ocupados por los fagos-stx. Se analizaron los lugares de inserción ocupados por los fagos caracterizados en sus cepas de origen STEC y en distintas cepas de laboratorio. Se observó que podían ocupar *loci* diferentes dependiendo de la cepa, el mismo hecho se repetía en el caso de los dobles lisógenos. En este caso si dos profagos solían ocupar el mismo *loci* (en sus respectivos lisógenos simples), en el lisógeno doble uno de los fagos pasaba a ocupar un *loci* secundario. Experimentos de mutagénesis en los que se eliminó uno de los lugares preferentes de inserción demostraron que, independientemente del tipo de tirosin recombinasa que posea el fago, éste se integra en un *loci* determinado dependiendo de su disponibilidad y accesibilidad en la cepa huésped (Serra-Moreno et al., 2007. J. Bacteriol)

Las conclusiones que de este trabajo se derivan es que la presencia de dos profagos en el genoma de STEC es un hecho frecuente y que puede ser un elemento de diversificación en estas cepas, puesto que al disminuir su capacidad de inducción del ciclo lítico disminuye la expresión de la toxina y por tanto su patogenicidad, pero al mismo tiempo mantienen el carácter *stx*, que de otra manera la expresión de la toxina implica en última instancia la muerte bacteriana. Por tanto la doble lisogenia podría actuar como un primer paso para la incorporación del nuevo material genético, lo que puede aumentar la eficacia biológica de la cepa a corto plazo.