

## Lípidos polares de arqueas halófilas: elaboración y estudio de arqueosomas como sistema de vehiculización de antioxidantes naturales obtenidos de alpeorujó

Ana González Paredes

Directores: Mercedes Monteoliva Sánchez, Alberto Ramos Cormenzana y Adolfinia Ruiz Martínez.

Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

Para la realización de esta tesis doctoral se han utilizado lípidos polares de la arquea halófila *Halobacterium salinarum* CECT 396 con el fin de elaborar liposomas (arqueosomas) para la encapsulación de un extracto fenólico con probada actividad antioxidante, el cual se obtuvo de alpeorujó, residuo resultante de la elaboración del aceite de oliva.

Uno de los rasgos bioquímicos más característico de las arqueas es la estructura de sus lípidos de membrana, estructura química que confiere a estos lípidos una mayor resistencia frente a la oxidación, hidrólisis química y ataque de esterases en comparación con los lípidos presentes en las membranas de los organismos que no pertenecen a este Dominio, lo que hace de los primeros una excelente materia prima para su utilización en la elaboración de unos particulares liposomas denominados arqueosomas. Los liposomas, como sistema para la vectorización o vehiculización de sustancias activas, son ampliamente utilizados en la actualidad para la aplicación tópica tanto de fármacos como de activos cosméticos.

Así, en esta tesis doctoral se ha estudiado el contenido fenólico y la actividad antioxidante de extractos preparados a partir de muestras de alpeorujó procedentes de tres variedades de aceituna (picudo, picual y hojiblanca), siendo la muestra procedente de la variedad picual la que presentó mayor contenido fenólico, así como mayor actividad antioxidante, por lo que se seleccionó éste como sustrato para la obtención de los compuestos fenólicos a encapsular.

Se elaboraron diferentes formulaciones de arqueosomas en función de la concentración de lípido y proporción molar de colesterol utilizada y, con fines comparativos, se elaboraron formulaciones de liposomas convencionales de fosfatidilcolina análogas a las primeras. La caracterización de las vesículas se realizó determinando el diámetro medio de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta, eficiencia de encapsulación y actividad antioxidante. La estabilidad de las formulaciones fue evaluada durante tres meses mediante la determinación de estos parámetros.

Las formulaciones con proporción molar lípido/colesterol 1:0,5 mostraron el menor diámetro medio de partícula y, en general, los arqueosomas presentaron diámetros e índices de polidispersión ligeramente superiores a los de liposomas convencionales. Además estos parámetros

se mantuvieron constantes, prácticamente en todas las formulaciones, durante el tiempo que duró el estudio de estabilidad.

El potencial zeta fue negativo en todas las formulaciones, siendo significativamente mayor en los arqueosomas.

La eficiencia de encapsulación de los arqueosomas fue mayor que la de los liposomas convencionales, y las formulaciones que fueron más estables en el tiempo con respecto a este parámetro fueron las que contenían una proporción molar lípido/colesterol 1:1. La actividad antioxidante de todas las formulaciones fue muy elevada, manteniéndose constante hasta la finalización del estudio de estabilidad.

Tras el estudio de caracterización y estabilidad de las formulaciones se llevaron a cabo estudios de toxicidad *in vitro*, tanto del extracto fenólico como de algunas de las formulaciones liposomiales elaboradas. El extracto fenólico mostró actividad antiproliferativa en la línea celular ensayada, actividad que se potenciaba enormemente al incorporar el extracto fenólico dentro de las vesículas, tanto en arqueosomas como en liposomas convencionales. Utilizando vesículas vacías se observó que la toxicidad de los arqueosomas era significativamente inferior a la de los liposomas convencionales.

Por último se evaluaron diferentes excipientes (carbopol 940, pluronic 720 y excipiente cetílico) para proporcionar a las vesículas elaboradas una forma farmacéutica para la aplicación tópica, y se investigó la liberación *in vitro* de la sustancia activa desde dichas formas farmacéuticas. Los arqueosomas, tanto en gel de carbopol como de pluronic, cedieron la sustancia activa de forma gradual durante 8 h. En el caso de los liposomas convencionales sólo el gel de carbopol fue efectivo para la incorporación de los mismos.

Por todas estas características los arqueosomas se presentan como un ventajoso sistema para la vehiculización de fármacos y sustancias activas.

## Taxonomía y epidemiología del género *Aeromonas*

Anabel Alperi Vega

Directores: M<sup>a</sup> José Figueras Salvat y Antonio Martínez-Murcia.

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat Rovira i Virgili.

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral se ha establecido la presencia de variabilidad interoperónica en el gen ARNr 16S de *Aeromonas* y observado que, aunque menos del 1% de las posiciones (1503 pb secuenciados) eran polifórmicas, esta variabilidad afectaba a la taxonomía del género, limitando la identificación de *A. caviae*, *A. media* y *A. veronii*. La secuenciación del gen *rpoD* permitió identificar las cepas con variabilidad interoperónica a nivel de especie y además reconocer 5 nuevas especies dentro del género: *A. fluvialis*, *A. taiwanensis*, *A. sanarelii*, *A. piscicola* y *A. rivuli*. Estas 5 especies se caracterizaron mediante un estudio polifásico que com-

prendía un amplio análisis fenotípico, un análisis filogenético del gen ARNr 16S y de 5 genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* y *gyrA*) y el grado de similitud, con las especies más cercanas, mediante hibridación ADN-ADN. La puesta a punto de esta última técnica, sólo disponible en muy pocos laboratorios, constituyó unos de los objetivos de la presente tesis doctoral. Asimismo, se han descrito los primeros aislados de *A. aquariorum* de origen extraintestinal en colaboración con el Hospital Nacional Cheng Kung (Taiwán) y Hospital Comarcal Vega Baja (Orihuela). También se ha descrito, en colaboración con el Hospital Royo Vilanova de Zaragoza, el segundo caso en adultos de síndrome urémico hemolítico (SUH) asociado a *Aeromonas*. Se ha podido demostrar la presencia en este género del gen *stx2* que codifica para la toxina Shiga tipo 2 asociada al SUH, se han obtenido por primera vez secuencias parciales de los genes *stx1* y *stx2* de *Aeromonas* y demostrado una alta similitud entre dichas secuencias parciales de los genes *stx2* y *stx1* de *Aeromonas* con las variantes más patogénicas para humanos de *E. coli* productoras de toxinas Shiga. Se han revisado las características clínicas y microbiológicas de las infecciones de herida quirúrgica en las que ha estado implicada *Aeromonas*, en colaboración con el Hospital General de Guadalajara y el Hospital Royo Vilanova de Zaragoza. Finalmente, se ha descrito el primer caso de inducción *in vivo* de resistencia al imipenem en una cepa de *A. veronii* bv sobria en colaboración con el Hospital Clínic de Barcelona y el Hospital Royo Vilanova de Zaragoza. Finalmente, los resultados de esta tesis han dado lugar o contribuido a la publicación de 13 artículos científicos en revistas internacionales.

## Bacterial dispersal on airborne Saharan dust particles. Survival and colonization of alpine lakes in the Limnological Observatory of the Pyrenees

Anna Hervas Busquets

Director: Emilio Ortega Casamayor. Centro de Estudios Avanzados de Blanes-CSIC, Centro presentación: Universitat Autònoma de Barcelona.

La formación de plumas de polvo atmosférico de origen desértico y su deposición en zonas remotas es un hecho conocido en los últimos años acrecentado por fenómenos ligados al cambio global. Estas plumas atmosféricas transportan nutrientes, tóxicos y microorganismos a miles de kilómetros de distancia. Sus efectos globales se han empezado a explorar en los últimos años. Los nutrientes aerotransportados tienen efectos fertilizantes remotos sobre comunidades de plantas y microorganismos acuáticos como han constatado estudios recientes. La comunidad de bacterias aerotransportadas, en cambio, resulta más desconocida y aunque ha sido explorada median-

te técnicas tradicionales de cultivo y de análisis genético, todavía se sabe muy poco acerca de su composición y de su viabilidad y capacidad de colonización. En esta tesis doctoral hemos abordado aspectos relacionados con la viabilidad y capacidad colonizadora de las bacterias aerotransportadas, utilizando como sistemas modelo lagos de alta montaña situados en el Observatorio Limnológico de los Pirineos. Este tipo de lagos son excelentes sensores de cambios ambientales por su condición de oligotrofia extrema y su localización aislada. Además, se encuentran presentes en todas las latitudes del planeta permitiendo la extrapolación de estos estudios locales a una escala global. Hemos explorado la interfase aire-agua de estos sistemas confirmando que el neuston (comunidad biológica encontrada en la interfase) actúa como un buen sensor de las entradas de bacterias alóctonas presentes en aerosoles de origen sahariano. Mediante experimentos de enriquecimiento en microcosmos utilizando polvo de diferentes fuentes (de arenas en Mauritania y aerosoles recogidos en colectores atmosféricos situados en Pirineos), hemos identificado cinco tipos diferentes de bacterias según su biogeografía, desde bacterias cosmopolitas aerotransportadas capaces de colonizar ambientes acuáticos remotos (*Airborne-betaproteobacteria*), hasta *clusters* no aerotransportados endémicos de agua dulce dentro de los phyla *Betaproteobacteria* y *Bacteroidetes*. Además, se han detectado filotipos del género *Acinetobacter* de amplia distribución que de manera recurrente colonizan estos ambientes remotos pero sin llegar a establecerse como miembros dominantes de la comunidad. Hemos comprobado que las entradas de polvo sahariano afectan directamente a la dinámica temporal de las poblaciones lacustres de *Gamma*-y *Betaproteobacteria* pero no a la de *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. Finalmente, en un estudio cubriendo parte de la variabilidad altitudinal dentro del Observatorio, hemos constatado la capacidad colonizadora de ciertas bacterias aerotransportadas de origen africano en lagos de Pirineos.

## Corrección del modelo de Bigelow. Aplicación en el cálculo de los efectos de cocción y de esterilización sobre *Bacillus coagulans* en una conserva de judías verdes (*Phaseolus vulgaris* var. *Helda*)

Agustín León Alonso-Cortés

Director: Juan Ignacio Reguera

Usuarios.

Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (Palencia).

En este trabajo se calcularon los efectos de cocción y de esterilización sobre *Bacillus coagulans* en una conserva de judías verdes extrafinas de la variedad *Helda*, sobre la que se aplicaron una serie de tratamientos térmicos a las temperaturas de

105, 107, 110 y 115 °C, durante tiempos comprendidos entre 3 y 35 min. De éstos se seleccionaron los que consiguieron con mayor exactitud los efectos ideales previamente establecidos de  $n = 1,09$  para el efecto de cocción y  $n = 5$  para el efecto de esterilización sobre *Bacillus coagulans*.

Los tratamientos seleccionados fueron los aplicados a la temperatura de 115 °C a los tiempos de 10 y 20 min. El primero consiguió un efecto de cocción de  $n = 1,11$  y un efecto estimado de esterilización sobre *B. coagulans* comprendido entre 2,23 y 4,65; y el segundo un efecto estimado de esterilización sobre *B. coagulans* más ajustado ( $2,66 < n < 5,13$ ) y un efecto de cocción aceptable ( $n = 1,15$ )

Para evaluar los efectos de los tratamientos, primero se calcularon y analizaron la validez de las cinéticas térmicas necesarias y luego se cuantificaron por medio de un novedoso método estadístico basado en la corrección del modelo tradicional logarítmico de Bigelow.

Los valores de los parámetros termocinéticos y del test de exactitud de las cinéticas resultaron ser  $D_{100} = 7,52$  min,  $Z = 16$  °C y  $A_f = 1,13$  para la cinética de cocción y  $D_{121} = 0,0264$  min,  $Z = 10,64$  °C y  $A_f = 1,04$  para la cinética de termodestrucción de *B. coagulans*.

Con el método propuesto se consiguió disminuir el error de cuantificación del efecto de cocción desde el 1.200 % (obtenido con el modelo de Bigelow) al 3,11 % en el tratamiento de 115 °C durante 10 min y desde el 2.260 % al 9,46 % en el tratamiento de 115 °C - 20 min, resultando ser mayor el error cuanto mas alta fue la temperatura del tratamiento.

También se calcularon los efectos de los tratamientos sobre otros dos indicadores de calidad de las conservas de judías verdes: la inactivación térmica de la enzima peroxidasa y la cocción botulínica. No obstante, debido a que los test de exactitud de sus cinéticas resultaron ser superiores a 1,15 y por tanto, poco satisfactorios, el cálculo de los efectos estimados de los tratamientos sobre ambos indicadores se consideró de apoyo.

Teniendo en cuenta los efectos de los tratamientos sobre los mencionados indicadores de apoyo y el efecto estimado de esterilización sobre *B. coagulans*, el error cometido al cuantificar los tratamientos con el modelo de Bigelow resultó ser mayor cuanto menor fue el valor del tiempo de reducción decimal (D).

## Taxonomía y epidemiología del género *Arcobacter*

Luis R. Collado González

Directora: María José Figueras.

Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat Rovira i Virgili.

Algunas de las especies del género *Arcobacter*, creado en el año 1991, han sido relacionadas con patología gastrointestinal en humanos y aborto, diarrea y mastitis en animales, sin embar-

go podríamos decir que su papel en patología humana y veterinaria es poco conocido. Uno de los problemas más importantes para la investigación de *Arcobacter* es la dificultad que entraña la identificación de las cepas a nivel de especie. Las técnicas de identificación molecular y la taxonomía de *Arcobacter* han sido desarrolladas en base al análisis de los genes ribosomales, siendo escasos los estudios que investigan la utilidad de los genes que codifican funciones esenciales o "housekeeping". Por otra parte, las rutas de transmisión de *Arcobacter* aun no están muy claras. A pesar de que se ha sugerido que las aguas contaminadas pueden ser una de estas rutas de transmisión, aun no ha sido investigado si este microorganismo es autóctono del agua o si es un contaminante. Además, no ha sido investigado si el tratamiento para la producción de agua potable es efectivo para la eliminación de *Arcobacter*. Los alimentos cárnicos y derivados, son otras de las vías de transmisión sugeridas para *Arcobacter*. Sin embargo, hasta la fecha los estudios se han concentrados en determinar la prevalencia de esta bacteria en carnes de aves de corral, de cerdo y de vacuno, existiendo pocos estudios en otros tipos de carne, como también en mariscos. El objetivo general de esta tesis ha sido determinar la prevalencia de las especies de *Arcobacter* en muestras de aguas de distintos orígenes y en alimentos para ello hemos desarrollado una técnica de identificación basada en los patrones de restricción obtenidos tras la digestión del gen ribosomal (16S rDNA-RFLP). Esta técnica además de ser rápida y barata, es el único método que permite la caracterización de todas las especies descritas hasta el año 2008. Esta técnica la hemos utilizado para identificar 600 aislamientos de *Arcobacter*, algunos de los cuales han mostrado nuevos patrones de restricción, lo que nos ha permitido reconocer una nueva especie (*A. mytili*) y otras cuatro especies nuevas, las cuales están en proceso de ser descritas formalmente.

El uso del 16S rDNA-RFLP en paralelo con una PCR múltiple o m-PCR (la cual ha sido desde el año 2000 y hasta el momento, la técnica más utilizada para la identificación de *Arcobacter*), ha revelado que esta m-PCR puede producir identificaciones erróneas. Por lo cual hemos propuesto utilizar ambos métodos en paralelo para conseguir una correcta identificación. Los resultados incongruentes entre estos dos métodos nos ha llevado a identificar los primeros aislamientos desde su descripción en el 2009 de *Arcobacter theireus*, y nos permitieron reconocer otra nueva especie, *A. valdiviensis*, aislado de un hisopado cloacal de gallina en la ciudad de Valdivia, Chile.

Por otra parte, hemos demostrado que la presencia de *Arcobacter* en aguas costeras, lagos, ríos y residuales se correlaciona significativamente con la presencia altos niveles de contaminación fecal, y que estos microorganismos entran en el mar a través de los aportes de aguas dulces contaminadas fecalmente con heces de origen animal y/o humano, a pesar de especies como *A. halophilus* y *A. marinus*, no aisladas hasta la fecha en otros habitats, puedan tener un origen acuático. También hemos realizado el primer estudio para investigar la diversidad genética en aislamientos de *Arcobacter* obtenidos de muestras de agua, investigando su prevalencia en el río Llo-

bregat (una de las principales fuentes de producción de agua potable del área metropolitana de Barcelona), demostrando que las especies *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* presentan una alta prevalencia y diversidad genética. Sin embargo, estos microorganismos nunca fueron detectadas en el agua del río potabilizada, lo que indica que el tratamiento al que se somete el agua es efectivo para su eliminación.

También se ha demostrado que *Arcobacter* presenta una elevada prevalencia en diferentes tipos de carnes (pollo, vacuno, cerdo, conejo, pavo y pato), además de mariscos (mejillones y almejas). Considerando que los mariscos puedan ser considerados como otra potencial ruta de transmisión.

Finalmente hemos empleado por primera vez para el género *Arcobacter*, los genes *rpoB* y *gyrB* para establecer las relaciones filogenéticas de las nuevas especies con las actualmente aceptadas y hemos comprobado que estos genes son de gran utilidad.

## Mecanismo molecular del control por fosfato de la cascada de expresión de los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces coelicolor*

Fernando Santos Beneit

Directores: **Juan Francisco Martín Martín y Antonio Rodríguez García.**  
Instituto de Biotecnología de León,  
Universidad de León.

Indudablemente, el descubrimiento de los antibióticos representa uno de los hechos más importantes para la salud humana del siglo XX. Más de la mitad de los antibióticos conocidos hoy en día son producidos por bacterias pertenecientes al género *Streptomyces*. El auge de los antibióticos se ha correspondido con un claro incremento de la esperanza de vida y con un control casi total de las enfermedades bacteriológicas. Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos moleculares que regulan la producción de estos antibióticos.

En esta tesis se ha utilizado *Streptomyces coelicolor* como organismo modelo del género *Streptomyces*. Las bacterias pertenecientes a este género producen también otros compuestos de gran interés como antifúngicos, antivirales, antiparásitos, herbicidas, antitumorales, inmunosupresores, inmunoestimuladores, anti-colesterolémicos, factores de crecimiento para plantas, inductores de la diferenciación celular en eucariotas, pigmentos, aromas, inhibidores enzimáticos, etc.

Generalmente la producción de estos metabolitos se regula por las condiciones nutricionales del medio en el que crecen estos microorganismos. Uno de los nutrientes más importantes en la regulación de estos procesos es el fosfato. Así, la mayoría de los antibióticos son reprimidos por concentraciones altas de dicho nutriente. No obs-

tante, la transducción de señales que va desde la detección de la concentración de fosfato en el medio hasta la regulación de la producción de antibióticos en cuestión es un proceso totalmente desconocido.

Para estudiar la regulación por fosfato en *Streptomyces* el trabajo de la tesis se ha centrado en la caracterización de los mecanismos reguladores ejercidos por el único sistema regulador descrito para tal fin, el regulón *pho*. Este sistema fue caracterizado por primera vez en la bacteria *Escherichia coli* y más tarde en *Streptomyces lividans*. Los resultados de la tesis aportan distintos mecanismos de regulación ejercidos por dicho sistema tanto en genes del metabolismo primario (relacionados principalmente con el metabolismo del fosfato), como en genes relacionados con otros procesos metabólicos como el del nitrógeno o el carbono. El punto más importante de la tesis ha sido la demostración de la involucración directa del sistema *phoRP* en la regulación del metabolismo secundario, concretamente en la regulación de un gen que controla la producción de antibióticos en *Streptomyces*, el gen *afsS*.

En resumen, el trabajo de la tesis describe por primera vez la conexión en la señalización de la escasez de un nutriente con la producción de antibióticos, y dilucida las bases del control por fosfato en bacterias de gran interés para la industria farmacéutica.

## Compartimentalización de la biosíntesis de beta-lactamas y regulación de su secreción en *Acremonium chrysogenum*

Fernando Teijeira Romón

Directores: **Dr. D. Juan Francisco Martín Martín y Dr. D. Ricardo Vicente Ullán.**

Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) y Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León.

*Acremonium chrysogenum* es un hongo filamentoso imperfecto que ha sido utilizado a nivel industrial para la producción de cefalosporina C, a partir de la cuál se obtienen derivados semisintéticos con mayor bioactividad. La ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum* ha sido ampliamente estudiada, habiéndose clonado los genes y purificado las enzimas que participan. Sin embargo, se sabe poco acerca de la secreción de los diferentes intermediarios (uno de los cuales penicilina N es secretado en gran cantidad) y del producto final cefalosporina C. Aunque se pensaba que la ruta de biosíntesis de cefalosporina C transcurría en el citoplasma celular, evidencias recientes sugieren que, al menos, la etapa de epimerización de isopenicilina N en penicilina N se realiza en el interior de microcuerpos. Por este motivo, se buscan genes implicados en la secreción y en la regu-

lación de dicha secreción en el cluster temprano de biosíntesis de cefalosporina C. De esta forma, en este trabajo se han caracterizado los genes *cefM* y *cefR*. El gen *cefM* es esencial en la producción de cefalosporina C, puesto que su interrupción bloquea dicha producción. Los estudios tanto de inactivación dirigida como de localización *in vivo* mediante microscopía confocal de fluorescencia demostraron que la proteína CefM es una proteína de la membrana de microcuerpos que participa en la secreción de penicilina N desde el interior de microcuerpos hacia el citoplasma. Por otro lado, la sobreexpresión del gen *cefM* no constituye un paso limitante en la ruta biosintética de cefalosporina C.

En el cluster temprano de biosíntesis de cefalosporinas se encontró el gen *cefR*. Los estudios de inactivación dirigida del gen *cefR* junto con la sobreexpresión y el análisis de la expresión de los mutantes obtenidos demostraron que el gen *cefR* actúa como un represor de los genes de secreción *cefT* y *cefM*, ejerciendo efectos indirectos sobre los genes de biosíntesis *pcbC* y *cefEF* y sobre el gen de secreción *cefT3*. Además para complementar la mutación en el mutante interrumpido en el gen *cefR* son necesarios los genes *cefR* y *cefT3*, efecto que puede ser debido a la topología de esta región del genoma. El hecho de que tanto la inactivación dirigida del gen *cefM* como del gen *cefR* provoquen efectos fenotípicos en los mutantes relaciona a ambos genes con el metabolismo primario. Basándonos en estos resultados, se ha propuesto un modelo teórico de compartimentalización de la ruta de biosíntesis de cefalosporina C entre el citoplasma y el interior de microcuerpos (peroxisomas). En este sistema de secreción la proteína CefT3 está implicada en la entrada de la isopenicilina N al interior del microcuerpo, mientras que CefM participa en la secreción de penicilina N desde el interior de microcuerpos hacia el citoplasma. Por otro lado, la proteína CefT actúa como un exportador de diferentes intermediarios de la ruta (isopenicilina N, penicilina N y desacetilcefalosporina C) hacia el exterior celular y la proteína CefR se encuentra en el núcleo celular reprimiendo la expresión de los genes de secreción *cefM* y *cefT*.

## Aplicación de las técnicas FISH, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación

Lucia Blasco Escrivá

Directores: **Isabel Pardo Cubillos y Sergi Ferrer Soler.**  
Facultat de Ciències Biològiques,  
Universitat de València.

El vino es el producto de la fermentación del mosto de uva y en esta transformación intervienen gran cantidad de microorganismos. Estos microorganismos pueden ser beneficiosos, como

*S. cerevisiae* y *O. oeni*, o perjudiciales como la gran mayoría de las bacterias lácticas (BL) y todas las bacterias acéticas (BA). La adopción de medidas de control tempranas que eviten las alteraciones microbianas durante el proceso de vinificación o crianza es necesaria para obtener un vino de calidad. Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo de una metodología rápida que permita detectar, identificar y cuantificar las BL y acéticas en el vino. Para ello se desarrollaron de sondas fluorescentes que fueron útiles para la detección, identificación y cuantificación de especie de BL y BA del vino mediante microscopía de fluorescencia. Además se desarrollaron cebadores específicos para detección mediante PCR específica de BA. Estas técnicas se compararon con otras descritas previamente como el 16S-ARDRA y tras evaluar estas técnicas moleculares en muestras de mosto y vino se procedió a aplicación de dichas técnicas en vinificaciones a nivel de laboratorio, planta piloto y nivel industrial llegando a la conclusión de la importancia de su utilidad para poder prevenir los posibles deterioros causados por el crecimiento de microorganismos como las BL o BA.

---

## Impacto de los sistemas de reparación de lesiones producidas por agentes alquilantes en la virulencia de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

Gerard Àlvarez Juste

Directores: **Jordi Barbé García** y **Susana Campoy Sánchez**.

Departamento de Genética y de Microbiología, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona.

*Salmonella enterica* ser. *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) is an enteropathogen able to infect several mammalian species, generally causing mild diseases, such as gastroenteritis, although it can also become a systemic infection, producing septicaemia and even the death of the infected host.

Like other enterobacteria, the genome of *S. Typhimurium* codes for alkylation damage repair proteins. This kind of damage appears when alkylating agents, which are present in the environment or are produced endogenously as byproducts of normal metabolism, introduce alkyl groups in the DNA bases. Some of the most important genes coding for these proteins are *ada*, *alkA*, *alkB* and *aidB*, which generate the adaptive response to alkylation damage (known as the Ada response); and *ogt* and *tag*, which are not included in this response but possess similar functions. Other repair systems with a wider range of activities can also repair alkylation damage, being especially important the genes belonging to the *global genome repair* (GGR, which is carried

out by the UvrABC enzymatic complex) and the *transcription-coupled DNA repair* (TCR, focused on the transcriptionally active genes and directed by the Mfd protein, which recruits the UvrABC or the MutSL complexes) pathways of the nucleotide excision repair system (NER). Altogether compound a large variety of repair activities which allow the recognition of a broad diversity of targets generated by alkylating agents.

In order to establish the role of each of these genes and the consequences of their lack during the infection process, strains defective in one or several of them were constructed. Afterwards, each strain was treated with alkylating agents to analyze its survival. Although *S. Typhimurium* possesses so many alkylation damage repair proteins, in most strains the survival decreased due to the absence of just one or some of those proteins. Moreover, competitive assays using BALB/c mice were performed to determine the fitness of each strain. The results show that, even in those strains defective in several genes, the *in vivo* fitness of *S. Typhimurium* is not affected by the lack of most of the alkylation damage repair proteins studied, since only the strain UA1869 defective in the *ada*, *ogt*, *tag*, *uvrA*, and *mfd* genes presented a reduction of its virulence when it was orally inoculated. Therefore, the amount of alkylating agents generated in the organism might be lower than that used in the *in vitro* assays. Thus, the evolutionary conservation of the alkylation damage repair genes in *S. Typhimurium* may be due to survival outside the host.

The fact that the fitness decreased in the UA1869 strain and not in other mutants, some of them defective in a larger number of genes, suggests the existence of certain overlap between different repair systems. Thus, the absence of some repair proteins might be compensated by other belonging to other systems apparently different.

---

## Genomic patterns and phenotypic plasticity in prokaryotes analyzed within an ecological framework

Juan Antonio García López

Director: **Emilio Ortega Casamayor**.  
Centro de Estudios Avanzados de Blanes-CSIC, Universitat Autònoma de Barcelona.

La diversidad genómica de los microorganismos es resultado de la combinación de procesos evolutivos y de acontecimientos ecológicos. Así, la estructura específica de los genomas de bacterias es una consecuencia de la presión selectiva debida a interacciones entre microorganismos y ambiente a lo largo de la evolución. Estas evidencias hacen intuir que el DNA contiene más información estructural de lo que se esperaría mirando sólo la composición de las bases nucleotídicas. El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido desarrollar un marco teó-

rico basado en la geometría, la estadística y el modelado matemático para estudiar la relación entre estructura del genoma, estilo de vida y metabolismo de microorganismos procariontes. Para desvelar la relación entre la estructura del genoma y el estilo de vida, se han analizado cerca de 500 genomas mediante un método de física estadística que consigue reducir la complejidad genómica procarionte a un solo parámetro –la correlación intrínseca de largo alcance, que está relacionada directamente con la estructura fractal de la secuencia de DNA– que, además, puede ser utilizado en genómica comparativa y en estudios ecológicos. Los métodos escogidos para el estudio de las correlaciones de largo alcance en genomas han sido el *DNA walk* y el *Detrended Fluctuation Analysis* (DFA). El “paseo” de DNA es un método de geometría basado en una función derivada de la posición secuencial de cada nucleótido a lo largo de una secuencia de DNA. El “paseo” resultante es representativo del “paisaje” del DNA y permite la comparación simultánea entre diferentes genomas. El DFA proporciona un sencillo parámetro cuantitativo –el exponente de escala *alpha*– que representa las propiedades de correlación de una secuencia. La relación entre el estilo de vida y el metabolismo se ha examinado mediante un estudio de genómica comparativa de dos bacterias marinas que utilizan exclusivamente hidrocarburos como fuentes de carbono y energía en hábitats diferentes, *Alcanivorax borkumensis* y *Oleispira antártica*. Se han estudiado las bases genómicas de sus inusuales rasgos eco-fisiológicos para mejorar la comprensión de la influencia de temperatura sobre el crecimiento de bacterias basado en la degradación de hidrocarburos. Finalmente, se ha realizado una aproximación de genómica funcional utilizando el modelado matemático de la red metabólica codificada en el genoma de *Alcanivorax borkumensis* con el fin de profundizar en la relación entre la composición del genoma y el fenotipo metabólico. El conjunto de genes, proteínas, reacciones y metabolitos que participan en la actividad metabólica se ha identificado, clasificado e interconectado para reconstruir una red metabólica *in silico*. Dicha reconstrucción metabólica ha permitido, mediante el uso de métodos basados en la restricción de flujos y en el Análisis de Equilibrio de Flujo (FBA), caracterizar los peculiares rasgos ecofisiológicos de este microorganismo.

---

## Caracterización de levaduras de interés en jamón ibérico mediante técnicas de ácidos nucleicos

María Jesús Andrade Gracia

Directores: **Juan José Córdoba Ramos** y **Mar Rodríguez Jovita**.  
Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura.

En jamón ibérico hay un importante desarrollo de levaduras durante el proceso de madura-

ción. Las levaduras parecen tener un papel destacado en la génesis de compuestos volátiles contribuyentes al aroma de productos cárnicos madurados. Así, dentro de la población de levaduras que se desarrolla en el jamón ibérico se han identificado distintos biotipos de *Debaryomyces hansenii* con diferente capacidad de formación de compuestos volátiles. Estas diferencias, que pueden generar variaciones en el aroma de los productos, podrían estar vinculadas al lugar de procesado (Denominaciones de Origen Protegidas, D.O.P.) y/o a las etapas de maduración. Es pues, de gran interés caracterizar la población de levaduras en función del lugar de procesado y fase de maduración, evaluando además la capacidad de los biotipos para generar compuestos volátiles.

En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la eficiencia de diferentes técnicas de ácidos nucleicos (RFLP de las regiones ITS y 18S del ADN ribosómico, RAPD-PCR y RFLP del ADN mitocondrial) para la caracterización de levaduras aisladas de jamón ibérico. El método más adecuado se ha utilizado para diferenciar los biotipos que producen mayor cantidad y variedad de compuestos volátiles asociados al aroma a curado, tratando de diferenciar por área de procesado y fase de maduración. De todos los métodos ensayados, el RFLP del ADN mitocondrial permitió caracterizar a nivel de especie y cepa las levaduras aisladas de jamón ibérico. El RAPD-PCR permitió tipificar los biotipos previamente determinados mediante RFLP del ADN mitocondrial. Así, el uso conjunto del RFLP del ADN mitocondrial y del RAPD-PCR es recomendable para la selección de levaduras como cultivos iniciadores y el posterior control de su implantación.

Con el RFLP del ADN mitocondrial se encontraron 15 biotipos diferentes, que se adscribieron a *D. hansenii* y *Candida zeylanoides*, siendo la primera la predominante. La mayoría se detectaron en todas las D.O.P. Sin embargo, se detectaron biotipos exclusivos de algunas de D.O.P., lo que puede ser de gran utilidad como indicadores de procedencia geográfica. Además, el RFLP del ADN mitocondrial permitió observar diferencias en la cantidad y variedad de compuestos volátiles producidos en función del patrón de restricción de la especie y biotipo de levaduras. Así los aislados de *D. hansenii* mostraron mayor cantidad de compuestos volátiles relacionados con el aroma a curado que los de *C. zeylanoides*.

Además, se observaron diferencias relevantes en la producción de compuestos volátiles a lo largo del procesado de los biotipos diferenciados mediante RFLP del ADN mitocondrial y RAPD-PCR. Por consiguiente, ambas técnicas moleculares deberían aplicarse junto con la generación de compuestos volátiles en el medio de cultivo diseñado para la selección de levaduras como cultivos iniciadores en la industria cárnica.

Finalmente se evaluó la producción de compuestos volátiles de diferentes biotipos de *D. hansenii* en productos madurados (salchichón). Dos de los biotipos inoculados (E y C2) mostraron gran producción de compuestos volátiles en salchichón, por lo que pueden ser de gran utilidad como cultivos iniciadores en productos cárnicos.

Esta Tesis Doctoral ha sido desarrollada gracias a la financiación del proyecto del Ministerio

de Ciencia y Tecnología AGL2001-0804 y a la Beca Predoctoral para la Formación de Personal Investigador concedida a M<sup>º</sup> Jesús Andrade Gracia.

De esta Tesis Doctoral se han derivado los siguientes artículos científicos publicados en revistas incluidas en Journal Citation Report:

1. Andrade y col. 2006: *International Journal of Food Microbiology* 107, 48-58.
2. Andrade y col. 2009: *Food Chemistry* 113, 457-463.
3. Andrade y col. 2009: *Food Microbiology* 26, 578-586.
4. Andrade y col. 2010: *Meat Science* 84, 377-383.
5. Andrade y col. 2010: *Meat Science* 85, 256-264.

## Obtención de moléculas lineales de AS-48 que conserven la estructura tridimensional y la actividad biológica de la molécula nativa

Manuel Montalbán López

Directores: Mercedes Maqueda, Eva Valdivia y Manuel Martínez-Bueno.

Departamento de Microbiología, Universidad de Granada.

AS-48 es una bacteriocina circular de síntesis ARibosómica producida por diferentes especies de *Enterococcus*, constituida por cinco alfa hélices con un plegamiento de tipo saposina. AS-48 se sintetiza como un prepéptido que sufre la eliminación del péptido señal y la unión de los extremos por enlace peptídico para originar la molécula madura que posee una gran estabilidad y amplia actividad antibacteriana.

En este trabajo se ha planteado la linearización de AS-48 con el fin de estudiar cómo afecta la circularización a la estructura, actividad y estabilidad de la molécula. Para ello se generaron variantes lineales mediante proteólisis controlada con diversas enzimas. La termolisina, en condiciones parcialmente desnaturizantes, generó una forma abierta y dos fragmentos que mantenían la actividad en orden decreciente respecto a la molécula nativa. Se trataba de proteínas helicoidales, menos estructuradas en ambiente acuoso, pero similares a la nativa cuando se adicionaba dodecil sulfato sódico. Se demostró que la circularización no es esencial para la actividad de AS-48 aunque contribuye a mantener la estabilidad y actividad de la proteína.

Por ello, se planteó la apertura de AS-48 por la propia unión cabeza cola y por las dos regiones más extensas que conectan hélices. Se realizó permutación circular en el gen y se empleó *Escherichia coli* como hospedador. En ningún caso fue posible la detección de las moléculas abiertas en las condiciones ensayadas, ni en las diversas cepas usadas (deficientes en proteasas y enriquecidas en ARN para codones raros). El análisis

transcripcional mostró niveles adecuados de los respectivos ARNm, por lo que la proteólisis en la célula puede ser la explicación más plausible.

Estos genes fueron también fusionados al extremo carboxilo de la proteína LytA de *Streptococcus pneumoniae* logrando así la producción de ambas moléculas reconocidas por anticuerpos específicos. La optimización del corte con el enzima específico generó fragmentos activos cuyos tamaños no se correspondían con los esperados. El resultado fueron proteínas químicas que mantenían parte de la etiqueta fusionada -según se demostró por espectrometría de masas y western blot- y la actividad antibacteriana.

También se han construido genes que codifican las proteínas obtenidas por proteólisis y su expresión se ha ensayado en *Lactococcus lactis* fusionadas a señales de secreción junto a los genes responsables del exporte, bajo un promotor inducible con nisina. Sin embargo no ha sido posible su obtención, a pesar de que los determinantes de resistencia frente a AS-48, que también habían sido clonados, fueron eficientemente expresados en esta bacteria.

## Análisis de secuencias multilocus en estudios de taxonomía, filogenia y evolución de *Pseudomonas*

María Magdalena Mulet Pol

Directora: Elena García-Valdés Pukkitts.

Dep. de Biología, Facultad de Ciencias, Universitat de les Illes Balears.

El género *Pseudomonas* está compuesto por un número elevado de especies metabólicamente muy versátiles. En la actualidad hay 120 especies reconocidas y se describen continuamente nuevas especies.

El método actualmente aceptado para discriminar entre especies bacterianas es la hibridación DNA-DNA, pero este método tiene sus limitaciones (tiempo requerido, necesidad de experiencia en desarrollo, no define distancias entre especies, no es acumulativo). En esta tesis se ha propuesto un nuevo método, fiable y acumulativo para la definición de especies en el género *Pseudomonas*, basado en la técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA). La enorme diversidad genética de las especies de este género la hacen un banco de pruebas ideal en el que se pueden validar nuevos métodos. La técnica de MLSA permite además elucidar la diversidad genética del género, su filogenia y su taxonomía. Además, se han creado nuevas herramientas bioinformáticas, y el conjunto de datos es accesible a través de Internet (PseudoMLSA Database).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

Se ha establecido la filogenia del género *Pseudomonas* basada en los genes: 16S rRNA,

*gyrB*, *rpoB* y *rpoD*. Pueden distinguirse 2 grandes linajes: *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*. El linaje *P. fluorescens* con 6 grupos: *P. anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. straminea* y *P. syringae* y el linaje *P. aeruginosa* con 3 grupos: *P. aeruginosa*, *P. oleovorans* y *P. stutzeri*. Otras cepas tipo no se afilian a ningún linaje y aparecen en ramas independientes: el grupo *P. oryzihabitans* y las cepas tipo *P. luteola*, *P. pachastrellae* y *P. pertucingena*.

El análisis del concatenado de los cuatro genes se presenta como una metodología de gran valor para la adscripción a especies de nuevas cepas de *Pseudomonas*.

El gen *rpoD* posee un poder de discriminación superior al de los otros genes estudiados en las 107 cepas de *Pseudomonas*; seguida de los genes *gyrB* y *rpoB*.

Los cebadores del gen *rpoD* diseñados y evaluados en este estudio, Ps30EG/Ps790EG, son selectivos para la detección de *Pseudomonas*. Estos cebadores pueden ser combinados en una PCR anidada ("nested PCR") para incrementar la sensibilidad en la detección de *Pseudomonas* en muestras ambientales cuando éstas se encuentran presentes en bajo número.

La base de datos PseudoMLSA ([www.uib.es/microbiologiaBD/Welcome.php](http://www.uib.es/microbiologiaBD/Welcome.php)) permite integrar y vincular los diferentes tipos de información disponible sobre el género *Pseudomonas*. Esta es una herramienta útil para el análisis de secuencias multilocus, y para la identificación y caracterización de nuevos aislamientos de *Pseudomonas*.

Se ha podido restringir el análisis de secuencias multilocus (MLSA) a tres genes (16S rRNA, *gyrB* y *rpoD*) para diferenciar las 18 genomovares de *P. stutzeri* descritas en la actualidad. El MLSA es un método válido para asignar nuevas cepas a genomovares ya existentes, o para detectar otras nuevas. La cepa CCUG 46542 ha sido asignada como una nueva genomovar (gv19).

## Intestinal microbiology in Crohn's disease: A study of *Escherichia coli* as a potential etiologic agent

Margarita Martínez Medina

Director: **Librado Jesús García Gil**.  
Universitat de Girona.

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica que puede afectar a hombres y mujeres de distintas edades. La prevalencia e incidencia son mayores en países desarrollados, diagnosticándose en España unos 2.000 casos nuevos cada año. Los síntomas principales son la presencia de diarrea, a menudo con sangre, dolor abdominal y pérdida de peso, además de múltiples complicaciones y manifestaciones extraintestinales. A pesar de la intensa investigación realizada, la etiología de la enfermedad de Crohn se desconoce todavía. Se han implicado tanto factores genéticos e inmunológicos, que confieren susceptibilidad al individuo, como factores externos o ambien-

tales, incluyendo la microbiota intestinal y/o el estilo de vida.

El objetivo principal de la tesis fue describir las poblaciones bacterianas especialmente asociadas a los enfermos de Crohn, con la intención de identificar posibles agentes etiológicos. Para ello, comenzamos analizando la composición global de la comunidad bacteriana presente en la mucosa intestinal utilizando métodos moleculares. Este primer estudio permitió identificar qué especies se hallaban más frecuentemente en enfermos de Crohn (CD) respecto a individuos control (C), siendo *Escherichia coli* una de las especies bacterianas que se asoció a dicha enfermedad. A pesar de que *E. coli* es un microorganismo común del tracto intestinal, estudios previos realizados por otros investigadores ya apuntaban hacia este microorganismo como posible agente etiológico, en especial el patovar recientemente descrito 'adherent-invasive *E. coli* (AIEC)'. Por esta razón, el resto del trabajo se centró en el estudio de las poblaciones de *E. coli* asociadas a la mucosa intestinal.

El objetivo principal de la segunda parte del trabajo fue el de describir la riqueza, abundancia, diversidad y carácter patogénico de las poblaciones de *E. coli* y AIEC presentes en la mucosa intestinal. Para llevar a cabo este objetivo, se realizó el aislamiento de alrededor de 100 colonias de *E. coli* de la mucosa ileal y colónica de 20 pacientes de Crohn y 28 controles. Se utilizaron dos técnicas para analizar la clonalidad de los aislados, entre ellas la electroforesis en campo pulsado (PFGE). La identificación de cepas pertenecientes al patovar AIEC se realizó sobre 4314 aislados. Además, se determinó el serotipo, filogrupos, y genotipo (19 genes de virulencia) de los distintos subtipos de *E. coli* y AIEC obtenidos. A pesar de las similitudes de riqueza y diversidad de subtipos presentes en enfermos de Crohn e individuos control, la abundancia de *E. coli* era superior en enfermos de Crohn, especialmente en aquellos pacientes con afectación ileal ( $P=0.001$ ). Se hallaron clones específicos de cada huésped, excluyendo la existencia de un clon o grupo clonal común entre los enfermos de Crohn. Las cepas compartían genes de virulencia característicos de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales, con una frecuencia similar en enfermos de Crohn y controles. En cambio, la prevalencia (% de individuos con AIEC: CD= 51.9%; C= 16.7%;  $P=0.003$ ), la abundancia (% de AIEC/*E. coli*: CD=  $3.8 \pm 5.0\%$ ; C=  $1.5 \pm 3.8\%$ ;  $P=0.039$ ) y la riqueza (número de subtipos de AIEC por paciente: CD=  $0.8 \pm 1.4$ ; C=  $0.2 \pm 0.4$ ;  $P=0.015$ ) de AIEC era superior en enfermos de Crohn. Las cepas AIEC presentaron una gran variabilidad de serotipos y genotipos, pero el filogrupos B2 fue el más abundante entre ellas (AIEC: 64%; *E. coli* no-AIEC: 38%;  $P=0.044$ ). Este es el quinto trabajo que describe la prevalencia de cepas AIEC en enfermos de Crohn, después de que el primero se publicase el año 2004. La exhaustiva aproximación metodológica utilizada permitió obtener valores de prevalencia más precisos, a la vez de obtener información acerca de parámetros ecológicos específicos del patovar AIEC, hasta el momento, no descritos. En general, los datos obtenidos en esta parte del trabajo apoyan la hipótesis que el patovar

AIEC está implicado en la enfermedad de Crohn. También se presentaron los estudios de caracterización de estas cepas AIEC y no-AIEC.

Los biofilms bacterianos que se encuentran en la mucosa intestinal se consideran importantes en la etiología y/o desarrollo de la enfermedad de Crohn. Por este motivo, determinamos la capacidad de formar biofilms de las cepas AIEC y compararlas con cepas no-AIEC. El índice de formación de biofilms fue contrastado con, además del fenotipo AIEC, el serotipo, el filogrupos y los genes de virulencia de las cepas. Fue interesante observar que las cepas AIEC presentaban índices de formación de biofilms superiores a las cepas no-AIEC ( $P=0.007$ ) y que el 65.7% de cepas con una habilidad moderada-fuerte de formar biofilms eran AIEC. Además, los índices de adhesión ( $P=0.009$ ) e invasión ( $P=0.003$ ) se correlacionaban positivamente con la capacidad de formar biofilms. La motilidad (100%,  $P<0.001$ ), el tipo de flagelina H1 (53.8%,  $P<0.001$ ), los serogrupos O83 (19.2%,  $P=0.008$ ) y O22 (26.9%,  $P=0.001$ ), la presencia de genes de virulencia como *sfalfoCDE* (38.5%,  $P=0.003$ ) e *ibeA* (26.9%,  $P=0.017$ ), y el filogrupos B2 (80.8%,  $P<0.001$ ) eran características frecuentes entre las cepas formadoras de biofilms. La principal contribución de esta parte del estudio fue describir la capacidad de formar biofilms *in vitro* como característica fenotípica asociada al patovar AIEC que podría tener implicaciones en la patogénesis de dicho patovar en la enfermedad de Crohn, ya sea confiriendo al patovar una colonización más estable de la mucosa, como confiriendo una protección contra agentes antimicrobianos, que conjuntamente podrían colaborar a que la infección sea crónica.

Dada la similitud observada en cuanto a los genes de virulencia entre el patovar AIEC y otras *E. coli* patógenas causantes de infecciones extraintestinales (ExPEC), también determinamos la frecuencia de cepas ExPEC con fenotipo AIEC y luego buscar si existe un origen filogenético común entre las cepas AIEC de origen intestinal y extraintestinal. La capacidad de adhesión, invasión y replicación en macrófagos de 63 cepas ExPEC se determinó mediante cultivos *in vitro* con células I407 y J774 para determinar el fenotipo AIEC. También se comparó la distribución de genes de virulencia (*papC*, *sfalfoCDE*, *afa/draBC*, *fimH*, *fimAv<sub>MT78</sub>*, *hlyA*, *cnf1*, *cdt*, *iucD*, *neuC*, y *ibeA*) entre estas 63 cepas ExPEC (aisladas principalmente de casos de infección urinaria, sepsis y meningitis) y las 23 cepas AIEC intestinales. Se emplearon dos métodos para la determinar la relación genética entre las cepas AIEC intestinales y extraintestinales: PFGE y MLST (*Multilocus Sequence Typing*) secuenciando 7 genes de conservación de proteínas estructurales (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, y *recA*). Cabe destacar que solamente 4 (6.35%) cepas ExPEC, con serotipos O6:H1 (dos cepas), O83:H1 y O25:H4, presentaron fenotipo AIEC. Pero, interesantemente, se halló una relación genética entre éstas y otras AIEC de origen intestinal mediante MLST (ST73, ST135 y ST131 respectivamente). Este estudio ha permitido demostrar que la mayoría de cepas ExPEC no se comportan como AIEC, a pesar de la similitud genética que existe entre ambos patovares. Por lo tanto, se

confirma que el patovar AIEC es próximo al patovar ExPEC, pero posee características específicas relacionadas con su virulencia que, hasta el momento, solamente se pueden determinar fenotípicamente. Hacen falta estudios adicionales que tengan como objetivo identificar cuál es la maquinaria genética implicada en conferir el fenotipo AIEC.

Los resultados de este trabajo coinciden con investigaciones previas que describen la alteración bacteriana presente en enfermos de Crohn. Además, apoya la hipótesis que implica el patovar AIEC como agente etiológico de dicha enfermedad inflamatoria intestinal. Contribuimos también en la descripción de las poblaciones de *E. coli* asociadas tanto a la mucosa intestinal de individuos sanos como pacientes de Crohn aportando datos acerca de aspectos ecológicos y patogénicos de éstas, así como en la caracterización de cepas AIEC, hallando nuevos aspectos fenotípicos que podrían estar relacionados con su patogénesis.

## Implicación de las envolturas celulares en el mecanismo de inactivación microbiana mediante tecnologías emergentes de conservación: desarrollo de procesos combinados

**María Somolinos Lobera**

Directores: **Rafael Pagán Tomás** y **Diego García Gonzalo**.

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

En la actualidad los consumidores demandan alimentos de gran calidad, seguros desde un punto de vista sanitario, mínimamente procesados y sanos.

Durante los últimos años se ha realizado un enorme esfuerzo investigador con objeto de poner a punto nuevos métodos de conservación de los alimentos, como los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) y las Altas Presiones Hidrostáticas (APH), capaces de inactivar los microorganismos sin causar alteraciones indeseables en las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos. Sin embargo, debido a las limitaciones de los equipos y a la gran resistencia de ciertas especies microbianas frente a estas tecnologías, se está trabajando en el desarrollo de procesos más complejos que, combinando diversas tecnologías, permitan lograr mayor estabilidad y seguridad de los alimentos sin detrimento de su calidad.

Para establecer una combinación inteligente de diversos métodos de conservación es necesario conocer con exactitud su mecanismo de inactivación. La existencia de daños subletales en las envolturas celulares normalmente es cla-

ve en el diseño de procesos de conservación basados en la combinación de estas tecnologías y conservantes químicos. Con objeto de evitar el uso de aditivos artificiales, en la actualidad se buscan agentes antimicrobianos alternativos, de origen natural, como los aceites esenciales, que resulten inocuos para los consumidores.

Esta tesis ha demostrado la existencia de daño subletal en las envolturas celulares de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Dekkera bruxellensis* y *Saccharomyces cerevisiae* tras la aplicación de diferentes tecnologías de conservación, como los tratamientos térmicos, PEAV, APH o la adición de citral. Se detectaron daños subletales en más del 99,99 % de la población superviviente en función de las condiciones de tratamiento. Así, las células dañadas mostraron una menor resistencia frente a otras barreras de conservación, lográndose su inactivación mediante el diseño de procesos combinados. Por ejemplo, se demostró efecto letal sinérgico entre tratamientos térmicos o de APH y citral, lográndose la inactivación de más de 5 ciclos de las poblaciones iniciales de *E. coli* y *L. monocytogenes*. Además, esta sinergia observada en *E. coli* podría relacionarse con los daños ocasionados por el calor o la presurización sobre la membrana externa, que facilitarían el acceso del citral a su estructura diana.

En resumen, esta investigación indica que un análisis exhaustivo del mecanismo de inactivación microbiana por un determinado método de inactivación, así como la evaluación de los factores que afectan a la resistencia microbiana puede resultar de gran ayuda en el diseño de procesos de conservación de alimentos más adecuados. Además, la detección de daño subletal en las envolturas celulares puede mostrar las condiciones bajo las cuales diversos métodos de conservación pueden actuar de manera sinérgica, permitiendo la obtención de productos microbiológicamente seguros y con una calidad organoléptica adecuada.

## Evolución experimental de la gama de huéspedes del Virus del grabado del tabaco (TEV)

**Patricia Agudelo-Romero**

Directores: **Santiago F. Elena Fito** y **Rafael Sanjuán Verdeguer**.

Instituto de Biología molecular y celular de plantas -IBMCP- (CSIC/UPV).

En la actualidad, nuevos virus de plantas han aumentado debido a cambios en el medio ambiente y a malas prácticas agrícolas. Por esto, es importante determinar los factores genéticos y evolutivos implicados en la aparición de estos nuevos virus. El objetivo fundamental de esta Tesis es simular un proceso de emergencia viral.

Los virus de plantas muestran una alta variabilidad en sus gamas de huéspedes por lo que

pueden ser especialistas o generalistas. En nuestro primer conjunto de experimentos, exploramos el coste que supone la ampliación de la gama huéspedes en términos de eficacia viral del Potyvirus del grabado del tabaco (TEV). Primero, empleando huéspedes pertenecientes a la misma familia taxonómica (tabaco y pimiento). Segundo, en huéspedes pertenecientes a familias taxonómicas alejadas (tabaco y arábidopsis). Estos experimentos muestran que la adaptación a un nuevo huésped tiene un efecto pleiotrópico antagonista en el huésped original. Concluyendo que ampliar la gama de huéspedes implica un coste en términos de eficacia promedio, de manera que la eficacia viral no se maximiza para cada huésped sino que existe un compromiso<sup>1</sup>.

En un segundo conjunto de experimentos, exploramos si la adaptación del virus a arábidopsis conlleva cambios en el tipo de interacciones que éste establece con la planta a nivel del transcriptoma. Más concretamente, nos preguntamos: (1) ¿Qué cambios se observan en el patrón de expresión génica del huésped tras la infección de un virus emergente? (2) ¿Cómo cambia la red de interacciones a medida que el virus se adapta a su nuevo huésped. Para desarrollar este trabajo utilizamos micromatrices de cDNA. Donde identificamos un conjunto de genes de la planta cuya expresión se altera tras la infección con TEV, muchos de ellos implicados en respuesta a estreses bióticos y abióticos<sup>2</sup>. Este conjunto de genes cambió a medida que el virus se adaptó a su nuevo huésped aumentando su eficacia y virulencia, observándose que muchos genes de respuesta a estrés biótico dejaron de ser activados después de la infección. Estos cambios fueron consecuencia de un número limitado de mutaciones en el genoma de TEV. De hecho, un solo cambio en el virus es el responsable de los nuevos síntomas en la planta<sup>3</sup>.

Por último, comprobamos si la adaptación de TEV al ecotipo (*Ler-0*), también aumenta su eficacia y virulencia en otros ecotipos. Para establecer si la adaptación viral es específica de un genotipo del huésped o si, por el contrario, facilita el acceso del virus a otros genotipos. Existe un buen número de grados de susceptibilidad a TEV en Arabidopsis, esta variabilidad se debe al alelo dominante *RTM1* (restricción del movimiento de TEV 1). Para esto, evaluamos 9 ecotipos de arábidopsis con diferentes niveles de susceptibilidad a TEV. En los que observamos que el virus adaptado a *Ler-0* era capaz de infectar y generar síntomas en ecotipos que eran resistentes a la infección con el TEV ancestral<sup>4</sup>. Estos resultados sugieren que poseer el alelo de resistencia en el locus *RTM1* no es condición suficiente para que la planta sea resistente a TEV.

1. Agudelo-Romero P, de la Iglesia P, Elena SF. 2008. *Infect. Genet. Evol.* 8(6):806-14.
2. Agudelo-Romero P, Carbonell P, de la Iglesia F, Carrera J, Rodrigo G, Jaramillo A, Pérez-Amador MA, Elena SF. 2008. *Virology* 7(5):92-102.
3. Agudelo-Romero P, Carbonell P, Pérez-Amador MA, Elena SF. 2008. *PLoS ONE* 11(3): e2397.
4. Lalic J, Agudelo-Romero P, Carrasco P, Elena SF. 2010. *Phil. Trans. R. Soc. B.* (Accepted).

## Engineering and production of quality viral proteins in prokaryotic and eukaryotic systems

Mónica Martínez Alonso

Directores: **Antonio Villaverde, Neus Ferrer Miralles y Rob Noad.**  
Universidad Autónoma de Barcelona.

La posibilidad de obtener proteínas con aplicaciones industriales o terapéuticas mediante la tecnología del DNA recombinante ha revolucionado la industria biotecnológica. A pesar de esto, la producción de proteínas recombinantes en sistemas heterólogos aún no está optimizada, y muchas veces estas proteínas se obtienen en forma insoluble. La selección de un sistema de expresión adecuado es importante para conseguir obtener la proteína en una forma funcional y soluble. En esta tesis se ha utilizado una GFP recombinante como proteína modelo para estudiar agregación y actividad durante la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* y en el sistema de expresión de baculovirus.

Al producir nuestra proteína modelo en *E. coli*, ésta se obtiene mayoritariamente en forma de cuerpos de inclusión con una elevada actividad biológica. Nuestros resultados indican que aunque es posible mejorar la solubilidad de la proteína optimizando parámetros del proceso de producción, las condiciones que permiten mejorar los niveles de producción resultan en una disminución de la calidad conformacional de la proteína obtenida. Ya que no es posible maximizar al mismo tiempo el rendimiento del proceso de producción y la calidad de la proteína obtenida, el diseño del proceso deberá optimizarse en función del parámetro más relevante para el uso final de la proteína.

Además, la versión soluble de esta proteína contiene una amplia gama de agregados solubles, que conforman una población heterogénea en cuanto a estructura secundaria y funcionalidad. Esto indica que los cuerpos de inclusión, que son más homogéneos que su versión soluble, pueden entenderse como una pequeña subpoblación dentro del total de especies proteicas recombinantes. Por otra parte, la calidad de la proteína recombinante representa un promedio estadístico de la calidad de cada una de estas especies.

Una de las estrategias más utilizadas para mejorar la solubilidad de proteínas recombinantes consiste en la coexpresión de moduladores del plegamiento. Al coexpresar la chaperona bacteriana DnaK y su cochaperona DnaJ con nuestra GFP modelo producida en *E. coli*, observamos una disminución de la agregación, que estaba asociada a proteólisis. El cambio de huésped de estas chaperonas juntamente con nuestra proteína modelo para producirlas en el sistema de expresión de baculovirus en células de insecto o larvas permitió mantener la actividad foldasa de DnaKJ eliminando su actividad proteolítica asociada, ya que ésta es dependiente

de proteasas bacterianas. En el sistema de expresión de baculovirus observamos mejoras en los niveles de proteína total y soluble, la estabilidad proteolítica, solubilidad y actividad biológica al ser coexpresada con las chaperonas bacterianas DnaKJ. Además, hemos podido confirmar en un sistema eucariota el concepto de que el rendimiento y la calidad de la proteína obtenida son parámetros antagónicos que no se pueden favorecer de forma simultánea en procesos de producción.

Por último, también hemos podido comprobar que las chaperonas bacterianas son funcionales en un sistema eucariota. Esto permite ampliar el catálogo de moduladores del plegamiento disponibles para su uso en sistemas eucariotas.

## Biodiversidad de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica de vinos tintos de la variedad Cencibel: caracterización molecular y tecnológica para la selección de cepas

Patricia Ruiz Pérez

Director: **María Llanos Palop Herreros.**  
Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha.

Se ha realizado un estudio de la biodiversidad y la caracterización tecnológica de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica espontánea de vinos tintos de la variedad Cencibel elaborados en bodegas de Castilla-La Mancha con el objetivo de seleccionar aquellas cepas autóctonas que presentaran las mejores propiedades para ser utilizadas como cultivos iniciadores.

Para ello, se tomaron muestras de vino elaborado en 6 bodegas de 4 provincias (Albacete, Ciudad Real, Cuenca y Toledo) de Castilla-La Mancha, en dos vendimias consecutivas.

La caracterización genética de los aislados utilizando diferentes técnicas moleculares (RAPD-PCR, REA-PFGE y DD-PCR) puso de manifiesto que la RAPD-PCR es una técnica adecuada para el genotipado de estos aislados, tanto por su capacidad de discriminación intraespecífica, comparable con la de la REA-PFGE, como por su sencillez metodológica. Por el contrario, la DD-PCR mostró una escasa reproducibilidad lo que la invalida para estudios de biodiversidad.

Los resultados del estudio de caracterización genética pusieron de manifiesto la presencia de genotipos coincidentes en muestras tomadas en diferentes vendimias y procedentes de bodegas situadas en diferentes provincias de la región, lo que confirma la existencia de una microbiota bien adaptada a las condiciones ecológicas de esta región vitivinícola.

La identificación de los aislados mediante la técnica 16S-ARDRA mostró que *O. oeni* es la especie predominante en la fermentación maloláctica de los vinos de la variedad Cencibel, si bien también han podido identificarse, aunque en baja proporción, las especies: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *Lc. mesenteroides*.

En el estudio de caracterización tecnológica efectuado a los 84 aislados representantes de los diferentes genotipos obtenidos en la etapa de caracterización genética, destacaron dos cepas de *O. oeni*, las cepas C22L9 y D13L3, siendo los vinos elaborados con la cepa C22L9 los preferidos por los catadores en el análisis sensorial.

El ensayo de implantación, utilizando vinos de las variedades Tempranillo, Syrah, Cabernet Sauvignon y Tinto de la Pámpana Blanca, realizado con la cepa C22L9 y con la cepa comercial *O. oeni* PN4, puso de manifiesto que la cepa C22L9 se implanta de forma satisfactoria en todas las variedades ensayadas, habiéndose obtenido en algunos casos porcentajes de implantación superiores a los de la cepa comercial.

Los resultados obtenidos han permitido tener un mejor conocimiento del proceso microbiológico que ocurre en la fermentación maloláctica de los vinos de la variedad Cencibel y han permitido seleccionar una cepa de *O. oeni* con excelentes propiedades para ser utilizada como cultivo iniciador a escala industrial.

La puesta a disposición de las bodegas de cepas autóctonas, seleccionadas en base a criterios enológicos adecuados a las exigencias del mercado actual, reportará importantes beneficios a la industria del sector. Por un lado, permitirá un control eficiente de la fermentación maloláctica, evitando riesgos innecesarios que siempre implican un coste económico, y por otro, permitirá la obtención de vinos higiénicos de calidad con características enológicas propias.

## Caracterización de cepas de *Streptococcus suis*, serotipos 2 y 9, aisladas de ganado porcino en España

Verena Blume Serrano

Directores: **José Francisco Fernández-Garayzábal Fernández y Ana Isabel Vela Alonso.**  
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

Las infecciones por *Streptococcus suis* son consideradas actualmente una de las principales patologías del cerdo en países de cría porcina industrial, y su implicación en procesos clínicos y su carácter zoonótico son factores que han condicionado que su estudio sea emergente en la Unión Europea. Pese a su importancia, poco se conoce sobre la estructura de la población de *S. suis* y la potencialidad de determinados clones para producir patología en el ganado porcino. Para poder ampliar el conocimiento sobre estas

cuestiones, en el presente trabajo se ha realizado una caracterización fenotípica (perfil bioquímico, serotipificación y estudio de la expresión de las proteínas relacionadas con la virulencia MRP, EF y SLY) y una caracterización genética (electroforesis en campo pulsado [PFGE] y análisis de la secuenciación de múltiples genes [MLST]) de cepas aisladas de procesos clínicos y de portadores en el ganado porcino en España. También se ha estudiado su diversidad y relaciones genéticas así como la posible existencia de clones prevalentes responsables de la mayoría de casos clínicos. Finalmente, se han comparado las cepas clínicas y las cepas aisladas de animales portadores respecto a la expresión de los distintos factores relacionados con la virulencia, así como el estudio de la variabilidad de los genes que codifican para dichos factores. La caracterización se ha centrado en los aislados de los serotipo 2 y 9 por ser los más prevalentes, en España y en Europa.

Los estudios realizados permiten confirmar que el serotipo 2 es el más prevalente en la población de *S. suis* del ganado porcino español, así como el incremento en el aislamiento del serotipo 9 como responsable de casos clínicos respecto de los datos de prevalencia tradicionalmente observados en España.

Se estudió en todas las cepas la expresión de los marcadores de virulencia MRP, EF y SLY, así como la detección de sus correspondientes genes (*mrp*, *epf* y *sly*) y la variabilidad de éstos mediante su secuenciación directa. Se hallaron diferencias en la expresión de los factores de virulencia en relación con el serotipo. Las cepas del serotipo 2, expresaron mayoritariamente los fenotipos MRP<sup>+</sup>EF<sup>+</sup>SLY<sup>+</sup> y MRP<sup>+</sup>EF<sup>+</sup>SLY<sup>-</sup>, mientras que entre los aislados del serotipo 9, fueron los fenotipos MRPEF<sup>+</sup>SLY<sup>+</sup> y MRPEF<sup>+</sup>SLY<sup>-</sup> los más frecuentemente aislados. En los genes *sly* y *epf* se halló un 100% de homología con las secuencias publicadas independientemente del serotipo o de la condición clínica, mientras que en el gen *mrp* se hallaron mutaciones silenciosas en determinadas localizaciones dependiendo del serotipo. El estudio de la expresión de los marcadores de virulencia, MRP, EF y SLY, así como de los genes que codifican para ellos, no permitió diferenciar las cepas clínicas y las cepas aisladas de portadores entre los aislados de un mismo serotipo.

La caracterización genética de los aislados mediante PFGE confirmó la relativamente alta diversidad en la población de este patógeno, similar en ambos serotipos. Los serotipos 2 y 9, se agruparon en dos grupos genéticos separados (A y B), encontrándose una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre el serotipo 9 y el grupo A, y el serotipo 2 y el grupo B. Las diferencias genéticas entre estos serotipos mediante el análisis PFGE coincidiría con la distinta expresión de las proteínas asociadas a la virulencia por ambos serotipos, sugiriendo que los serotipos 2 y 9 formarían poblaciones de *S. suis* distintas genética y fenotípicamente. Los resultados de MLST mostraron que la mayoría de los aislados clínicos de serotipo 2 analizados pertenecían al clon ST1 ampliamente distribuido en Europa. Por el contrario, la mayor parte de los aislados clínicos del serotipo 9 pertenecieron al clon ST61,

poco relacionado genéticamente con el clon ST87 prevalente en Europa. Las diferencias halladas a nivel genético entre los aislados del serotipo 9 estudiados y los aislados europeos en este serotipo, coinciden con la diferencias halladas en nuestro estudio de caracterización fenotípica ya que solamente un 2,1% de estos aislados expresaron MRP<sup>+</sup>, mientras que la mayoría de aislados europeos de este serotipo expresan MRP<sup>+</sup>. Los datos de caracterización mediante MLST sugieren que la actual diseminación del clon ST61 tiene su origen en cepas pertenecientes al mismo complejo clonal detectadas en España a principios de la década actual.

## El sistema toxina-antitoxina, $\epsilon\zeta$ , como inhibidor de la proliferación celular e inductor de tolerancia

Virginia Soledad Lioy

Director: Juan Carlos Alonso.  
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).

En la actualidad existe una necesidad urgente de encontrar nuevos compuestos para luchar contra la aparición de bacterias patógenas resistentes a antibióticos y de conocer los mecanismos que hacen a éstas tolerantes a los mismos. Los sistemas de Toxina-Antitoxina (TA), implicados en el mantenimiento estable de plásmidos y en la regulación de estrés, se encuentran conservados en plásmidos de bacterias Gram-positivas resistentes a vancomicina o eritromicina. En el plásmido pSM19035, aislado de una cepa de *S. pyogenes* resistente a eritromicina, la antitoxina  $\epsilon_2$  interacciona con la toxina  $\zeta$ , neutralizando su actividad fosfotransferasa. Cuando  $\zeta$  queda libre induce, a través de un mecanismo desconocido, dos estados celulares (estasis y tolerancia), tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*. La estasis celular se ve caracterizada por una drástica reducción en la tasa de replicación, transcripción, traducción y síntesis de nucleótidos. Sin embargo, si las células se someten a la acción prolongada de la toxina  $\zeta$ , las mismas no pueden recuperarse del estado “durmiente” y una subpoblación muere por lisis celular ( $\approx 30\%$ ).

La mayor parte de las bacterias en un cultivo son susceptibles a los antibióticos, pero existe una pequeña fracción que es insensible a los mismos (células persistentes). En este trabajo, hemos demostrado que  $\zeta$  induce una pequeña subpoblación de células que son insensibles a su efecto tóxico, independientemente de la fase de crecimiento. En presencia de un antibiótico y  $\zeta$  se observó un aumento en la sensibilidad al compuesto antimicrobiano, indicando que la toxina induce un tipo de “persistencia” diferente al inducido por los antibióticos. Hemos demostrado que la expresión de la antitoxina  $\epsilon_2$  sólo es capaz de revertir las células que son insensibles a la acción de la toxina  $\zeta$ , sin observar un aumento de las células persistentes y aumentando la sensibilidad a los antibióticos. Esto indica que el es-

tado de estasis inducido por  $\zeta$  no es responsable de la persistencia a antibióticos.

Todos estos resultados hacen del sistema  $\epsilon\zeta$ , un candidato ideal para desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos. Así, a través de dinámica molecular buscamos los aminoácidos más relevantes en la estabilidad del sistema  $\epsilon\zeta$ . Encontramos que los residuos Asp18 y Glu22 son los más importantes para la estabilidad del complejo  $\epsilon\zeta$ . Para validar las predicciones *in silico*, analizamos los aminoácidos por medio de mutagénesis dirigida y desarrollamos un ensayo de BRET para evaluar la estabilidad de esos mutantes. En este sistema, el gen de la antitoxina fue fusionado al gen de la luciferasa (Luc- $\epsilon$ ) y el de la toxina al gen de la proteína verde fluorescente ( $\zeta$ -gfp). Como resultado, Luc- $\epsilon$  es capaz de transferir eficientemente energía al aceptor fluorescente  $\zeta$ -gfp, dando una alta señal de BRET. No obstante, cuando el residuo Asp18 de  $\zeta$  fue cambiado por una alanina ( $\zeta$ D18A), la interacción Luc- $\epsilon$ : $\zeta$ D18AK46A-GFP se vio fuertemente afectada, indicando que es esencial para la estabilidad del complejo TA. Con estos resultados hemos demostrado que es posible romper un modulo TA, ofreciendo una nueva diana para luchar contra las cepas resistentes a antibióticos.

## Descripción de nuevas especies de *Lactobacillus* y desarrollo de sondas específicas para la detección de microorganismos en vinos mediante un Nanochip

Rosario Mañes Lázaro

Directores: Isabel Pardo y Sergi Ferrer.

Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València.

El vino es el resultado de la multiplicación y del metabolismo de numerosos microorganismos a partir del zumo de uva. A lo largo del proceso de vinificación, podemos encontrar diversas especies de hongos, levaduras y bacterias. De entre estos tres grupos, los más importantes por los efectos que causan en el vino, son las levaduras, las bacterias lácticas (BAL) y las bacterias acéticas (BA). Las dos primeras pueden tener un efecto positivo o negativo en la calidad del producto final, mientras que las BA siempre juegan un papel negativo en el vino.

La correcta identificación de los microorganismos presentes durante la fermentación del mosto es importante, ya que generalmente, el efecto que producen en el vino suele ser dependiente de la especie, o incluso de la cepa de la que se trate. Por ello, se han desarrollado gran cantidad de técnicas de identificación con diferentes niveles resolutivos, que se han utilizado

para la caracterización de los microorganismos del vino.

En este trabajo se han caracterizado mediante una aproximación polifásica, una serie de BAL aisladas de vino y pertenecientes al género *Lactobacillus*, que han dado lugar a tres nuevas especies: *Lactobacillus bobalius*, *Lactobacillus uvarum* y *Lactobacillus oeni*, y a la descripción, por primera vez en vino, de *Lactobacillus satsumensis*.

También se ha diseñado una batería de sondas para la detección de los microorganismos presentes en vino mediante un Nanochip, incluyendo las nuevas especies. El Nanochip es un microchip electrónico que permite la detección directa de los microorganismos del vino, pese a ser un medio complejo y con gran cantidad de inhibidores, sin necesidad de cultivarlos. Para ello, es necesaria la extracción del ADN total del vino, y la posterior amplificación por PCR de los fragmentos con los que hibridan las sondas específicas diseñadas.

En esta tesis doctoral, se ha estudiado la evolución de las especies microbianas en vinos industriales mediante el Nanochip, y los resultados se han comparado con los obtenidos por otras técnicas moleculares (16S-ARDRA, ITS-RFLP y PCR específica) que implican el cultivo de los microorganismos.

Tras el análisis se observa que, generalmente, los mejores resultados se obtienen al combinar todas las técnicas empleadas. Sin embargo, la identificación de los microorganismos del vino con el Nanochip supone una interesante alternativa a otras técnicas moleculares de identificación que requieren del cultivo de los microorganismos. Las principales ventajas del Nanochip son su rapidez y su capacidad de detectar varios microorganismos en múltiples muestras al mismo tiempo. Estas ventajas suponen que se puedan adoptar tempranamente medidas de seguridad que eviten alteraciones antes de que la elevada concentración de microorganismos comprometa la calidad final del vino.

## Genes implicados en la variabilidad antigénica, la resistencia a antimicrobianos y la virulencia en *Streptococcus pyogenes* en España (1994-2006)

Virginia Rubio López

Director: **Juan Antonio Sáez Nieto**.  
Instituto de Salud Carlos III, Servicio de Bacteriología, Laboratorio de Taxonomía, Facultad de Ciencias biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

*Streptococcus pyogenes* (SGA) es el agente causal de una extensa variedad de cuadros clínicos, desde faringitis a infecciones invasivas graves. La incidencia de las enfermedades producidas por SGA experimentó una disminución en las últimas

décadas hasta 1980, año en el que comienza una reemergencia de enfermedades invasivas graves como fiebre reumática, fascitis necrotizante, síndrome de shock tóxico e incluso brotes epidémicos de escarlatina. También se ha observado un incremento en las tasas de resistencia a macrólidos y tetraciclina, antibióticos empleados como tratamiento alternativo a la penicilina.

El análisis de los cambios en la epidemiología y virulencia de las cepas circulantes de SGA es importante para reconocer y controlar este tipo de infecciones. En España existe poca información disponible sobre la epidemiología de las cepas circulantes a nivel global, de modo que el principal objetivo del estudio fue analizar la composición antigénica, resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia de 898 cepas españolas de SGA procedentes de 13 cuadros clínicos enviados por 75 laboratorios españoles entre 1994 y 2006.

Se caracterizaron el antígeno T, presente en la pared celular y el gen *emm* (proteína M), que codifica el principal factor de virulencia de SGA. La amplia diversidad de genes *emm* y antígenos T mostró 48 combinaciones *emm*-T, siendo las más frecuentes *emm*4T4, *emm*1T1, *emm*28T28, *emm*12T12 y *emm*6T6. Mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado se observó una elevada diversidad genética en la población estudiada, no obstante, se detectó cierta clonalidad en los serotipos *emm*1T1, *emm*3T (3-NT-3/13), *emm*11T11, *emm*77T28 y *emm*78T11.

Mediante 2 PCR múltiples se analizó la presencia de 10 genes que codifican toxinas estreptocócicas (*speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *ssa*, *smeZ*) en una selección de 686 cepas de SGA. Los genes de toxinas cuya codificación es cromosómica, *speB*, *speF* y *speG*, fueron detectados en la mayoría de las cepas mientras que los genes *speH* y *speI* fueron los menos frecuentes. Se identificó una gran variabilidad de perfiles toxigénicos (119), constituyendo los 10 más frecuentes el 53,6%. Determinados genes y perfiles de toxinas se observaron con serotipos concretos, demostrando que el perfil toxigénico de las cepas se asocia con el serotipo y no con el cuadro clínico producido.

El estudio de sensibilidad a antimicrobianos mostró tasas de resistencia a eritromicina del 32,8% y del 6,8% a tetraciclina.

La resistencia a eritromicina se debió a la prevalencia de algunos clones asociados con la misma: *emm*75T25, *emm*4T4, *emm*28T28, *emm*11T11, *emm*6T6 y *emm*12T12. El fenotipo M (76,9%), responsable de la resistencia mediante bomba de flujo, prevaleció sobre MLS<sub>B</sub> c (20,3%) y MLS<sub>B</sub> i (2,7%). Los genes de resistencia a macrólidos *mef*(A/E) y *msr*(D) fueron predominantes sobre *erm*(B) y *erm*(TR), así como la combinación *mef*(A/E) + *msr*(D).

*emm*77T28 (100%) y *emm*11T11 (50%) fueron los serotipos que mostraron mayor resistencia a tetraciclina. La presencia conjunta de los genes *tet*(M)+*tet*(O) fue predominante frente a *tet*(M) y *tet*(O) por separado.

El 2,1% de las cepas fueron co-resistentes a eritromicina y tetraciclina, destacando *emm*11T11 (45,8%). Todas las cepas presentaron el fenotipo MLS<sub>B</sub> de resistencia a macrólidos y al menos los genes *tet*(M)+*erm*(B).

## Vacunación gag/env frente al virus Maedi Visna y papel de las moléculas coestimuladoras B7 y el interferón gamma como adyuvantes inmunológicos

Ximena de Andrés Orbegozo

Directores: **Beatriz Amorena Zabalza y Damián de Andrés Cara**.  
Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra.

Los lentivirus de pequeños rumiantes, que incluyen el virus Maedi Visna (VMV) y el virus de la artritis encefalitis caprina, causan una infección crónica que evoluciona hacia una enfermedad con distintas formas clínicas y culmina con la muerte del animal. En la actualidad, los correspondientes métodos profilácticos y terapéuticos están en fase de desarrollo, entre ellos la vacunación. Este trabajo pretende contribuir a un mayor conocimiento sobre la forma de potenciar la respuesta inmune en la vacunación frente a este tipo de lentivirus y sobre estrategias de inmunización que permitan lograr, tras el desafío con el virus, un descenso de la infección o de las lesiones.

Para ello, se han propuesto y evaluado distintas estrategias de vacunación-desafío en ovinos, basadas en dos inmunizaciones por bombardeo epidérmico de plásmidos (pN3) con genes de *gag* y *env* de VMV, solos o en combinación, un recuerdo con un virus vaccinia Ankara modificado que expresa los correspondientes genes virales, y un desafío con la estirpe homóloga de VMV. Asimismo, se han incluido en la inmunización plásmidos con un gen de adyuvante inmunológico, el *IFN-γ* o el de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (CD80 solo y CD80 en combinación con CD86).

La inmunización epidérmica con el gen *gag* y/o el gen *env*, indujo la formación de respuesta tanto humoral como celular antes y después del desafío con el virus, pero la carga proviral sólo se vio reducida en el grupo inmunizado con "gag solo" en sangre, y en el grupo inmunizado con *gag* y *env* en el tejido linfóide, mientras que la inmunización con "env solo" no afectó a la carga proviral pero aumentó el desarrollo de lesión. La inclusión del gen del *IFN-γ* ovino en la inmunización no tuvo un gran efecto en la respuesta inmune, en la carga proviral o en el desarrollo de lesiones, a pesar de que indujo una disminución en la expresión de p25 en el pulmón. La inmunización en presencia de uno o ambos genes de las moléculas coestimuladoras, dio como resultado una activación específica de células T CD4+ y una producción específica de anticuerpos (antes y después del desafío, respectivamente), pero sólo el uso simultáneo de los genes de ambas moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en la inmunización con los genes *gag* y *env* del VMV, tuvo un efecto adyuvante, aumentando de forma transitoria la respuesta citotóxica específica tras la inmunización y reduciendo de forma significativa

la infección temprana tras el desafío con dicho virus, dando como resultado un 50% de protección en los animales vacunados con dichas moléculas. También originó unos cambios inmunológicos (lesiones leves) en órganos diana.

## Comprehensive analysis of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipA and LipC lipases

Cristina Bofill Bosch

Directora: **Pilar Díaz Lucea**

Departamento de Microbiología,  
Facultad de Biología, Universidad  
de Barcelona.

La tesis que lleva por título “Comprehensive analysis of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipA and LipC lipases” se enmarca en los objetivos generales de nuestro grupo de investigación, que consisten en el aislamiento, caracterización y producción de enzimas con interés biotecnológico. En este contexto, la presente tesis doctoral forma parte del proyecto global que tiene como objetivo el desarrollo alternativo de emulsionan-

tes poliméricos para ser utilizados en la industria alimentaria.

La cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. 42A2 transforma secuencialmente, por acción de varias enzimas, el ácido oleico en derivados hidroxilados, que serán polimerizados posteriormente por acción de una o varias lipasas en estólicidos (poliésteres de ácidos grasos con gran interés biotecnológico). Por ese motivo, la presente tesis doctoral se centró en el aislamiento, la clonación y la caracterización de las lipasas extracelulares LipA y LipC de la cepa *Pseudomonas* sp. 42A2. Incluyendo el análisis de la regulación génica de ambas enzimas y la optimización de sus propiedades bioquímicas mediante el uso de técnicas en evolución dirigida.

A partir del estudio del sistema lipolítico de la cepa *Pseudomonas* sp. 42A2 se identificaron y se aislaron dos genes codificantes *-lipA* y *-lipC-*. Ambos genes se clonaron en la propia cepa parental y se procedió a la purificación y caracterización de las dos lipasas. LipA y LipC presentaron diferentes propiedades bioquímicas y fisiológicas que les confieren distintos roles en la célula. Por un lado, LipA mostró un carácter mesófilo, preferencia por sustratos de cadena mediana e inhibición por la presencia de aceite de oliva. Por el contrario, LipC es una enzima psicrófila, con capacidad de adaptación a distintos sustratos en fun-

ción de cambios de temperatura, gran tolerancia a iones pesados y con activación en presencia de aceite de oliva. A parte, se estudió la producción de LipA y LipC de *Pseudomonas* sp. 42A2 en situación de estrés nutritivo, observando un incremento solo de la actividad de LipC. Ambas enzimas se clonaron en los huéspedes heterólogos *E. coli* y *Bacillus subtilis* juntamente con la chaperona LipH, necesaria para el correcto plegamiento de las dos proteínas y por lo tanto para obtener la forma enzimáticamente activa. Sin embargo, la actividad lipolítica detectada en los clones recombinantes obtenidos fue siempre mucho menor comparada con la actividad de la cepa parental. Siendo necesario la clonación de los dos genes por separado (lipasa/foldasa) y realizar el plegamiento de la enzima *in vitro*. Para intentar mejorar la clonación de LipA en huéspedes heterólogos, se procedió a la obtención de una variante de LipA independiente de foldasa mediante técnicas de evolución dirigida. Sin embargo, las distintas técnicas empleadas no fueron suficientes para obtener dicha variante, significando que LipA presenta una elevada especificidad y necesidad de LipH. A parte, se realizó la mejora de la termoestabilidad de LipC mediante diseño racional y evolución dirigida, obteniendo 10 potenciales variantes enzimáticas con más resistencia a la temperatura que la enzima parental.

## Socios colaboradores de los Grupos Especializados de la SEM:

- **AGBAR, S.A.**
- **BIOETANOL GALICIA**
- **EMASA**
- **EMASESA**
- **Gamaser, S.L.**
- **Iberdrola, S.A.**
- **Instituto Tecnológico Agroalimentario**
- **Iproma, S.L.**
- **Laboratorios Microkit S.L.**
- **Laboratorio Municipal de Vigo**
- **Millipore Ibérica, S.A.**
- **THOR Especialidades, S.A.**

## 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
- Bordes Benitez, Ana
- Fernández Orts, Eva María
- Jorge Blanco, José Carmelo
- Lafarga Capuz, Bernardo
- López Ponce, Francisco José
- Medieros Almendros, Jesús
- Miranda Casas, Consuelo
- Rubio Vallejo, Manuel Fco.
- Sesma Bea, Begonia
- 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)).