

Tesis

Identification and phylogeny of clinical and environmental isolates of *Alternaria*, *Cladosporium* and other genera of dematiaceous hyphomycetes

➤ Autora:

Isabel Iturrieta González

isabeliturrieta@gmail.com

➤ Directores:

Dra. Josepa Gené, Dr. Josep Guarro y Dra. Dania García.

➤ Centro de realización:

Unidad de Microbiología, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universitat Rovira i Virgili

➤ Resumen:

La tesis doctoral se enfocó en el estudio de diversidad y taxonomía de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*, y de otros hifomicetos dematiáceos pertenecientes a géneros morfológicamente similares. Se estudió un total de 589 aislados; 56 de origen clínico y 533 de muestras ambientales (204 de heces de herbívoros, 200 de suelo, 129 de material vegetal) colectadas en España, México y Vietnam. Los géneros estudiados son considerados taxonómicamente complejos, debido a la dificultad en la clasificación de sus especies cuando únicamente rasgos morfológicos son usados. El real espectro de especies asociado a un determinado sustrato solo es conocido si estudios moleculares basados en análisis de secuencia de marcadores filogenéticos apropiados son usados. La caracterización fenotípica de los aislados y análisis de secuencia de ITS y LSU del ADN ribosómico, así como de regiones parciales de genes codificantes de proteínas como *act*, *ATPase*, *gapdh*, *tef1*, *rpb2* y β -*tubulin*, dependiendo del género estudiado, nos permitió

identificar: 39 especies de *Alternaria* spp., incluyendo 13 nuevas especies descritas y 11 no descritas, aún en proceso de caracterización; 45 especies de *Cladosporium* spp., incluyendo 7 nuevas especies y una no descrita, aún en estudio; 10 especies de *Curvularia* spp. siendo tres propuestas como nuevas; un nuevo género, *Neodendryphiella*, con tres nuevas especies; dos nuevas especies de *Pseudopenidiella* y cinco clasificadas en *Apenidiella*, *Cyphellophora*, *Heliocephala*, *Matsushimaea* y *Venturia*. Es de notar que, entre las nuevas especies de *Alternaria* propuestas, tres fueron probadas como agentes de alternariosis cutánea humana (*A. anthropophila*, *A. atrobrunnea* y *A. guarroi*). Observamos entre los aislados de origen ambiental una alta diversidad en *Alternaria* y *Cladosporium*, sin embargo, heces de herbívoros fue el sustrato que permitió recuperar un mayor número de nuevos o raros taxones, constituyendo un excelente reservorio de hifomicetos interesantes.

Efecto de agentes para el biocontrol de mohos ocratoxigénicos en embutidos curado-madurados

➤ Autora:

María Micaela Álvarez Rubio

maalvarezr@unex.es

➤ Directores:

Félix Núñez Breña
María Jesús Andrade Gracia

➤ Centro de realización:

Instituto de la Carne y Productos Cárnicos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (Cáceres). Programa de Doctorado de Ciencia de los Alimentos.

➤ Fecha de defensa:

14 de diciembre de 2021.

➤ Resumen:

El objetivo de la Tesis Doctoral fue diseñar un método para el biocontrol de *Penicillium nordicum* y *Aspergillus westerdijkiae* productores de ocratoxina A (OTA) en embutidos curado-madurados empleando microorganismos aislados de derivados cárnicos (*Enterococcus faecium*, *Debaryomyces hansenii* y *Penicillium chrysogenum*) y productos de origen vegetal (orégano, tomillo, romero, incluyendo su aceite esencial (REO) y extracto de bellota). Se evaluó el efecto de estos agentes sobre el crecimiento de los mohos y la producción de OTA, sus modos de acción y las posibles interferencias sobre la microbiota y los parámetros de calidad del embutido. Los agentes de biocontrol redujeron la producción de OTA en embutidos sin afectar al desarrollo de la microbiota beneficiosa

ni las características sensoriales. El efecto de *P. chrysogenum* se puede atribuir a la competición por nutrientes y espacio. *D. hansenii* disminuyó la abundancia de proteínas relacionadas con la biosíntesis de OTA y la integridad de la pared celular (CWI). La pared celular también es la diana del orégano. El romero disminuyó la síntesis de ergosterol y alteró la abundancia de proteínas ligadas a la CWI y a la síntesis de ergosterol y de OTA. Los resultados permiten concluir que la utilización conjunta de romero y *D. hansenii* es una estrategia prometedora para controlar el peligro de la presencia de OTA en embutidos sin afectar negativamente a la calidad del producto.

Vigilancia, prevención, diagnóstico y tratamiento de las resistencias a antibióticos β -lactámicos desde la perspectiva *One Health*

> Autora:

Lara Pérez Etayo

lpereze@unav.es

> Directores:

Ana Isabel Vitas Pemán
David González Fernández

> Centro de realización:

Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra

> Resumen:

Esta tesis doctoral ha pretendido abordar la problemática de las resistencias antimicrobianas con una perspectiva global (estudios en entornos animal, medioambiental y humano), en consonancia con las líneas estratégicas del Plan Nacional de Resistencias a los Antibióticos (PRAN).

La vigilancia **ambiental** (entornos acuáticos del norte de España y sur de Francia) confirmó la amplia presencia de bacterias resistentes (principalmente a penicilinas y cefalosporinas) en ríos y muy especialmente en depuradoras y colectores de hospitales y mataderos. La caracterización de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en éstos y otros entornos, mostró la existencia de complejos clonales relacionados con la diseminación de genes de resistencia *bla*, la alta presencia del integrón *int1* y de la secuencia de inserción IS26, así como la alta frecuencia

conjugativa de cepas aisladas de ambientes acuáticos. En el entorno **animal**, se puso el foco en la evaluación de un posible aditivo para piensos (caolín-plata) que permita reducir el uso de antibióticos en producción animal. La actividad mostrada frente a un amplio espectro de bacterias (incluidas bacterias multirresistentes), es un estímulo para continuar trabajando en esta posible medida preventiva. En relación a la **salud humana**, se ha optimizado un protocolo para el diagnóstico rápido de enterobacterias productoras de BLEEs del tipo *bla*CTX-M1, utilizando el equipo VITE-K®-MS RUO. En este ámbito, también se han investigado alternativas al tratamiento antibiótico de infecciones causadas por estas bacterias resistentes, confirmándose la actividad de tres bacterias ácido lácticas aisladas de animales salvajes.

Transcriptomic analysis of host-pathogen relationship in *Vibrio vulnificus*

> Autora:

Carla Hernández Cabañero

Carla.Hernandez@uv.es

> Directora:

Dra. Carmen Amaro González

> Centro de realización:

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Valencia

> Resumen:

Vibrio vulnificus es un **patógeno multi-hospedador y zoonótico**, actualmente en expansión debido al calentamiento global. Infecta humanos y peces, especialmente anguilas en piscifactorías, causando vibriosis, enfermedad cuya forma más grave es una hemorragia septicémica letal que en anguilas afecta animales sanos cultivados a más de 25°C, mientras que en humanos afecta principalmente pacientes con niveles elevados de hierro en sangre. En esta tesis se han utilizado herramientas transcriptómicas para i) **dilucidar qué mecanismos de virulencia permiten al patógeno causar septicemia en ambos hospedadores**, ii) **determinar la respuesta inmunitaria en sangre de anguila durante la infección**. Los resultados **más relevantes** demuestran que *V. vulnificus* expresa un fenotipo virulento adaptado al hospedador (envuelta celular y proteínas de membrana), dependiente de hierro y temperatura. Además, la toxina

RtxA1 de *V. vulnificus* está implicada en la generación de una tormenta de citoquinas y retrotransposones en sangre de anguila (por eritrocitos y leucocitos) relacionada con la muerte del hospedador.

Esta tesis aporta gran cantidad de datos transcriptómicos para el estudio de nuevos factores de virulencia del patógeno o el desarrollo de herramientas para prevenir brotes en piscifactorías, el mayor reservorio del patógeno y un riesgo para la acuicultura y la salud pública.

> Tesis completa:

<https://roderic.uv.es/handle/10550/72859>

New strategies for the design and development of protein antimicrobials based on phage products

➤ Autor:

Roberto Vázquez Fernández

rvazqf@gmail.com

➤ Director:

Pedro García González

➤ Centro de realización:

Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB-CSIC)

Presentada en la Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

➤ Resumen:

Las (endo)lisinas fágicas son enzimas codificadas por los fagos que hidrolizan el peptidoglicano, lo que provoca la lisis y muerte bacteriana. Estas endolisinas purificadas se pueden utilizar exógenamente contra bacterias, funcionando como antimicrobianos líticos y, por ello, también se denominan “enzibióticos”. En esta tesis se ha llevado a cabo una estrategia completa de diseño y desarrollo de antimicrobianos basados en lisinas fágicas, especialmente dirigidos contra patógenos Gram-negativos. En este análisis se observó la presencia generalizada de subdominios similares a péptidos antimicrobianos dentro de una subpoblación relevante de lisinas de fagos de Gram-negativas. Así, un enzibiótico candidato, denominado Pae87, se seleccionó para investigar su actividad intrínseca contra patógenos Gram-negativos, particularmente *Pseudomonas aeruginosa*, y para servir como base para el desarrollo de moléculas antimicrobianas eficientes. También se obtuvo un modelo tridimensional de esta proteína conteniendo un fragmento de peptidoglicano unido, identi-

ficándose un posible subdominio de unión a sustrato dentro del propio dominio catalítico de la proteína. El péptido mostró una potente sinergia *in vitro* cuando se usó en combinación con varios antibióticos. Finalmente, basándonos en que neumococo contiene residuos de colina que sirven de anclaje para proteínas superficiales fisiológicamente relevantes, se diseñó un polímero a base de quitosano. Dicho polímero se derivatizó con dietilaminoetanol (DEAE) que puede actuar como un análogo estructural y funcional de la colina. Así, las nanopartículas de quitosano-DEAE fueron capaces de unir enzibióticos de unión a colina, como el antineumocóculo Cpl-711, y liberarlo de forma controlada, aunque con cierto efecto citotóxico en las células eucariotas.

Mejora de la supervivencia y aptitud tecnológica de cepas industriales de *Lactococcus lactis* mediante evolución adaptativa

➤ Autora:

María Jesús López González

mjesus.lopez@unir.net

➤ Directoras:

Beatriz Martínez Fernández

Ana Rodríguez González

➤ Centro de realización:

IPLA-CSIC; defensa: Universidad de Oviedo

➤ Resumen:

Lactococcus lactis es el componente principal de los cultivos iniciadores utilizados en quesería. En esta Tesis Doctoral hemos aplicado la evolución adaptativa bajo condiciones de estrés sobre la pared celular (EA-CES) para mejorar su aptitud tecnológica. Para ello, se persiguieron los siguientes objetivos: (i) aislar mutantes de cepas industriales de *L. lactis* de distinto origen resistentes a la lactococina 972 (Lcn972), una bacteriocina que inhibe la síntesis de pared celular, (ii) realizar la caracterización fenotípica de los mutantes seleccionados y (iii) describir el fundamento molecular de las mutaciones adquiridas.

Se obtuvieron mutantes resistentes a Lcn972 con propiedades tecnológicas de interés como, por ejemplo, mayor resistencia al estrés oxidativo, sin comprometer parámetros tecnológicos esenciales para su uso como cultivo iniciador.

El análisis genómico reveló que las mutaciones más frecuentes se seleccionaban

en los genes que codifican un módulo de detección y resistencia a péptidos antimicrobianos constituido por el transportador ABC YsaDCB y el sistema de dos componentes TCS-G, no caracterizado previamente en *L. lactis*. Demostramos que el transportador YsaDCB estaba implicado en la resistencia a Lcn972 y a la bacitracina, y que las mutaciones seleccionadas eran responsables de la expresión constitutiva de este mecanismo de defensa.

La selección de diferentes fenotipos confirma la plasticidad de *L. lactis* en su adaptación al estrés sobre la pared celular y avala el uso de la EA-CES para generar diversidad funcional en *L. lactis* sin hacer uso de la tecnología del ADN recombinante.