

## **Epidemiología de los *Escherichia coli* verotoxigénicos de origen ovino: estudio longitudinal y de relaciones clonales en explotaciones ovinas extremeñas mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE).**

**Sergio Sánchez Prieto**

Directores: **Joaquín Rey Pérez y Juan Manuel Alonso Rodríguez.**

Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (UEX).

Los *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) son importantes patógenos emergentes para los seres humanos, responsables de graves procesos patológicos como la colitis hemorrágica o el síndrome urémico hemolítico. En los últimos años se ha detectado un gran número de brotes, mayoritariamente en países anglosajones y Japón, aunque existen referencias también en nuestro país. Si bien está claramente establecido que el ganado bovino y los pequeños rumiantes constituyen su principal reservorio, de forma que el consumo de alimentos contaminados a partir de heces de animales portadores, en particular carne, leche y vegetales, es su principal vía de transmisión, apenas existe información acerca de la colonización de manera natural de los ovinos por ECVT durante largos periodos de tiempo y de su ecología en las propias explotaciones.

Para abordar estos aspectos, se estudió la evolución de la prevalencia de ECVT en muestras fecales de ganado ovino tomadas mensualmente en 12 explotaciones de La Serena (Extremadura) a lo largo de 1 año, entre noviembre de 2003 y octubre de 2004. Se aislaron ECVT en el 74,1% del total de muestras analizadas, 98,6% de los animales examinados y 100% de las explotaciones de procedencia, confirmando que el ganado ovino es un importante reservorio de ECVT potencialmente patógenos para seres humanos. El ECVT O157:H7 sólo se aisló puntualmente en 2 muestras. Sin embargo, la prevalencia de ECVT no-O157 observada en los sucesivos muestreos mensuales se mantuvo entre el 65,9 y el 81,9% a lo largo de todo el año, por lo que no se observó ningún patrón estacional en la infección del ganado ovino.

Con objeto de completar el estudio de seguimiento longitudinal y analizar las relaciones clonales existentes entre aislados del mismo serogrupo, se determinó el antígeno O de los aislados de las 4 explotaciones más representativas. Entre ellos, se subtiparon mediante PFGE los 285 aislados de los serogrupos O5, O87, O91, O146, O166 y O176, todos ellos serogrupos frecuentes entre los ECVT ovinos y presentes en muchos casos entre los ECVT humanos. Se observó una considerable diversidad genética entre los aislados de cada sero-

grupo, con numerosos perfiles de PFGE diferentes dentro de cada una de las explotaciones. La mayoría de los clones se circunscribieron a 1 única explotación, con escasas excepciones. Aunque dentro de cada explotación se detectaron numerosos clones, algunos fueron claramente más prevalentes y se aislaron en distintos animales. Se puso de manifiesto la persistencia de determinados clones en las explotaciones durante periodos de hasta 11 meses, aislados consecutivamente hasta en 9 muestreos sucesivos. En los animales, individualmente, se pudo constatar asimismo la persistencia de clones concretos, con periodos de eliminación de hasta 9 meses, que se tradujo, sin embargo, en un patrón de eliminación intermitente en la mayoría de los casos, observándose en muchos de los animales la persistencia simultánea a lo largo del año de 2 ó incluso 3 clones pertenecientes a serogrupos diferentes. La transmisión horizontal de estos clones entre animales habría permitido su diseminación y, por tanto, el mantenimiento de la infección en las explotaciones.

## **Validación de técnicas de electroforesis bidimensionales para el estudio del proteoma y complexoma de membrana externa de *Neisseria meningitidis***

**Ana Abel Souto**

Directores: **Sandra Sánchez Poza y M<sup>a</sup> Teresa Criado Alvarez.**

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

La separación analítica de las proteínas de la membrana externa bacteriana es esencial para la identificación de candidatos adecuados para el desarrollo de vacunas pero hay que tener en cuenta que en muchos casos, la inmunogenicidad de las mismas dependerá de que éstas se expresen en su forma nativa, lo que hace necesaria la utilización de métodos no desnaturizantes, tal como es el caso de la electroforesis Blue-Native (BN). Para este objetivo analítico, se utiliza frecuentemente la electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y/o la electroforesis bidimensional en conjunción con isoelectroenfoque (IEF/ SDS-PAGE). Independientemente del método que se utilice, el primer paso necesario es el enriquecimiento, pues las proteínas de membrana constituyen una parte reducida del proteoma de la célula y debido a ello no pueden ser analizadas fácilmente mediante métodos que consideren el total de las proteínas presentes en la misma. En el caso de *N. meningitidis* se aprovecha la capacidad de la bacteria para producir OMVs constituidas principalmente por membrana externa.

En este estudio hemos evaluado la utilidad de tres técnicas electroforéticas bidimensiona-

les diferentes para el análisis del proteoma y complexoma de membrana externa de *Neisseria*. La evaluación de las relaciones existentes entre las distintas proteínas es importante desde el punto de vista inmunológico, pues su unión puede determinar la formación de epítopos conformacionales o compartidos.

La 2D SDS-PAGE (electroforesis bidimensional diagonal) utilizando diferentes tratamientos en cada dimensión ha demostrado ser un método rápido, simple y fiable tanto para la detección de complejos multiproteicos, como para estudiar la disociación de proteínas inducidas por temperatura o los cambios conformacionales debidos a la misma.

El análisis mediante 2D BN/SDS-PAGE permite determinar la composición de los complejos de membrana en condiciones nativas, pues se trata de un sistema electroforético no desnaturizante, que posibilita el estudio funcional de los complejos una vez separados.

La técnica 2D IEF/SDS-PAGE excluye del análisis proteico de la membrana externa de *Neisseria* aquellas con tendencia a formar complejos y además en el caso de algunas proteínas mayoritarias, la técnica detecta numerosas isoformas que en realidad son artefactos, lo que nos lleva a concluir que no es la más adecuada para el estudio de la membrana externa si bien los mapas proteicos de *Neisseria lactamica* y *Neisseria meningitidis* obtenidos, nos permite establecer que existe un grado de similitud entre ambas especies comparable al observado entre cepas de *Neisseria meningitidis*.

Tanto la electroforesis 2D dSDS/SDS-PAGE como la 2D BN/SDS-PAGE han resultado ser técnicas muy útiles y sencillas para la detección y análisis de complejos de proteínas de membrana externa. Además, la primera de ellas permite una óptima detección y resolución de proteínas con movilidad dependiente de la temperatura como es el caso de las proteínas de opacidad (Opa) de *Neisseria*.

En desacuerdo con la estructura homomérica propuesta para los poros de *Neisseria meningitidis*, los resultados de las electroforesis 2D dSDS/SDS-PAGE y BN/SDS-PAGE permite concluir que los complejos de porinas meningocócicas de membrana externa presentes en condiciones naturales en las cepas salvajes de esta especie, están formados por heterómeros de PorA y PorB y, en menor cantidad, por homómeros de PorB. Las asociaciones homoméricas de PorA únicamente de detectan en las cepas mutantes carentes de PorB.

Finalmente, postulamos que el sistema básico de transporte de *Neisseria meningitidis* estaría constituido por poros mixtos de PorA/PorB cuyo funcionamiento estaría complementado por la unión transitoria de distintas proteínas, entre ellas la RmpM, en función de las necesidades de transporte específicas de cada momento del ciclo celular. Por tanto, las dos porinas de *Neisseria meningitidis* podrían constituir un entramado dinámico de poros cuya composición sería variable a lo largo del tiempo y en función de las necesidades de las bacterias.

## Contribución del regulón Rcs a la virulencia de *Salmonella*: análisis genético y molecular

Clara Beatriz García Calderón

Directores: Francisco Ramos Morales y Josep Casadesús Pursals.

Departamento de Genética, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

*Salmonella* es un patógeno intracelular que causa enfermedad sistémica, gastroenteritis o aborto. La virulencia de muchas bacterias patógenas está mediada por sistemas de dos componentes, que transmiten estímulos externos, generando una respuesta específica. El sistema Rcs es un sistema de dos componentes formado por las proteínas de membrana interna, RcsC y RcsD, y el regulador de respuesta RcsB, que es un factor transcripcional. Se sabe que mutaciones en determinados genes, como *igaA*, conllevan la activación del sistema. Este gen es esencial, y mutaciones viables en el mismo atenúan la virulencia de *Salmonella*. El objetivo de este trabajo fue el estudio del regulón IgaA-Rcs.

Inicialmente se obtuvo una batería de mutantes *rscC* con activación constitutiva del sistema. Se caracterizaron once mutaciones, todas en la porción citoplásmica de la proteína. La mayoría eran dominantes, excepto dos, situadas en el dominio receptor de la proteína. Los distintos mutantes eran mucosos, inmóviles y exhibían diferentes grados de activación del sistema Rcs. Ensayos de infección en ratones demostraron que todos los mutantes estaban muy atenuados, y que la atenuación correlacionaba con el grado de activación del sistema. Los fenotipos de estos mutantes eran suprimidos por mutaciones en el gen *rscB*. Mutaciones en *gmm* o *rscA* (implicados en la síntesis de cápsula de ácido colánico) suprimían parcialmente la avirulencia del mutante *rscC* constitutivo, lo que sugiere que la sobreproducción de cápsula desempeña un papel negativo en la virulencia de *Salmonella*.

Se generó una colección de fusiones transcripcionales *lacZ* aleatorias en el cromosoma de *Salmonella*, y se comparó la expresión en condiciones de alta y baja activación del sistema Rcs. Así se identificaron trece genes regulados por Rcs, algunos específicos de *Salmonella* como los del operón *srfABC*, cuyos productos se habían descrito como posibles efectores de un sistema de secreción de tipo III. Ensayos de secreción indicaron que la proteína *SrfC* podía ser secretada por este mecanismo. El estudio de este operón indicó que estaba regulado negativamente tanto por el sistema Rcs como por el sistema PhoPQ, lo que nos hizo plantearnos que existiese una relación más amplia entre ambos regulones. Los ensayos en ratones con mutantes dobles y simples demostraron que, en efecto, existía un solapamiento parcial entre ambos regulones en las funciones de virulencia.

En la última parte de la tesis realizamos un estudio del gen *igaA* en el que caracterizamos el punto de inicio de la transcripción y demostramos que *igaA* es el primer gen de un operón compuesto por cuatro genes cuya transcripción es dependiente del factor  $\sigma$ -70. Mediante

un escrutinio genético basado en fusiones *igaA::lacZ*, encontramos que este operón está regulado a nivel transcripcional por la proteasa Lon y por el regulador de respuesta MviA. Experimentos adicionales demostraron que MviA controla la transcripción de *igaA* por medio de RpoS y que ejerce además un control postranscripcional sobre *rscB*, por una vía independiente de IgaA, RpoS y RcsC.

## Valoración cuantitativa de riesgos microbiológicos: aplicación a listeriosis y alimentos listos para consumo

Victoria Garrido

Directoras: Isabel García Jalón-De la Lama y Ana Isabel Vitas Pemán.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Navarra.

Garantizar la seguridad alimentaria continua siendo un reto para los gestores y responsables de las Administraciones Públicas, debido, entre otros aspectos, a la globalización y a la rápida distribución a nivel internacional de los alimentos. *Listeria monocytogenes* es uno de los patógenos de transmisión alimentaria que ha despertado mayor interés en los últimos años por la grave sintomatología que la enfermedad produce en los grupos de población de riesgo (ancianos, personas con inmunodepresión y mujeres embarazadas). Además, aunque en la transmisión del microorganismo pueden estar implicados diferentes grupos de alimentos, son los denominados listos para consumir o ready-to-eat (RTE) los que potencialmente representan un mayor riesgo para contraer la enfermedad, debido a la gran aceptación que tienen en la sociedad actual, su almacenamiento en refrigeración que permite el desarrollo del patógeno psicrófilo y a que no requieren cocinado antes de su consumo.

Una de las herramientas utilizada por los gestores para conocer y controlar posibles efectos nocivos sobre la salud de los consumidores es la Valoración de Riesgos (Risk Assessment). Debido al incipiente desarrollo de la metodología de Valoración de Riesgos Microbiológicos en España, el objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo de un modelo de riesgo de listeriosis aplicado a nivel regional (Comunidad Foral de Navarra) con el fin de desarrollar una herramienta que pueda servir de referencia para utilizarse en ámbitos más amplios. Para ello, fue necesaria la obtención de datos de las diferentes etapas de la valoración del riesgo: identificación y caracterización del peligro, valoración de la exposición y caracterización del riesgo.

El modelo desarrollado describe la probabilidad de contraer listeriosis por consumo de pescados ahumados y cárnicos cocidos loncheados, productos en los que la concentración del patógeno puede aumentar según el tiempo transcurrido entre la adquisición y el consumo. Los datos primarios fueron obtenidos en diferentes estudios y seguimientos realizados en Navarra entre 2003 y 2007. La incidencia media de listeriosis en esta Comunidad fue de 0,9/100.000 habitantes, siendo las personas ancianas

(46,4%) mayores de 60 años y las mujeres embarazadas (39,3%), los grupos más afectados. El alimento en el que con mayor frecuencia se aisló el patógeno fue el pescado ahumado (25% de las muestras positivas), seguido de los cárnicos cocidos loncheados adquiridos a granel (8,5%). Además, el 76,7% de las personas entrevistadas admitió consumir este último grupo de productos, incluidos ancianos y embarazadas. En cuanto a las condiciones de almacenamiento post-venta, el 69,7% de los refrigeradores domésticos presentaron temperaturas superiores a 6°C, permitiendo el rápido crecimiento del patógeno. Los modelos de predicción desarrollados para cada uno de los alimentos investigados, estimaron un mayor número de casos de listeriosis por año por consumo de jamón cocido, especialmente en su presentación a granel. El estudio de diferentes escenarios ha demostrado que el descenso de la temperatura de refrigeración durante toda la vida útil del producto (incluido el almacenamiento en el hogar), es el factor clave para reducir el riesgo de listeriosis. Debido a la amplia aceptación de los cárnicos cocidos loncheados adquiridos a granel se considera importante informar a los consumidores acerca del potencial riesgo de contraer listeriosis y de las medidas preventivas que deberían seguir para prevenirlo, poniendo especial énfasis en los grupos de personas ancianas y embarazadas. Teniendo en cuenta el aumento de la incidencia de la enfermedad observado en este último grupo, se propone incidir en el diagnóstico temprano de la enfermedad, siendo recomendable la investigación de los episodios febriles y gastrointestinales de las mujeres gestantes en cualquier etapa del embarazo.

## A study on the role of phosphatidylcholine and inner lipopolysaccharide sections in *Brucella* virulence

Raquel Conde Álvarez

Directores: Maite Iriarte Cilveti e Ignacio Moriyón Uría.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Navarra.

*Brucella* are gram-negative bacteria that cause brucellosis. The role of phosphatidylcholine (PC) (eukaryotic phospholipid absent from most prokaryotes but present in *Brucella*), lipopolysaccharide core and phosphatase genes possibly involved in envelope remodeling in *B. abortus* virulence was investigated. Evidence was found that *pcs* and *pmtA* (encoding enzymes of the possible PC biosynthetic routes) are functional under different conditions. PC was necessary for full virulence, and *Pcs* and *PmtA* possibly have complementary roles *in vivo*. A mutant in homologue of *lpcC* (*Rhizobium leguminosarum* core glycosyltransferase) lacked part of the lipopolysaccharide core but kept the O-chain, was sensitive to normal serum and bactericidal peptides and attenuated in dendritic cells, inducing their maturation and high TNF $\alpha$  and IL-12 levels. The mutated LPS reproduced these effects and had a higher binding to MD-2. In mice, the mutant was attenuated and elicited

intense protective immunoresponses, showing that core mutants are promising brucellosis vaccines. *B. abortus* genes *lpxE1* and *lpxE2* (homologous to *lpxE* and *lpxF* of bacteria that partially dephosphorylate lipid A) were under control of BvrR/BvrS, a regulator of *Brucella* virulence that modulates sensitivity to bactericidal peptides. However, *lpxE1* and *lpxE2* mutants were not attenuated and, although mutant *lpxE-1* was peptide sensitive, its lipopolysaccharide was similar to wild type in lipid A phosphorylation and MD-2 interaction. It is proposed that *lpxE1* acts by dephosphorylating an undetermined envelope lipid, thereby contributing to peptide resistance in *B. abortus*. The results of this thesis complement previous results showing the critical importance of envelope molecules in *Brucella* virulence.

## Identificación y caracterización de genes de osmoadaptación en *Rhizobium* y de su papel en simbiosis con leguminosas

Ana Domínguez Ferreras

Directores: Juan Sanjuán Pinilla y María José Soto Misffut.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Granada.

Este trabajo de tesis doctoral tuvo como objetivo general el estudio de mecanismos de adaptación a estrés osmótico en rizobios. Para ello se llevó a cabo por una parte una aproximación global, mediante la determinación del transcriptoma de *Sinorhizobium meliloti* 1021 en respuesta a la aplicación de NaCl y sacarosa a varias concentraciones (Domínguez-Ferreras et al., 2006). Los resultados mostraron que estas condiciones provocaban la inducción de numerosos genes de función desconocida, mientras que se reprimían muchos genes que codifican proteínas de función conocida. Además, la mayoría de los genes de *S. meliloti* 1021 que se sobreexpresan en respuesta a un choque osmótico se encuentran localizados en los plásmidos simbióticos, especialmente en el pSymB, mientras que los genes reprimidos fueron mayoritariamente cromosómicos.

Por otra parte, se realizó una aproximación genética al estudio de mecanismos conocidos de adaptación a estrés hiperosmótico en dos rizobios modelo (*S. meliloti* 1021 y *Mesorhizobium loti* MAFF303099): captación de potasio y síntesis de trehalosa. Se determinó la presencia de 4 posibles sistemas de transporte de potasio en *S. meliloti* 1021 (Kup1, Kup2, Kdp y Trk) y de 3 en *M. loti* MAFF303099 (Kup1, Kup2 y Kdp). En *S. meliloti* 1021, Trk resultó ser el principal sistema implicado en adaptación a estrés osmótico. Además, la presencia de Trk o Kup1 es necesaria para el crecimiento de la bacteria en condiciones de laboratorio y es también importante durante el establecimiento de simbiosis con alfalfa (Domínguez-Ferreras et al., 2009). Por otra parte, en *M. loti*, carente de un sistema Trk, los sistemas Kup son necesarios para el crecimiento de la bacteria y para su adaptación a estrés osmótico en condiciones

de laboratorio. En ambas especies de rizobios el sistema Kdp adquirió relevancia durante la adaptación a estrés osmótico a bajas concentraciones de potasio.

Por último, se estableció la presencia de tres posibles sistemas de síntesis de trehalosa codificados en el genoma de *S. meliloti* 1021 (OtsA, TreYZ y TreS), y de uno (OtsAB) en *M. loti* MAFF303099. El sistema OtsAB de *M. loti* se encuentra implicado en la acumulación de este compuesto durante la adaptación de la bacteria a elevadas concentraciones de solutos. En *S. meliloti*, la acumulación de trehalosa necesaria para una correcta osmoadaptación depende principalmente de OtsA, aunque los otros sistemas, especialmente TreS, también están implicados en este proceso. Además, la expresión de los genes que codificaban los tres sistemas se induce en respuesta a un choque osmótico. Nuestros resultados indicaron que la presencia de al menos un sistema de síntesis de trehalosa es importante en *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099 para el establecimiento de simbiosis con leguminosas. Así, la ausencia de OtsAB provocó una disminución de la infectividad de *M. loti* MAFF303099 y de su eficiencia simbiótica, mientras que en *S. meliloti* 1021 la carencia de los tres sistemas descritos fue causa de una menor competitividad para la nodulación.

Domínguez-Ferreras et al. 2006. *J. Bacteriol.* **188**: 7617-7625.

Domínguez-Ferreras et al. 2009. *J. Bacteriol.* **191** (en prensa; doi:10.1128/JB.01567-08).

## Selección y caracterización de bacterias con actividad de biocontrol de *Rosellinia necatrix* Prill. en aguacate

María Ángeles González Sánchez

Directores: Rosa M. Pérez Jiménez, Francisco M. Cazorla López y Antonio de Vicente Moreno.

Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) y Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, y presentada en esta última institución.

*Rosellinia necatrix* Prill. es el agente causal de la podredumbre blanca radicular, enfermedad limitante del cultivo del aguacate en Andalucía. El control biológico de esta enfermedad mediante la incorporación de microorganismos de suelo como agentes de control biológico se presenta como un sistema alternativo o complementario a los actuales métodos de lucha. El objetivo principal de este trabajo fue la selección de cepas bacterianas con potencial capacidad de biocontrol frente a esta enfermedad mediante una estrategia basada en el análisis directo de la protección de la planta de aguacate, evitando de esta forma una preselección basada en mecanismos de biocontrol concretos, como el antagonismo o colonización de raíz, que recientemente habían sido utilizados en otros trabajos previos. Para abordar este estudio se generó una colección de bacte-

rias a partir de muestras de raíz y suelo de árboles situados en diversas fincas de aguacate andaluzas. Un total de 143 aislados representativos de la colección fueron evaluados en una primera fase de ensayos de biocontrol que utilizaron plántulas de aguacate procedentes de embriones germinados *in vitro* y un bajo número de réplicas, resultando en la selección de 22 aislados candidatos con potencial biocontrol. Al total de candidatos se les analizó el espectro de antagonismo frente a diversos patógenos de suelo y diversas propiedades relacionadas con el biocontrol tales como: producción de sustancias antimicrobianas, colonización y persistencia en raíz, tipos de movilidad, persistencia en suelo y actividad promotora del crecimiento vegetal. Adicionalmente, los aislados candidatos fueron de nuevo evaluados en una segunda fase de experimentos de biocontrol que utilizaron plántulas de aguacate clonales micropropagadas y un mayor número de réplicas. De estos ensayos se seleccionaron por su efecto protector de la enfermedad las cepas *P. fluorescens* CB32, *P. chlororaphis* CB254, *P. fluorescens* CB306 y *B. subtilis* CB115. Todas las cepas seleccionadas inhibían *in vitro* a diversos patógenos de suelo incluyendo en el caso de las cepas CB32, CB115 y CB254 a *R. necatrix*. De esta observación se pudo concluir que una estrategia de selección basada en el antagonismo *in vitro* frente al patógeno, hubiera rendido un número muy similar de bacterias con la capacidad para controlar a *R. necatrix* con la estrategia de selección directa *in planta* utilizada en este trabajo. El análisis de los tipos y número de mecanismos de biocontrol exhibidos por las cepas que protegían y que no protegían permitió deducir que probablemente no existe un mecanismo universal ni determinante en la capacidad de biocontrol y que ésta capacidad es polifásica, siendo por tanto alcanzada por la combinación de varios mecanismos. En experimentos con plantas adultas de aguacate comerciales bajo condiciones de invernadero se observó que la cepa *B. subtilis* CB115 y *P. fluorescens* CB32 redujeron el desarrollo de la podredumbre blanca radicular, aunque la consistencia en la eficacia del biocontrol fue mayor en el caso de la cepa CB115.

## Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis.

Roxana Beaz Hidalgo

Directores: Jesús L. Romalde y Susana Prado.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.

Algunas especies del género *Vibrio* son importantes patógenos bacterianos que afectan al cultivo de moluscos bivalvos. Las patologías causadas por vibrios en moluscos se conocen desde los años 60, sin embargo son escasos los estudios sistemáticos y en profundidad en especies de bivalvos distintos de la

ostra plana (*Ostrea edulis*) o americana (*Crassostrea virginica*). Debido a los sucesivos episodios de altas mortalidades en poblaciones de almeja cultivada registrados en los últimos años en Galicia se hace necesario el estudio de la microbiota asociada con el fin de detectar posibles nuevos patógenos limitantes para el cultivo de este molusco bivalvo.

Los muestreos realizados a lo largo de 18 meses en 4 zonas geográficas distintas de Galicia demostraron una variación estacional en la carga bacteriana de las poblaciones de almeja cultivada (*Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus*). Como era de esperar se observó un claro incremento en los niveles de bacterias totales y de vibrios en los meses más cálidos. Se aislaron un total de 768 vibrios. La caracterización bioquímica y fisiológica permitió una identificación preliminar de los aislados, agrupados en diversos fenones según sus perfiles. Los datos fenotípicos revelaron una gran diversidad de especies dentro del género, aunque hubo una clara dominancia de aislados del grupo *V. splendidus* constituyendo el 54% del total de las cepas. Otras especies abundantes fueron *V. lentus*, *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus* y *V. aestuarianus*.

Se seleccionaron 145 aislados representativos de los grupos fenotípicos para obtener una identificación más exacta mediante caracterización molecular. La técnica de polimorfismos de amplificación del DNA (AFLP) reveló la presencia de diversidad específica y permitió esclarecer la identificación de muchos aislados que estaban enmascarados en el grupo de *V. splendidus* por la identificación fenotípica. Se observó que los datos de la identificación fenotípica y genética tan sólo coincidieron en un 29,82% posiblemente debido a la gran variabilidad intraespecífica en muchas pruebas y a la falta de pruebas claras para diferenciar entre especies. Hoy se considera necesario recurrir a un sistema de clasificación e identificación bacteriana basado en datos genéticos.

El 60,7% de los vibrios analizados por AFLP no lograron ser identificados a nivel de especie lo que apuntaba a la posible existencia de nuevas especies en el género. Se seleccionaron los 8 clusters no identificados de AFLP con mayor número de aislados, y se procedió a un estudio filogenético basado en la amplificación del gen

16S rRNA y cuatro genes *housekeeping*: *recA*, *rpoA*, *pyrH* y *atpA*. Los datos de la técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA) revelaron la existencia de 8 posibles nuevas especies dentro de la Familia *Vibrionaceae*, 6 en la rama filogenética de *V. splendidus*, 1 en la rama de *V. haliotocoli* y 1 en la rama de *Aliivibrio fischeri*.

Una completa descripción bioquímica, los análisis filogenéticos de los 5 genes y los datos aportados por hibridación DNA-DNA permitieron la definición de tres nuevas especies: *Vibrio breoganii* sp. nov., *Vibrio gallaecicus* sp. nov. y *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

Los análisis filogenéticos situaron a la especie *V. breoganii* en el grupo de *V. haliotocoli*, siendo las especies más cercanas *V. comitans*, *V. rarus* y *V. inusitatus*. Las células son pequeños bacilos inmóviles que carecen de flagelo. Está compuesta por 7 aislados fenotípicamente homogéneos con diferencias principalmente en la fermentación de azúcares. Los genes *atpA* y *pyrH* demostraron ser los mejores candidatos para diferenciar *V. breoganii* de las especies más cercanas. Se observó una variabilidad intraespecífica en los perfiles de ERIC-PCR, sin embargo los perfiles de REP-PCR presentaron altos porcentajes de similitud. La cepa tipo de *V. breoganii* es RD 15.11<sup>T</sup> (= CECT 7222<sup>T</sup> = LMG 23858<sup>T</sup>) aislada de almeja fina (*R. decussatus*).

Los datos del MLSA situaron a la nueva especie *V. gallaecicus* dentro del grupo polifilético *V. splendidus*. La especie está compuesta por tres aislados fenotípicamente homogéneos. Todos los genes secuenciados menos el *atpA* situaron a los aislados de *V. gallaecicus* en una rama independiente del resto de las especies del grupo. Las secuencias concatenadas de los genes situaron a *V. gallaecicus* cerca de *V. chagasii*, la especie más distante del grupo. Los porcentajes de similitud en el gen 16S rRNA con las especies cercanas fueron inferiores al 97,3%. El gen *recA* es el más discriminativo para diferenciar la nueva especie de sus congéneres filogenéticos. Los tres aislados presentaron variabilidad intraespecífica en los perfiles obtenidos mediante ERIC y REP-PCR. La cepa tipo de *V. gallaecicus* es VB 8.9<sup>T</sup> (=CECT 7244<sup>T</sup> = LMG 24045<sup>T</sup>) aislada de almeja japonesa.

El grupo de *Aliivibrio finisterrae* está compuesto por 4 cepas de las cuales una se diferen-

cia claramente desde el punto de vista fenotípico, como en la prueba de hidrólisis de la urea que es negativa para esta cepa. El congénere filogenético más cercano es *A. wodanis* con un 98,1% de similitud en el gen 16S rRNA, aunque los genes *recA* y *atpA* sitúan la especie más de cerca de *A. fischeri* y *A. salmonicida* respectivamente. En este caso el gen más discriminativo es el *recA*. La cepa tipo de *A. finisterrae* es CMJ 11.1<sup>T</sup> (= CECT 7228<sup>T</sup> = LMG 23869<sup>T</sup>) aislada de almeja japonesa (*R. philippinarum*).

En todos los casos, la técnica de MLSA y secuencias concatenadas de varios genes ofreció una mayor fiabilidad y solidez que la utilización de un solo gen para la determinación de la posición filogenética de las especies descritas.

El estudio de los productos extracelulares (ECP) de 57 cepas previamente caracterizadas por AFLP demostró, en general, una baja actividad enzimática y alta variabilidad en los perfiles que no se pudieron relacionar con los clusters de AFLP. La mayor citotoxicidad en líneas celulares correspondió a cepas con ECPs con mayor actividad enzimática y concretamente proteolítica. Las cepas identificadas que mostraron mayor citotoxicidad fueron *V. crassostreae*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus* y *V. diabolicus*. En la cepa RD 8.15 (*V. splendidus*-like) de uno de los grupos mayoritarios de AFLP no identificados se detectaron actividades enzimáticas en los ECP así como una destrucción total en la línea celular SAF-1 y además mostró virulencia en los ensayos de infección vía intravalvar en almeja adulta. En el análisis realizado de los ECP se observó actividad citotóxica en casi todas las cepas, sin embargo las cepas tipo de las tres nuevas especies y las 4 cepas de *Vibrio* sp. pertenecientes a los grupos de AFLP no identificados no resultaron virulentas en los ensayos realizados in vivo en larvas de almeja japonesa, ni en inoculaciones por baño en almeja adulta.

El presente trabajo ha confirmado la importancia de los métodos moleculares en la identificación de especies de *Vibrio*. Los datos obtenidos por AFLP señalan la existencia de numerosas especies dentro de este género aún no descritas. Futuros estudios sobre las cepas descritas en esta memoria llevarán probablemente a la descripción de nuevas especies bacterianas dentro del género.

## Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

*Actualidad SEM* publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas o dirigidas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM o al Director por correo electrónico, siguiendo el formato: *Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación* (si es distinto) y *Resumen* (máximo, unas 500 palabras). El resumen que se envía a la base de datos *Teseo* es apropiado también.

*Actualidad SEM* 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.

# Socios que deben actualizar datos

Abad Lozano, José Luis  
Bertolín Serra, Fco. Javier  
Bordes Benitez, Ana  
Fernández Orts, Eva María

Lafarga Capuz, Bernardo  
López Ponce, Francisco José  
Medieros Almendros, Jesús  
Miranda Casas, Consuelo

Rubio Vallejo, Manuel Fco  
Sagardia Redondo, M<sup>a</sup> Begoña  
Sesma Bea, Begoña  
Vázquez Domínguez, Evaristo

Los datos correspondientes a cambios de dirección o de la domiciliación bancaria deben enviarse a la Secretaría de la SEM por correo electrónico, normal o fax (ver [www.semico.es](http://www.semico.es)).