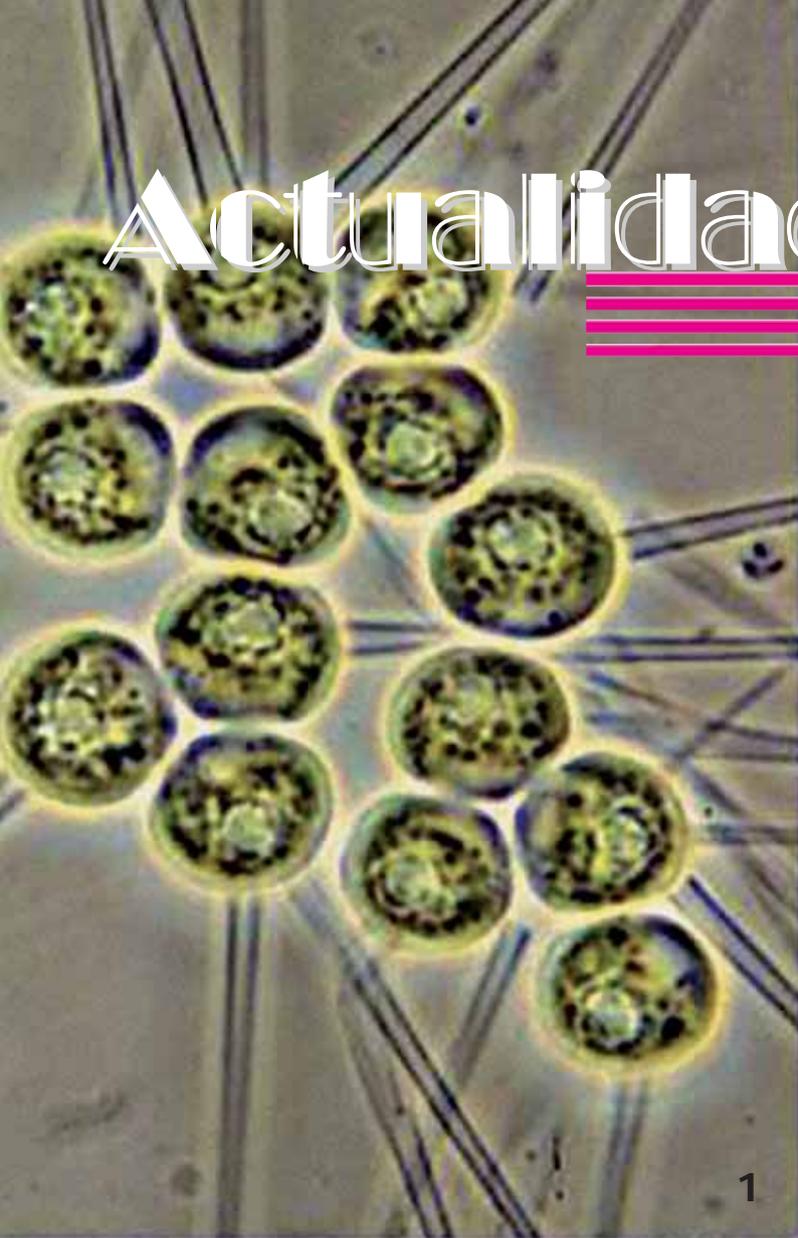


Actualidad



SEM



1



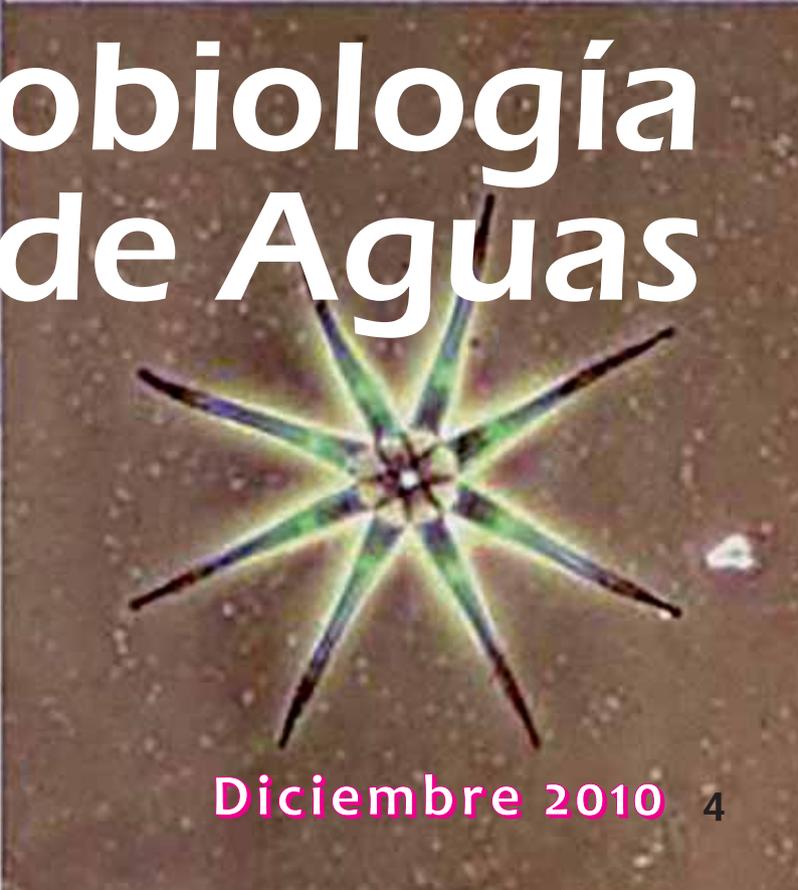
2

Microbiología de Aguas



Número 50

3



Diciembre 2010

4

XIV Premio BIANUAL "Jaime Ferrán"



Se convoca la 14ª edición de este Premio, dotado con 2.000 €, y que conlleva la Conferencia de Clausura del XXIII Congreso Nacional de Microbiología (Salamanca, julio de 2011).

Todos los socios están invitados a enviar propuestas de candidatos que reúnan las siguientes condiciones: ser un científico destacado en el campo de la Microbiología, nacido con posterioridad al 31 de diciembre de 1969 y socio de la SEM desde al menos el año 2003.

Las candidaturas deben remitirse a la SEM (Vitrubio 8, 28006 Madrid) adjuntando un breve *curriculum vitae*. Un jurado nombrado por la Junta Directiva efectuará la selección, al menos cuatro meses antes de la celebración.

Fecha límite de recepción de candidaturas: **28 de febrero de 2011**.

Bases y documento de propuesta: www.semico.es/sec/premios.php

V Premio de fotografía en Microbiología Federico Uruburu



La quinta edición de este premio se fallará durante la celebración del XXIII Congreso Nacional de Microbiología - SEM 2011.

Bases del concurso:

- Podrán participar todas las personas interesadas en el tema inscritas en el XXIII Congreso Nacional de Microbiología de la SEM (Salamanca, julio de 2011).
- Las fotografías se ajustarán al formato 18x24 cm. La fotografía tendrá que presentarse sobre cartulina que le sobrepase 3 cm alrededor.
- El tema deberá ser inédito y estar relacionado con la Microbiología.
- La fotografía se presentará bajo un pseudónimo en un sobre cerrado junto con otro con los datos del autor: nombre, apellidos, número del DNI, domicilio y teléfono de contacto.
- Cada autor podrá concursar con un máximo de 3 fotografías.
- Los originales deberán remitirse a la Secretaría del XXIII Congreso Nacional de la SEM:

Secretaría del XXIII Congreso de la SEM
Departamento de Microbiología y Genética
Plaza de Doctores de la Reina s/n
Universidad de Salamanca
37007 Salamanca

- El plazo para la recepción de fotografías concluirá el día de la inauguración del XXIII Congreso Nacional de Microbiología de la SEM (14 de julio de 2011).
- Se otorgará un único premio consistente en una cámara de fotos digital.
- Cada obra deberá llevar un título expreso, marcado en el pie de la fotografía, y una nota breve explicativa de su contenido, que no excederá de cincuenta palabras.
- Las obras presentadas a concurso quedarán expuestas durante el transcurso del XXIII Congreso Nacional de Microbiología de la SEM.
- La elección de la obra galardonada se efectuará por votación popular entre los asistentes al XXIII Congreso Nacional de Microbiología de la SEM. Durante su celebración, se comunicará debidamente a los congresistas el lugar y forma de realizar la votación.
- Las obras presentadas al concurso quedarán en propiedad de la Sociedad Española de Microbiología para su uso con fines divulgativos y siempre citando al autor.
- La organización exime su responsabilidad en cuanto al desperfecto o extravío de originales.
- La organización rechazará las obras que no cumplan los requisitos anteriormente expuestos.
- La participación en este concurso supone la total aceptación de estas bases.

FOTO DE PORTADA: Estructuras espiniformes como estrategia de defensa frente a la ingestión microbiana. En el mundo microscópico de las aguas, las defensas contra el herbivorismo y el bacterivorismo muestran estrategias convergentes que evitan la ingestión por microorganismos del zooplancton (nanoflagelados, ciliados, rotíferos, crustáceos, etc). Estas adaptaciones se manifiestan tanto por la posesión de espinas proteicas en algunas bacterias del plancton, en este caso de agua dulce (1= célula entera, 3 = detalle de espinas con sus subunidades proteicas), como de celulosa en el caso de la microalga *Micractinium pusillum* (2), o también por la formación de colonias asteriformes como en *Actinastrum gracillimum*, otra microalga de aguas dulces eutrofizadas. 1 y 3: microscopía de contraste de fase; 2 y 4 microscopía electrónica de transmisión y tinción con acetato de uranilo. (Originales de F. Torrella).

SUMARIO



Visite la página web
de la SEM:

www.semico.es

Encontrará información
actualizada sobre
congresos, reuniones,
cursos y becas

Socios protectores de la SEM:

Francisco Soria Melguizo, S.A.



Fundación Medina



Para solicitar más información,
inscripciones o publicidad,
diríjase a la Secretaría de la

Sociedad Española de Microbiología

Vitruvio, 8 - 28006 Madrid
Tel.: 915 613 381
Fax: 915 613 299

secretaria.sem@semico.es

Actualidad SEM

Número 50
Diciembre 2010

Informes de los grupos	2
Editorial: "Microbiología en las dos orillas"	3
<i>Ricardo Guerrero</i>	
Tesis doctorales	4
Juan Marzoa Fandiño, Lucía Blasco Escrivá, Elena Castellanos Rizardos, Laura Vinué Santolalla, Francisco Javier Pascual Martínez, Héctor David de Paz Fernández	
Socios que deberían actualizar datos	6
Nuevos socios de la SEM	9
Especial «Microbiología de las aguas»	
Historia del Grupo de Microbiología del Medio Acuático	7
<i>Juan Iriberry, Albert Bosch y Juan J. Borrego</i>	
Comunidades microbianas en sistemas acuáticos naturales	10
<i>Itxaso Artolozaga, Begoña Ayo, Iñigo Azúa, Marian Unanue y Juan Iriberry</i>	
Grupo de Ecología Microbiana Molecular	13
<i>Instituto de Ecología Acuática, Universidad de Girona</i>	
Virus entéricos, UB	15
<i>Albert Bosch Navarro y Rosa M. Pintó Solé</i>	
Grupo de Investigación MARS	19
<i>Dpto. de Microbiología, Universidad de Barcelona</i>	
Indicadores de contaminación microbiológica en agua. Taxonomía y epidemiología de los géneros "Aeromonas" y "Arcobacter"	21
<i>María José Figueras Salvat y Roxana Beaz Hidalgo</i>	
Microbiología de los ambientes acuáticos hipersalinos	24
<i>Antonio Ventosa</i>	
Microbiota de moluscos	26
<i>Jesús López Romalde</i>	
Patología bacteriana en acuicultura	29
<i>Alicia Estévez-Toranzo</i>	
Virus de salmónidos y vacunas DNA	32
<i>Sylvia Rodríguez Saint-Jean y Sara Isabel Pérez Prieto</i>	
Grupo de Patología Viral en Acuicultura	34
<i>Carlos P. Dopazo, Isabel Bandín</i>	
Patógenos de animales acuáticos de interés en salud pública y acuicultura	36
<i>Carmen Amaro González</i>	
Patología de especies acuícolas cultivadas	39
<i>Dolores Castro</i>	
Cine y Microbiología	
El microbio es la estrella: una guía de películas para el microbiólogo	42
<i>Manuel Sánchez</i>	
Cursos	
XIV Curso de Iniciación a la Microbiología	47
<i>Juan Ignacio Reguera Useros y David Rodríguez Lázaro</i>	

Biología de Microorganismos Patógenos

Presidente: **Ernesto García**

El pasado mes de julio tuvo lugar en Ávila el III Congreso del Grupo especializado en Microbiología Clínica (GEMC). Durante el transcurso del mismo se celebró una reunión de los miembros del GEMC y, tras una amplia discusión, se llegó al acuerdo de que, atendiendo a las líneas de investigación que se llevan a cabo actualmente por los miembros del GE, resultaba muy conveniente un cambio en la denominación del mismo. Asimismo, se decidió someter varios nombres a la consideración de los miembros del Grupo para que la decisión final contara con el mayor respaldo posible.

Una vez realizado el recuento de votos entra las diferentes denominaciones propuestas, se acordó modificar la denominación del GE el cual, a partir de ahora y previa comunicación a la Junta de Gobierno de la SEM, pasa a denominarse Grupo Especializado en Biología de Microorganismos Patógenos (GEBMP).

Protistología

Presidenta: **Ana Martín-González**

VI European Congress of Protistology

El próximo mes de julio (25-29) de 2011 se celebra el VI European Congress of Protistology, organizado por el Profesor K. Häusmann, que tendrá

lugar en la ciudad de Berlín. Aunque todavía no existe un programa científico definitivo, está prevista una sesión especial sobre "Conceptos de Protistología", en la que se discutirá, entre otros temas de gran interés, el concepto de especie. Asimismo, en dicho congreso se incluye un simposium dedicado al Profesor Dr. Miklos Müller (Rockefeller University, Nueva York), descubridor de los hidrogenosomas. Para más información, consultar la página Web: <http://www.ecop2011.org/>.

Otra noticia relacionada con nuestro grupo es que nuestro compañero el Dr. Juan Carlos Gutiérrez (Dpto. Microbiología-III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid), ha sido elegido miembro electo del Nominating Committee de la ISOP (International Society of Protistologists). Desde aquí, le deseamos suerte en su futura labor dentro del comité de dirección de esta sociedad.

La página Web del grupo está actualmente en proceso de elaboración y esperamos que esté disponible para el próximo año.

Microbiología de los alimentos

Presidenta: **Francisco Javier
Carballo**

Renovación parcial de la Junta Directiva del Grupo de Microbiología de los Alimentos

Durante la celebración del XVII Congreso Nacional de Microbiología

de los Alimentos (Valladolid, 19-22 de septiembre de 2010) tuvieron lugar las elecciones para la renovación parcial de la Junta Directiva del Grupo. Deja su cargo la Dra. Margarita Medina Fernández-Regatillo, tras 8 años de Secretaría (1994-2002) y 8 de Vicepresidenta (2002-2010). Dejan también sus cargos, tras 8 años de permanencia en los mismos (2002-2010), la Dra. Marta Hugas Maurici (Vocal) y el Dr. Juan Miguel Rodríguez Gómez (Secretario). El Grupo agradece sinceramente la valiosísima aportación de todos ellos durante estos años.

En su lugar fueron elegidos los Drs. Gonzalo García de Fernando Minguillón, de la Universidad Complutense de Madrid (Vicepresidente), Santiago Condón Usón, de la Universidad de Zaragoza (Vocal) y Antonia María Picón Gálvez, del INIA (Secretaria). Igualmente, fueron reelegidos en sus cargos de Vocales los Drs. José Fernández-Salguero Carretero, de la Universidad de Córdoba, y David Rodríguez Lázaro, del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL).

XVIII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

El próximo Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos tendrá lugar D.m., en fechas todavía por determinar, en Logroño, en el año 2012. Correrá la presidencia de la organización a cargo de la Dra. Doña María Elena González Fandos, Catedrática de Universidad del Área de Tecnología de Alimentos de la Universidad de La Rioja.

Actualidad SEM es una publicación semestral de la **Sociedad Española de Microbiología (SEM)**

Director: **Federico Navarro-García**. E-mail: fnavarro@farm.ucm.es

Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Universidad Complutense. 28040 Madrid.

Webmaster de la SEM: **Jordi Urmeneta Masó**. E-mail: jurmeneta@ub.edu

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal, 645. E-08028 Barcelona.

La SEM y el Director no comparten necesariamente las opiniones que puedan aparecer en artículos, informaciones o cartas enviados por los socios, ni se responsabilizan de su veracidad.

ISSN: 1888-5500

Depósito Legal: 36180-1986

Maquetación e Impresión: **Diseño y Control Gráfico, S.L.** Tel.: 91 731 05 13. E-mail: info.dcg@design2aa.com

www.semico.es/sec/ActualidadSEM.php

Microbiología en las dos orillas

Ricardo Guerrero
Presidente de la SEM

La microbiología está en constante evolución y expansión, ambas producidas tanto por el ingenio de los investigadores como por la continua aparición de nuevas tecnologías. Las nuevas observaciones inducen -en las mentes preparadas, como diría Pasteur- nuevas ideas. Y son las nuevas ideas las que impulsan la renovación y mejora de las técnicas. Es, efectivamente, un “círculo virtuoso”, que hace avanzar la ciencia mediante la continua interacción entre hechos e ideas. El progreso de la ciencia, por otra parte, no es un hecho aislado o unipersonal, sino que necesita el esfuerzo colaborador de muchas personas, entre las cuales las más jóvenes aportan la garantía de que el esfuerzo y el progreso van a continuar en los años venideros. Por ello, uno de los principales retos actuales de la ciencia es proporcionar una formación adecuada para forjar la próxima generación de investigadores.

Más del 80% de la población mundial vive en países en vías de desarrollo, pero el porcentaje de investigadores que trabajan en estos países es sólo un 30% del total en el mundo. Un buen número de esos países están en una región del mundo que España y Portugal no pueden olvidar: Latinoamérica. Es importante saber que la calidad de la ciencia desarrollada en los centros de investigación en Latinoamérica ha mejorado notablemente en los últimos años. También ha aumentado significativamente el número de estudiantes latinoamericanos van al extranjero para completar su formación. El primer destino elegido por los jóvenes investigadores es Estados Unidos, seguido de lejos por España y por otros países europeos o latinoamericanos [C. Chica, N. Skinner, *Int. Microbiol.* 13:159-164 (2010), http://www.im.microbios.org/1303/IM1303_0159.pdf]. Latinoamérica tiene una sólida tradición en la investigación en microbiología clínica y ambiental. Varias de las enfermedades tropicales prevaletentes en la región fueron descubiertas por investigadores de los respectivos países. Algunos de ellos son conocidos en todo el mundo, como Carlos Chagas (1879-1934), de Brasil, que descubrió la tripanosomiasis o enfermedad de Chagas, o el cubano Carlos Finlay, que describió el papel que tenía el mosquito en la transmisión de la fiebre amarilla. Otros, en cambio, apenas son conocidos fuera de sus fronteras. Es el caso de Rodolfo Robles (1878-1939), de Guatemala, que definió los caracteres esenciales de la oncocercosis humana (entre ellos, la ceguera), en tiempos en los que los investigadores de los países desarrollados consideraban esa infección una enfermedad dermatológica de escaso interés médico. También el del sacrificado estudiante de medicina peruano Daniel Carrión (1857-1885), que descubrió la enfermedad de Carrión o bartonelosis. O el de Eugenio Espejo (1747-1795), del actual Ecuador, que pensaba —algunos años antes que Jenner, y casi cien años antes que Pasteur y Koch— que la viruela estaba causada por unos “atomillos vivientes” [véase la sección Pioneros de la Microbiología en nuestra web: <http://www.semicrobiologia.org/sec/pioneros.php>].

La historia de la ciencia en Latinoamérica sigue una trayectoria que se ha fortalecido a través del tiempo por tres elementos principales: las sociedades científicas, las revistas científicas, y la cooperación e interacción entre colegas de todo el mundo. Estos tres elementos constituyen un mecanismo eficaz para promover la ciencia y el desarrollo en general. Sin embargo, las adversas “circunstancias” políticas y económicas, que suelen coincidir, han tenido efectos nocivos sobre el avance de la ciencia latinoamericana y, por tanto, en sus resultados. En tiempos de crisis, en muchos países, entre los que se encuentra España, los fondos destinados a la ciencia son los primeros que se recortan. Curiosamente, en los países más desarrollados del mundo se hace lo contrario. Podríamos preguntarnos si hay alguna relación de causa-efecto, en ambos sentidos. Las consecuencias son graves a medio y largo plazo, ya que la recuperación del progreso científico y tecnológico para alcanzar el estado de desarrollo de otros países que sí han mantenido el ritmo de inversión en ciencia puede costar otros “cien años de soledad”.

Diversos países de Latinoamérica, más España y Portugal, forman la Asociación Latinoamericana de Microbiología, la ALAM. Los fines de la ALAM son: (a) organizar y dar continuidad a los congresos de microbiología de Latinoamérica, (b) mantener las relaciones con las sociedades de microbiología de otros países, (c) crear o estimular la formación de otras sociedades de la microbiología en aquellos países que no la tengan, (d) promocionar el intercambio científico a escala internacional, y (e) difundir los conocimientos científicos en el campo de la microbiología a través de congresos nacionales y publicaciones científicas [C. Chica *Int. Microbiol.* 11:221-225 (2008) http://www.im.microbios.org/1103/IM1103_0221.pdf].

Montevideo, la capital de Uruguay, ha sido la sede del XX Congreso Latinoamericano de Microbiología [<http://www.alam2010.org.uy>] que se ha celebrado del 27 al 30 septiembre de este año. Participaron más de 40 reconocidos investigadores de países latinoamericanos, EE.UU. y Europa (España, Portugal, Francia, Holanda y Reino Unido). La continuidad de los congresos ALAM es de gran importancia, ya que ofrecen una oportunidad única para promover el intercambio científico y la comunicación entre microbiólogos de profesión y para atraer el interés y la curiosidad de los jóvenes, fomentando su participación en esta disciplina. En esta edición se ha batido un récord, con más de 1000 inscripciones. El próximo tendrá lugar en Santos (Brasil) en 2012, y promete ser aún más numeroso.

No por verdadero deja de ser un tópico decir que Latinoamérica “tiene un gran futuro”. Y lo venimos oyendo desde hace muchos años. Creemos que algunos países de “la otra orilla” han hecho ya presente ese futuro, y esperamos no sólo presenciar sino también contribuir a que el resto llegue al mismo destino.

Complejos proteicos de membrana externa de *Neisseria meningitidis*: análisis estructural y capacidad antigénica

Juan Marzoa Fandiño

Directores: **Carlos M^a Ferreirós Domínguez y Sandra Sánchez Poza.**

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela.

La infección meningocócica es un importante problema de salud mundial. De los principales serogrupos patogénicos (A, B, C, Y y W135), el serogrupo B es el único que no dispone de una vacuna eficaz y de amplia cobertura.

Los objetivos planteados en esta tesis fueron realizar un estudio del complexoma de membrana externa de *N. meningitidis*, caracterizar los complejos proteicos más relevantes y analizar sus características antigénicas sin alterar su estructura nativa y, de este modo, la de los epitopos conformacionales que a menudo no son contemplados por la metodología clásica. Finalmente se evaluó el interés de los complejos proteicos estudiados como antígenos vacunales.

Para el análisis del complexoma de la membrana externa del meningococo hemos utilizado una técnica electroforética de reciente publicación, especialmente desarrollada para el estudio de complejos proteicos, denominada *high resolution Clear Native Electrophoresis* (hrCNE). Mediante espectrometría de masas y técnicas electroforéticas bidimensionales derivadas de la hrCNE, caracterizamos la composición de los principales complejos proteicos. Con el fin de analizar la funcionalidad de los anticuerpos generados contra los complejos proteicos purificados y contra vesículas de membrana externa, se realizaron los ensayos de actividad bactericida del suero, unión de anticuerpos a la superficie bacteriana, deposición del componente del complemento C3b, deposición del componente del complejo de ataque a membrana, y actividad opsonofagocítica del suero.

El análisis proteómico reveló la presencia de 12 complejos proteicos mayoritarios. Tres de estos complejos son asociaciones homoméricas de las proteínas chaperonina de 60 kDa, glutamina sintetasa y cetol-ácido reductoisomerasa, y nueve son complejos de porinas, correspondientes a homómeros de la porina PorB y tres tipos de asociaciones heteroméricas de las porinas PorA y PorB, y las proteína RmpM: PorA/PorB, PorB/RmpM y PorA/PorB/RmpM. En menor proporción también se detectaron homómeros de PorA y complejos de alto peso molecular formados por PorA/PorB/RmpM/MIP. La utilización de cepas mutantes nos permitió también confirmar el papel crucial de la PorB en el mantenimiento de la integridad de los complejos de porinas.

Del total de complejos detectados se obtuvieron cinco sueros de ratón anti-complejos: el suero anti-CxChap, obtenido tras la inmunización con el complejo de la chaperonina de 60 kDa, y los sueros anti-CxABR, anti-CxBR y anti-CxAB, anti-CxB, obtenidos tras la inmunización con los

complejos formados por PorA/PorB/RmpM, PorB/RmpM y PorA/PorB y PorB respectivamente. Del mismo modo se obtuvieron sueros inmunes contra OMVs salvajes y defectivas en las proteínas PorA, PorB, RmpM o FetA.

Todos los complejos purificados resultaron accesibles en superficie e indujeron respuestas que promueven la deposición del componente del complemento C3b, la formación del complejo de ataque a membrana y la actividad bactericida. La escasa reactividad cruzada de los sueros anti-complejos de porinas reduce su interés vacunal a la protección frente a la cepa homóloga. Sin embargo, la alta reactividad cruzada del suero anti-CxChap mostrada en los ensayos de unión de anticuerpos a superficie, deposición de C3b, deposición de MAC y actividad opsonofagocítica sugiere que las proteínas chaperonina de 60 kDa y la proteína MIP (co-purificada con el complejo CxChap) pueden ser antígenos con gran interés como componentes vacunales.

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

Lucía Blasco Escrivá

Directores: **Isabel Pardo Cubillos y Sergi Ferrer Soler.**

Centro de realización: Dpt. de Microbiología i Ecologia, Fac. Ciències Biològiques, Universitat de València. Centro de presentación: 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.

Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates. Epidemiological distribution in Spain

Elena Castellanos Rizaldos

Directores: **Alicia Aranaz Martín, Lucas Domínguez Rodríguez y Lucía de Juan Ferré.**

Centro de realización: Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) y Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Centro de presentación: Facultad de Veterinaria de Madrid, Universidad Complutense de Madrid, España.

The etiological agent of paratuberculosis or Johne's disease is *M. a. paratuberculosis*. This agent has been divided into three groups by traditional molecular techniques; type I (or "ovine"), type II ("bovine") and type III ("intermediate"). Nonetheless, there are some isolates (especially the most slow-growing phenotypes) that are not typable by these techniques due to DNA quality and quantity requirements. Therefore, we began designing different PCR-based techniques to amplify certain genes and target regions, which were then sequenced to detect possible type-specific differences at the nucleotide level. From these genes, *gyrA*, *gyrB*, *inh-A* and IS900, presented SNPs that were type-specific (I, II and III). At the same time, SNPs present in the *gyrB* and *inh-A* genes in type III strains revealed recognition sites for the restriction enzymes *Hpy188III* and *SinI*. The enzymatic digestion of type III strains products (at that moment only distinguishable from type I strains by PFGE and RFLP-IS900) resulted in different patterns from those of type I and II.

Moreover, we performed a genomic hybridization comparison using microarray on a selection of *M. a. paratuberculosis* isolates obtained from Spain and representing the three types. In this study it was found that *M. a. paratuberculosis* types I and III showed 62 ORFs homologous to *M. a. hominissuis* 104 genome but divergent from the *M. a. paratuberculosis* K-10 genome. In addition, the comparison of types I and III strains with the *M. a. paratuberculosis* K-10 genome revealed deletions of two ORFs in the type I strains analyzed and seven ORFs in the type III strains. This previous data served to optimize PCR-based techniques directed to types I and III specific genomic regions, and constituted another technique to differentiate between these two types. Furthermore, we accomplished a novel molecular approach derived from real time PCR principles and the analysis of differences in melting curves. This technique was able to type *M. a. paratuberculosis* isolates in 1 hour and 30 minutes. Complimentary to this study we also applied these principles to discriminate between MAC members with envi-

ronmental and clinical relevance, especially in the case of immunocompromised patients.

In addition to this, the different outbreaks of paratuberculosis that occur worldwide and the need to establish links between them have created a demand for a rapid molecular technique able to subtype within the *M. a. paratuberculosis* types. For this reason, we analyzed different MIRU-VNTR loci in a panel of *M. a. paratuberculosis* isolates of Spanish origin. Consequently, we described a novel locus (VNTR-259) and proposed the standardization of the interpretation of the results in terms of numbers of copies from agarose gels. The combination of loci used in the study (MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32 and VNTR-259) yielded an index of discrimination HGDI of 0.84. Moreover, this technique was applied for the first time in Spain in other members of MAC different from *M. a. paratuberculosis*, such as *M. a. avium* recovered from birds of prey.

To conclude, the development of these new approaches resulted in the identification, characterization and description of novel type II strains of *M. a. paratuberculosis* from Spanish origin, sampled from Guadarrama goats. These strains revealed a novel deletion of 16 Kb. Included within this deletion, virulence-related operons were identified, such as the mammalian cell entry genes or *mce* among others. The overall result of this study ended in the description of the first natural *mce* mutant strain of *M. a. paratuberculosis* ever reported. The importance of this deletion, that contains different virulence genes was determined by *in vitro* infections in four cell lines (MOCL-4, BOMAC, THP-1 and CACO-2) and quantitative amplification of pre-rRNA 16S gene. Afterwards, the differential regulation of the genes within the 16 Kb region was evaluated by the analysis of the transcriptome of *M. a. paratuberculosis* K-10 (reference strain) after *in vitro* infections in THP-1 and MOCL-4 cell lines.

Prevalencia y diversidad de integrones en cepas clínicas y comensales de *Escherichia coli*
Prevalence and diversity of integrons in clinical and commensal *Escherichia coli* strains

Laura Vinué Santolalla

Directora: **Carmen Torres Manrique**
Área de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Rioja.

Un integrón es un sistema de recombinación sitio-específico capaz de integrar y expresar genes *cassettes*. Existen cinco clases de integrones que contienen genes *cassettes* de resistencia a antibióticos, siendo los de clase 1 los más frecuentes. Estos se caracterizan por presentar una secuencia conservada en el extremo 5' (5'-CS) y otra en el extremo 3' (3'-CS) formada por un gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternarios (*qacEΔ1*) y un gen de resistencia a sulfamidas (*sul1*).

En esta tesis se estudió en primer lugar la prevalencia y diversidad de integrones en cepas clínicas (hemocultivos) y comensales (heces de personas sanas) de *E. coli*. Se detectaron integrones en el 40% y 29% de las cepas clínicas y comensales, respectivamente. En las cepas clínicas/comensales se detectaron integrones de clase 1 (38.5%/26%), de clase 2 (0.7%/1%) y de clase 1 y 2 (0.7%/2%). Se obtuvo una mayor diversidad de combinaciones de genes *cassettes* en la región variable de integrones de clase 1 en las cepas clínicas (n=11) que en las cepas comensales (n=4). El 32% de los integrones de clase 1 de las cepas de hemocultivos y el 14.3% de los de las cepas comensales carecían de la región 3'-CS, detectándose ocho combinaciones diferentes de genes *cassettes* y cuatro estructuras asociadas con *sul3*, una de ellas nueva incluida en el GenBank (FJ587511). Todos los integrones de clase 2 presentaron la composición de genes *dfrA1* + *sat* + *aadA1*.

Posteriormente se estudió el entorno genético de los genes de resistencia a sulfamidas (*sul*) en las cepas de hemocultivos resistentes a sulfamidas (SUL^R). Así, 63 de las 71 cepas SUL^R contenían genes *sul* y se encontró *sul1* asociado a integrones de clase 1 en el 85.7% de las cepas con este gen, *sul3* a integrones no clásicos carentes de la región 3'-CS en el 71.4% de las cepas y *sul2* en el 91.4% de las cepas fue asociado con *strA-strB*, detectándose once estructuras diferentes y una de ellas nueva con el gen *strB* truncado por IS150 (GenBank FJ705354).

A continuación, se realizó la detección y caracterización de betalactamasas de espectro expandido (BLEEs) en cepas de *E. coli* clínicas y comensales de personas sanas y se determinó su entorno genético y su posible relación con integrones. Se estudiaron 56 cepas clínicas portadoras de BLEEs, detectándose los siguientes genes (numero de cepas): *bla*_{CTX-M-14a} (29), *bla*_{CTX-M-9} (9), *bla*_{CTX-M-15} (1), *bla*_{CTX-M-32} (2), *bla*_{SHV-12} (12), *bla*_{SHV-2} (1), *bla*_{TEM-52} (1) y el gen que codifica una nueva β-lactamasa SHV-102, incluido en GenBank (EU024485). Asimismo se detectaron cepas portadoras de BLEEs en 7 de las 105 muestras fecales de personas sanas estudiadas (6.6%), identificándose los genes (número de cepas): *bla*_{CTX-M-14a} (1), *bla*_{CTX-M-14b} (1), *bla*_{CTX-M-1} (2), *bla*_{CTX-M-32} (1), *bla*_{CTX-M-8} (1) y *bla*_{TEM-52} (1). Los genes *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-14b} fueron identificados en la estructura del integrón In60. Se detectaron integrones de clase 1 en el 60.7% de las cepas clínicas BLEE-positivas y en dos de las siete cepas comensales, obteniendo un total de siete combinaciones de genes *cassettes* diferentes. Cinco cepas clínicas y comensales con integrones de clase 1, presentaron la estructura no clásica, carente de la región 3'-CS y en una cepa se detectó un integrón de clase 1 relacionado con *sul3* con una estructura no descrita previamente que incluía una secuencia de inserción IS1294 truncando el gen *cmlA1* (GenBank EU704128).

Se comprobó en 7 cepas que los determinantes genéticos de integrones carentes de 3'-CS y relacionados con *sul3* se encontraban localizados en plásmidos (rango <48 a 150 Kb), transferibles por transformación en algunas cepas y se identificó el plásmido InCh1 en una de ellas. Asimismo se realizó la caracterización de los plásmidos portadores de genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-32}, encontrándose dichos genes mayoritariamente en plásmidos de tipo IncN.

Se realizó la caracterización de la variante del promotor de los genes *cassettes* de los integrones de clase 1 en 42 integrones (de 41 cepas clínicas y comensales). Se detectaron cuatro variantes de promotores (PcW, Pch1, PcW_{TGN-10} y PcS). El promotor PcW se encontró unido a otro promotor P2 en algunos casos. La frecuencia de detección de dichas variantes estuvo en relación inversa con la fuerza de dichos promotores, de modo que los porcentajes detectados fueron (de débil a fuerte): PcW (40.5%), Pch1 (33.3%), PcW + P2 (14.3%), PcW_{TGN-10} (9.5%), y PcS (2.4%).

Por último, se analizó la estabilidad del integrón de clase 1 carente de la región 3'-CS en ausencia de presión antibiótica selectiva en 3 de las cepas, observándose comportamientos diferentes. En uno de los casos se produjo la pérdida del integrón y del plásmido que lo portaba (con las resistencias asociadas) al cabo de 75 pases en medio sin antibiótico.

Taxonomía molecular del clado central del género *Vibrio* y otras *Vibrionaceae*

Francisco Javier Pascual Martínez

Directores: **M^a Jesús Pujalte Domarco, M^a Carmen Macián Rovira y David Ruiz Arahal.**

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Departamento de Microbiología, y Ecología y Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia.

Se ha evaluado la utilidad de diferentes técnicas de tipificación molecular así como el Multilocus Sequence Analysis (MLSA), para la clasificación de las especies del clado central del género *Vibrio*.

Se han estudiado 85 aislados, identificados fenotípicamente como *Vibrio harveyi*, junto con las cepas tipo y de referencia de las 6 especies del clado central. Entre las técnicas de tipificación molecular se han analizado Rep PCR (GTG)₅, RAPD M13, RAPD T7, ISR 16S-23S, así como la combinación de las tres primeras técnicas ("gel combinado"). Posteriormente, se ha corroborado la identidad de cepas representativas de los diferentes grupos formados con la técnica "gel combinado" mediante el MLSA utilizando los genes 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *gyrB*, *rpoD*, *rctB* y *toxR*, tanto de manera individual como concatenando sus secuencias. Finalmente, para confirmar la identidad correcta de los aislados se ha aplicado la hibridación DNA-DNA en una serie de cepas representativas de los diferentes clados obtenidos en el estudio de MLSA, evaluando su correlación respecto a los resultados del MLSA y el "gel combinado".

El análisis de los 7 genes concatenados ha mostrado ser una herramienta óptima para la clasificación y análisis filogenético de los vibrios del clado central. Las secuencias génicas individuales de *rpoD*, *rctB* y *toxR* han mostrado un resultado

satisfactorio, a diferencia de los genes 16S rRNA, *recA*, *pyrH* y *gyrB*. La concatenación de los tres genes más resolutivos (*rpoD*, *rctB* y *toxR*) ha permitido una perfecta definición de las seis especies, lo que permite minimizar el número de genes a secuenciar con fines identificativos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la técnica hibridación DNA-DNA y MLSA, se ha concluido que ninguna técnica de tipificación molecular por separado ha permitido la correcta clasificación y diferenciación de las seis especies, mientras que la combinación de técnicas, si bien mejora los resultados individuales, no diferencia entre *V. campbellii* y *V. rotiferianus*. Además los resultados han mostrado que parte de las cepas identificadas fenotípicamente como *V. harveyi* han resultado ser *V. rotiferianus*.

Empleando la técnica de MLSA, integrada en un estudio polifásico, se ha esclarecido la posición taxonómica de un conjunto de once *Enterovibrio* sp., así como de *Vibrio calviensis* DSM 14347^T. Los resultados han mostrado que (i) tres de las cepas en estudio constituyen una nueva especie del género *Enterovibrio*, para la que se propone el nombre de *E. nigricans* sp. nov. (CECT 7320^T); (ii) las restantes cepas son *E. corallii* (primer aislamiento de esta especie a partir de peces); (iii) *V. calviensis* DSM 14347^T debe ser reclasificada como

una especie del género *Enterovibrio*, *E. calviensis* comb. nov.; y (iv) es necesario enmendar la descripción del género *Enterovibrio*.

Estudio comparativo de sistemas de secreción Tipo IV implicados en transferencia conjugativa de DNA y virulencia bacteriana

Héctor David de Paz Fernández

Directora: **Matxalen Llosa Blas**.
Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria.

Los sistemas de secreción Tipo IV (T4SS) se encuentran ampliamente distribuidos entre las bacterias, donde presentan roles biológicos muy diferentes a pesar de la gran homología que que comparten entre sí, estando involucrados en procesos como conjugación bacteriana o virulencia.

En este trabajo, el estudio de dos T4SS implicados en transferencia de DNA y virulencia, nos ha permitido manipular sus componentes, consiguiendo movilizar DNA desde *Bartonella* hacia células humanas. Esto podría sentar las bases para una herramienta de transferencia al genoma humano de DNA de cualquier origen y longitud, de gran valor en el campo de la terapia génica.

Primero realizamos un estudio comparativo de los T4SS Trw de R388 y *Bartonella*, estableciendo los componentes que pueden ser intercambiados, estructural y funcionalmente. Además, hemos llevado a cabo un análisis mutacional de la proteína acopladora de R388 (TrwB) y analizado el efecto de estas mutaciones en la funcionalidad de TrwB en un sistema donde la cantidad de TrwB es limitante para la frecuencia de conjugación. Esto nos ha permitido delimitar los dominios funcionales de la proteína. También hemos obtenido mutantes que interaccionan más fuertemente con el T4SS de *Bartonella*. Por último, hemos conseguido movilizar DNA desde *Bartonella* a células humanas, y hemos determinado que la transferencia depende tanto de la maquinaria conjugativa de R388 como de los T4SS de *Bartonella*.

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.**
- **VWR International Eurolab, S.L.**

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

- Bordes Benitez, Ana
- Fernández Orts, Eva María
- Fernández Piña, Pablo
- Jorge Blanco, José Carmelo
- Lafarga Capuz, Bernardo
- López Ponce, Francisco José
- Medieros Almendros, Jesús
- Miranda Casas, Consuelo
- Obregón Sánchez, Virginia
- Rubio Vallejo, Manuel Fco
- Sesma Bea, Begoña
- Solano Goñi, Cristina
- Trotonda Pous, M^a Pilar
- 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).

Historia del Grupo de Microbiología del Medio Acuático

Juan Iriberry (Universidad del País Vasco), **Albert Bosch** (Universidad de Barcelona) y **Juan J. Borrego** (Universidad de Málaga).

El Grupo de Microbiología del Medio Acuático (MMA) surge en el seno de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) en 1993 por iniciativa de su Presidente, el Prof. Francisco Ruíz Berraquero, quien propuso a la Junta de la SEM la creación de los siguientes Grupos Especializados: Microbiología Molecular, Protistología y Microbiología del Medio Acuático.

En 1994 se organiza una Comisión Gestora constituida por los Dres. Isabel Barcina, Juan L. Barja, Albert Bosch, Juan J. Borrego, Esperanza Garay, Ricardo Guerrero, Juan Iriberry, Sara I. Pérez-Prieto y Alicia E. Toranzo. Esta Comisión Gestora se reúne por primera vez en Noviembre de 1994 en la sede de la SEM sita en C/Hortaleza (Madrid), estableciéndose las directrices fundamentales del futuro Grupo (que conocemos como el “Espíritu de Hortaleza”), organizando las elecciones del Grupo y planificando acciones inmediatas a realizar: la organización de una Mesa Redonda en el XV Congreso Nacional de Microbiología (Madrid, 1995) y la organización de la 1ª Reunión Científica del Grupo (Málaga, 1996).

La vocación del Grupo ha sido, y sigue siendo, aglutinar al mayor número de profesionales relacionados con la disciplina que ejercen su labor en entidades públicas y privadas y en el ámbito de la investigación. Además, el Grupo ha dado y sigue dando un gran protagonismo a nuestros jóvenes investigadores en las Reuniones Científicas del Grupo. Por último, el Grupo tiene la voluntad de ser un foro de diálogo y opiniones sobre la Microbiología del Medio Acuático entre los profesionales del sector.

En términos generales, el Grupo de MMA de la SEM se ha caracterizado desde sus comienzos por llevar a cabo muchas actividades y también iniciativas **pioneras** en la Sociedad, algunas de las cuales han sido:

1. **NORMALIZACIÓN**, que a **iniciativa** del grupo se creó la “Comisión de Normalización y Validación” (CNV) de la SEM, cuyo presidente es el miembro del Grupo de MMA Dr. Ferran Ribas.
2. **PREMIO A LA MEJOR TESIS DOCTORAL**, iniciativa instaurada por el Grupo desde el comienzo de su andadura, siendo el primer grupo de la SEM que empezó a conceder este premio. Hasta la actualidad se han concedido 7 Premios a nuestros jóvenes doctores.

3. **PREMIOS A LAS MEJORES COMUNICACIONES DE LAS REUNIONES CIENTÍFICAS DEL GRUPO**, desde la V Reunión, el Grupo concede premios a las mejores comunicaciones de las sesiones de nuestras reuniones.
4. **ELABORACIÓN DE UN CATÁLOGO DE INVESTIGADORES**, se ha editado un catálogo de investigadores y grupos de investigación en nuestra disciplina, iniciativa que probablemente haya sido única entre los grupos de la SEM.
5. **INVITADOS**, también en nuestras Reuniones hemos recibido invitados de gran relevancia. A modo de recordatorio podemos citar a Ricardo Guerrero (España) en Málaga, a Lynn Margulis (USA) en Girona, a Samuel Meyers (USA) en Santiago de Compostela, a Rudolf Amann (Alemania) en Sevilla, a Manfred G. Höfle (Alemania) en Tarragona, a J.M. González (España) en Valencia, a Josep M Gasol (España) en Bilbao y a Debra Milton (Suecia) en Vigo.

Desde su creación el Grupo de MMA ha contado con los siguientes cargos:

- **PRESIDENTES:** JUAN IRIBERRI (1994-2001), ALBERT BOSCH (2001-2009), JUAN J. BORREGO (2009-2013).



Lynn Margulis.



- **VICEPRESIDENTES:** JUAN J. BORREGO (1994-2007), ALICIA C. ESTÉVEZ TORANZO (2007-2011).
- **SECRETARIOS:** JUAN L. BARJA (1994-1999), SARA I. PÉREZ PRIETO (1999-2011).
- **TESORERAS:** ISABEL BARCINA (1994-1999), M^a JESÚS PUJALTE (1999-2009), M^a CARMEN MACIÁN (2009-2013).
- **VOCALES:** ALBERT BOSCH (1994-2001), ALICIA C. ESTÉVEZ TORANZO (1994-2007), SARA I. PÉREZ PRIETO (1994-1999), DOLORS FURONES (1994-1999), ANTONIO VENTOSA (1999-2009), FERRAN RIBAS (1999-2009), ANA AUDICANA (1999-2007), VICENTE CATALÁN (2007-2011), DOLORES CASTRO (2007-2011), M^a JOSÉ FIGUERAS (2009-2013), M^a CARMEN MÁRQUEZ (2009-2013).

El Grupo de MMA ha organizado las siguientes Mesas Redondas en los Congresos Nacionales de Microbiología de la SEM:

- XV CONGRESO MADRID 1995. **Moderadores:** Sara I. Pérez Prieto y Juan J. Borrego. **Ponentes:** Isabel Barcina, Albert Bosch, Isabel Esteve, Esperanza Garay y Alicia E. Toranzo.
- XVI CONGRESO BARCELONA 1997. **Moderadores:** Alicia E. Toranzo y Albert Bosch. **Ponentes:** David W. Cubitt, Carles Abellá, Anicet Blanch y Sara I. Pérez Prieto.

- XVII CONGRESO GRANADA 1999. **Moderadora:** Esperanza Garay. **Ponentes:** Jesús L. Romalde, Antonio Ventosa, Joan Jofre, Juan Iriberry y Ramón Roselló.
- XVIII CONGRESO ALICANTE 2001. **Moderadora:** Isabel Barcina. **Ponentes:** Rosa Pintó, Carles Pedrós-Alió, Philippe Lebaron y Ricardo Amils.
- XIX CONGRESO SANTIAGO 2003. **Moderadores:** M^a José Figueras y Juan L. Barja. **Ponentes:** Ana M^a Solanas, Francisco Torrella, Juan Iriberry y Fernando Laborda.
- XX CONGRESO CACERES 2005. **Moderadores:** M^a Jesús Pujalte y Antonio Ventosa. **Ponentes:** Karsten Zengler, Antonio Verísimo, M^a José Figueras y Carmen Amaro.
- XXI CONGRESO SEVILLA 2007. **Moderador:** Francisco Lucena. **Ponentes:** Charles Hagedon, Anicet Blanch, Andrew Gawier y Lluís Belanche.
- XXII CONGRESO ALMERIA 2009. **Moderador:** Jesús L. Romalde. **Ponentes:** Adelaida Almeida, Susana Guixó, Juan L. Barja y Dolores Castro.

El Grupo de MMA ha organizado 8 Reuniones Científicas: Málaga (1996), Girona (1998), Santiago de Compostela (2000), Sevilla (2002), Tarragona (2004), Valencia (2006), Bilbao (2008) y Vigo (2010).

En 2010 contamos con casi 200 socios, muchos de ellos procedentes de empresas privadas y públicas, organismos

Tabla 1 ORGANISMOS PÚBLICOS Y PRIVADOS E INSTITUTOS DE INVESTIGACIÓN ASOCIADOS

EMPRESAS PRIVADAS Y PÚBLICAS	ORGANISMOS OFICIALES	INSTITUTOS DE INVESTIGACIÓN
<ul style="list-style-type: none"> • ANAQUA, S.L. • EMASA, Aguas de Málaga. • EMASESA, Aguas de Sevilla. • Consorcio Aguas de Bilbao. • Laboratorio MICROKIT. 	<ul style="list-style-type: none"> • Consejería de Agricultura. La Rioja. • Laboratorio Regional Salud Pública, Madrid. • Laboratorio Municipal del Ayuntamiento de Bilbao. 	<ul style="list-style-type: none"> • Instituto Hidrológico y del Medio Natural, Valencia. • Instituto de Acuicultura. Santiago. • Instituto del Agua, Granada.
<ul style="list-style-type: none"> • ABGAR, Aguas de Barcelona. • LABAQUA, S.L. • IPROMA, S.L. • GAMASER, Aguas de Valencia. • Laboratorio SCADA, S.A. 	<ul style="list-style-type: none"> • Laboratorio de Salud Pública, Generalitat Catalunya. • Laboratorio de Salud Pública de Aragón. • Laboratorio de Salud Pública de Asturias. 	<ul style="list-style-type: none"> • Instituto de Ingeniería Agua y Medio Ambiente, Valencia. • Instituto Investigaciones Marinas, Vigo. • Instituto de Ecología Acuática, Girona.
<ul style="list-style-type: none"> • Canal Isabel II. • VWR International Eurolab. • Servicio Comarca Pamplona, S.A. • Millipore Ibérica, S.A. • Biomérieux, S.A. 	<ul style="list-style-type: none"> • Laboratorio de Salud Pública de Canarias. • Centro Nacional de Acuicultura (IRTA), Generalitat Catalunya. 	<ul style="list-style-type: none"> • IVIA, Valencia. • EPSO, Alicante. • Instituto de Ciencias del Mar, Barcelona.
<ul style="list-style-type: none"> • Laboratorio CRESA, S.L. • Instituto Grifols. • Laboratorio Dr. Oliver Rhodes. • SPM Controller. 	<ul style="list-style-type: none"> • Instituto de Toxicología y Control del Medio Marino. Xunta de Galicia. • Asociación Grupo de Bioindicación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Instituto Universitario de Ciencia y Tecnología, Barcelona. • Instituto de Ciencias Marinas, Canarias.

de la administración local y autonómica, e institutos de investigación y desarrollo tecnológico, como los que podemos citar (Tabla 1).

Además, contamos con la fortuna de contar con apoyo económico para nuestras iniciativas gracias a las siguientes Entidades Colaboradoras:

- EMASA: Empresa Municipal de Aguas de Málaga.
- EMASESA: Empresa Municipal de Aguas de Sevilla.
- IPROMA; S.L.: Castellón.
- GAMASER: Aguas de Valencia.

- MILLIPORE IBERICA, S.A.: Madrid.
- VWR INTERNATIONAL EUROLAB, S.L.: Barcelona.
- AGBAR: Grupo Aguas de Barcelona.
- ASOCIACION GRUPO BIOINDICACION: Sevilla.

Por todo ello, consideramos que nuestro Grupo cuenta con una magnífica salud y una gran proyección tanto a nivel de centros de investigación como entidades públicas y privadas, que se ve reforzada día a día por la gran aceptación que tienen del Grupo nuestros jóvenes investigadores, que son el “alma” y el “futuro” de la Microbiología española.

Nuevos socios de la SEM

Altas del 24/4/2010 al 27/10/2010

- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Abad Trueba, Naiara • Alegría González, Ángel • Alvarez Torres, Daniel • Andrade Gracia, María Jesús • Angulo Salazar, Mirian • Antúnez Horcajo, Ricardo • Balbontín Soria, Roberto • Bastardo Espinoza, Asmine Victoria • Bautista Santa Cruz, Luis Fernando • Bou Arevalo, Germán • Buján Gómez, Noemí • Cesarini, Silvia • Cortés Garmendia, María Pilar • D'Arrigo Haupaya, Matilde Honorina • De Garnica García, María Luisa • Díez Leturia, María • Doce Cariacedo, Alejandra | <ul style="list-style-type: none"> • Dubert Pérez, Javier • Duro Pérez, Rubén • Farto Seguí, Rosa Mª • Fernández Piñar, Regina • Gamero Lluna, Amparo • Garaizabal Ruiz, Idoia • García Lledó, Arantzazu • Garmendia García, Juncal • Gómez Álvarez, Helena • González Benítez, Natalia • Guerrero, Argentina Claudette • Gutiérrez Linares, Alicia • Jiménez Valverde, Ana • Jiménez Valverde, Estefanía • Levican Asenjo, Arturo Alberto • Linage Álvarez, Borja • López Malo, María • Marzoa Fandiño, Juan | <ul style="list-style-type: none"> • Molina Cobos, María del Carmen • Muñoz García-Mouriño, Sofia • Noriega Fernández, Estefanía • Ojer Usoz, Elena • Parro García, Víctor • Rivas Fontenla, Amable • Rodríguez Pachón, José María • Rodríguez Rama, José Luis • Saldaña Navarro, Guillermo • Salón Huerta, Natividad • Sánchez Angulo, Manuel • Seder Colomina, Marina • Serrano Esteban, María Loreto • Torreblanca Calvo, Marina • Uranga Sarralde, Ainhoa • Valero Díaz, Antonio • Vendrell Pérez, Daniel • Vilar Sanz, Ariadna |
|---|---|---|

Comunidades microbianas en sistemas acuáticos naturales



Grupo “**Microbios Marinos**”, Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea, Departamento de Inmunología Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología, Apdo. 644, E-48080 Bilbao

La investigación que lleva a cabo el Grupo “**Microbios Marinos**” tiene que ver con el análisis de las comunidades microbianas en sistemas acuáticos naturales, principalmente en el medio marino. Se aborda la función de los microbios en el mar, tanto en aguas costeras como oceánicas, mediante el estudio de la abundancia, la composición específica, la diversidad y la actividad de las comunidades de procariotas, bacterias y arqueas, así como de protistas bacterívoros. Se han utilizado estrategias de trabajo tanto experimental como de campo, con la participación en campañas oceanográficas en el mar Mediterráneo así como en aguas del océano Glacial Antártico. También se han ensayado distintas escalas de análisis, desde la interacción a nivel interespecífico protista-bacteria, hasta la relación y el flujo de materia y energía entre comunidades mixtas naturales de procariotas y protistas bacterívoros.

En los sistemas acuáticos planctónicos la biomasa bacteriana supone la mayor fracción del carbono orgánico particulado, llegando incluso a sobrepasar la biomasa fitoplanctónica en ambientes oligotróficos. Esta biomasa se transfiere a los niveles superiores de la red trófica (zooplancton, peces) mediante la depredación que llevan a cabo los protistas bacterívoros, principalmente nanoflagelados y microciliados, y condiciona la productividad biológica del sistema. Por otra parte, las comunidades de bacterias y protozoos no se encuentran uniformemente distribuidas en el espacio acuático. La existencia de focos dispersos de material orgánico provoca su búsqueda por parte de las bacterias mediante mecanismos quimiotácticos, y permite su acumulación y crecimiento en el material particulado.

Los primeros trabajos llevados a cabo por los miembros del grupo fueron de tipo campo y tuvieron que ver con el

Itxaso Artolozaga, Begoña Ayo, Iñigo Azúa, Marian Unanue y Juan Iriberry

establecimiento de relaciones funcionales entre la actividad bacteriana, la temperatura y el fitoplancton (Iriberry *et al.*, 1985), así como con el análisis de las comunidades de bacterias en suspensión y adheridas a partículas en aguas costeras del Cantábrico Oriental. Así observamos que, si bien la comunidad adherida era minoritaria (Iriberry *et al.*, 1987), sin embargo sus componentes eran más activos (Iriberry *et al.*, 1990a) y, al contrario que las bacterias en suspensión, no mostraban variabilidad estacional (Unanue *et al.*, 1992). También, analizando varios ecosistemas concluimos que la adherencia no constituía una ventaja selectiva en aquellos sistemas más ricos en nutrientes (Iriberry *et al.*, 1990b). El análisis de la capacidad enzimática extracelular de las bacterias adheridas y en suspensión es otro aspecto que interesó desde un comienzo al grupo. Una elevada proporción de la materia orgánica presente en el agua está en forma de polímeros de naturaleza muy variada. La actividad enzimática extracelular es necesaria para hidrolizar estas macromoléculas y generar moléculas de pequeño peso molecular que sí pueden ser utilizadas como nutrientes. En aguas costeras del Cantábrico Oriental observamos mayores actividades asociadas, a nivel celular, a las bacterias adheridas (Unanue *et al.*, 1993). Más adelante, nuestro grupo fue el primero en encontrar, para aguas del NO del Mediterráneo, la existencia de cinéticas bifásicas ectoenzimáticas acopladas a cinéticas bifásicas de toma de monómeros para las bacterias adheridas y en suspensión (Ayo *et al.*, 2001, Unanue *et al.*, 1999).

La dificultad del trabajo con sistemas particulados en el mar, derivada de la necesidad de utilizar buzos SCUBA o bombas de acción a profundidad para obtener las muestras, incentivó la puesta a punto de un sistema de formación de partículas en el laboratorio a partir de agua de mar natural (Unanue *et al.*, 1998a). Mediante la incubación de las muestras de agua en cilindros rodantes a baja velocidad, conseguíamos un flujo laminar que provocaba la formación de partículas colonizadas por bacterias con las que ensayar diseños experimentales. Así observamos que la relación entre hidrólisis de polímeros y toma de monómeros variaba a lo largo del proceso de descomposición de las partículas, de modo que éstas actuaban como reactores enzimáticos generadores de monómeros que

alimentaban a las bacterias en suspensión del sistema (Agis *et al.*, 1999, Unanue *et al.*, 1998b). Otros aspectos analizados fueron la influencia de la calidad del material particulado en la capacidad de los enzimas para competir a bajas concentraciones de sustrato (Azúa *et al.*, 2003), así como la influencia de la edad de las partículas sobre el comportamiento cinético enzimático (Azúa *et al.*, 2007).

La existencia de estos agregados de bacterias adheridas condiciona la aproximación de los protozoos, el ejercicio de su actividad depredadora y el flujo de materia y energía en la red trófica. Los primeros estudios del grupo sobre depredación por bacterívoros fueron trabajos de campo, y mostraron que la abundancia de presas y depredadores no variaban significativamente en situaciones ambientales de flujo de biomasa muy diferentes (Iriberry *et al.*, 1993). En la interacción bacteria-protocoo, se pueden considerar al menos tres fases principales: la aproximación del depredador hacia la presa, la ingestión de la misma y su posterior digestión. Hoy en día conocemos que los protistas depredadores son capaces de discernir y mostrarse selectivos en las tres etapas. En nuestro caso, comenzamos analizando la eliminación a corto plazo (ingestión) y largo plazo (digestión) de bacterias alóctonas, y observamos diferencias en el orden de prioridad que indicaban que la eliminación venía determinada por la digestión de las presas (Iriberry *et al.*, 1994a). A continuación estudiamos el consumo a largo plazo (digestión) de varias especies alóctonas y autóctonas observando que el consumo se encontraba más relacionado con características intrínsecas de las especies que con su origen (Iriberry *et al.*, 1994b). También se analizó la importancia del tamaño de la presa en el caso de varios morfotipos de ciliados (Ayo *et al.*, 2001).

Una vez puesto a punto el sistema de formación de partículas en laboratorio, describimos la sucesión de bacterívoros en partículas de tipo nieve marina (Artolozaga *et al.*, 1997), la distribución espacial de los protistas en presencia de partículas (Artolozaga *et al.*, 2000), y proporcionamos los primeros datos directos de depredación de nanoflagelados y ciliados sobre bacterias adheridas (Artolozaga *et al.*, 2002). Los últimos trabajos del grupo en este campo han tenido que ver con la evaluación de la importancia del fenómeno de la resistencia bacteriana a la depredación (Alonso-Sáez *et al.*, 2009) y con el análisis de los factores que intervienen en la elección de presas por los depredadores (Ayo *et al.*, 2009). Entre ellos cabe destacar la utilización de la glicina y otros D- y L- aminoácidos como infoquímicos de gran importancia en la interacción protozoo-bacteria (Ayo *et al.*, 2010).

Durante los próximos años uno de los principales objetivos del grupo será analizar la potencialidad enzimática del bacterioplancton, tanto en aguas superficiales como profundas, en distintas masas de agua del Océano Global (océanos Atlántico, Índico y Pacífico), participando en la Campaña de Circunnavegación Malaspina-2010. Un segundo objetivo de investigación será establecer nexos de unión entre la diversidad taxonómica y la función ecológica de la comunidad procariota, en relación con la variabilidad medioambiental y biológica del ecosistema marino costero del Cantábrico Oriental.

Juan Iriberry es Catedrático de Microbiología de la Universidad del País Vasco-*Euskal Herriko Unibertsitatea*. Se doctoró en 1984 por la citada Universidad, donde lidera el grupo de investigación "Microbios Marinos". Su interés se ha centrado en comprender el funcionamiento de las comunidades de microbios heterótrofos marinos en relación con el medioambiente en el que viven. Han sido objeto de especial atención aspectos tales como las relaciones tróficas a nivel de comunidad, la actividad y eficiencia de procariotas que viven en suspensión y adheridos a partículas, las interacciones depredador-presa entre protistas y bacterias, la comunicación mediante infoquímicos y la depredación selectiva como condicionante de la estructura y composición de la comunidad procariota. Su trabajo ha sido principalmente experimental, si bien lo ha combinado con trabajo de campo en aguas costeras y campañas oceanográficas en el Mediterráneo y Círculo Polar Antártico. Participó en la Comisión Gestora del Grupo Microbiología del Medio Acuático-SEM y fue su primer presidente entre 1995 y 2001.



PUBLICACIONES REPRESENTATIVAS DEL GRUPO "MICROBIOS MARINOS"

- Agis M, Unanue M, Iriberry J, Herndl GJ. (1999). Bacterial colonization and ectoenzymatic activity in phytoplankton-derived model particles. Part II. Cleavage and uptake of carbohydrates. *Microb. Ecol.* 36:66-74.
- Alonso-Sáez L, Unanue M, Latatu A, Azúa I, Ayo B, Artolozaga I, Iriberry J. (2009). Changes in marine prokaryotic community induced by varying types of dissolved organic matter and subsequent grazing pressure. *J. Plankton Res.* 31:1373-1383.
- Artolozaga I, Ayo B, Latatu A, Azúa I, Unanue M, Iriberry J. (2000). Spatial distribution of protists in the presence of macroaggregates in a marine system. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33:191-196.
- Artolozaga I, Santamaría E, López A, Ayo B, Iriberry J. (1997). Succession of bacterivorous protists on laboratory-made marine snow. *J. Plankton Res.* 19:1429-1440.
- Artolozaga I, Valcárcel M, Ayo B, Latatu A, Iriberry J. (2002). Grazing rates of bacterivorous protists inhabiting diverse marine planktonic microenvironments. *Limnol. Oceanogr.* 47:142-150.
- Ayo B, Latatu A, Artolozaga I, Jürgens K, Iriberry J. (2009). Factors affecting preference responses of the freshwater ciliate *Uronema nigricans* to bacterial prey. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56:188-193.
- Ayo B, Santamaría E, Latatu A, Artolozaga I, Azúa I, Iriberry J. (2001). Grazing rates of diverse morphotypes of bacterivorous ciliates feeding on four allochthonous bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 33:455-460.
- Ayo B, Txakartegi A, Baña Z, Artolozaga I, Iriberry J. (2010). Chemosensory response of marine flagellate towards L- and D- dissolved free amino acids generated during heavy grazing on bacteria. *Int. Microbiol.* 13:151-158.
- Ayo B, Unanue M, Azúa I, Gorsky G, Turley C, Iriberry J. (2001). Kinetics of glucose and amino acids uptake by attached and free-living marine bacteria in oligotrophic waters. *Mar. Biol.* 138:1071-1076.
- Azúa I, Unanue M, Ayo B, Artolozaga I, Arrieta JM, Iriberry J. (2003). Influence of organic matter quality in the cleavage of polymers by marine bacterial communities. *J. Plankton Res.* 25:1451-1460.



Figura 1. De izquierda a derecha, Juan Iriberry, Itxaso Artolozaga, Marian Unanue, Begoña Ayo e Iñigo Azúa. Al fondo, unos cormoranes grandes (*Phalacrocorax carbo*) en situación de subida de marea.

- Azúa I, Unanue M, Ayo B, Artolozaga I, Iriberry J. (2007). Influence of age of aggregates and prokaryotic abundance on glucose and leucine uptake by heterotrophic marine prokaryotes. *Int. Microbiol.* 10:13-18.
- Iriberry J, Ayo B, Artolozaga I, Barcina I, Egea L. (1994b). Grazing on allochthonous vs. autochthonous bacteria in river water. *Let. Appl. Microbiol.* 18:12-14.
- Iriberry J, Ayo B, Unanue M, Barcina I, Egea L. (1993). Channeling of bacterioplanktonic production towards phagotrophic flagellates and ciliates under different seasonal conditions in a river. *Microb. Ecol.* 26:111-124.
- Iriberry J, Azúa I, Labirua-Iturburu A, Artolozaga I, Barcina I. (1994a). Differential elimination of enteric bacteria by protists in a freshwater system. *J. Appl. Bacteriol.* 77:549-552.
- Iriberry J, Unanue M, Ayo B, Barcina I, Egea L. (1990a). Bacterial production and growth rate estimation from ³H-Thymidine incorporation for attached and free-living bacteria in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:483-387.
- Iriberry J, Unanue M, Ayo B, Barcina I, Egea L. (1990b). Attached and free-living dividing bacteria in two aquatic systems. *Let. Appl. Microbiol.* 11:87-89.
- Iriberry J, Unanue M, Barcina I, Egea L. (1987). Seasonal variation in population density and heterotrophic activity of the attached and free-living bacteria in coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2308-2314.
- Iriberry J, Undurraga A, Muela A, Egea L. (1985). Heterotrophic bacterial activity in coastal waters: functional relationship of temperature and phytoplankton population. *Ecol. Model.* 28:113-120.
- Unanue M, Ayo B, Agís M, Slezak D, Herndl GJ, Iriberry J. (1999). Ecto-enzymatic activity and uptake of monomers in marine bacterioplankton described by a biphasic kinetic model. *Microb. Ecol.* 37:36-48.
- Unanue M, Ayo B, Azúa I, Barcina I, Iriberry J. (1992). Temporal variability of attached and free-living bacteria in coastal waters. *Microb. Ecol.* 23:27-39.
- Unanue M, Azúa I, Arrieta JM, Herndl GJ, Iriberry J. (1998a). Laboratory-made particles as a useful approach to analyse microbial processes in marine macroaggregates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26:325-334.
- Unanue M, Azúa I, Arrieta JM, Labirua-Iturburu A, Egea L, Iriberry J. (1998b). Bacterial colonization and ectoenzymatic activity in phytoplankton-derived model particles. Cleavage of peptides and uptake of amino acids. *Microb. Ecol.* 35:136-146.
- Unanue M, Azúa I, Barcina I, Egea L, Iriberry J. (1993). Size distribution of aminopeptidase activity and bacterial incorporation of dissolved substrates in three aquatic ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 102:175-183.

PROYECTOS REPRESENTATIVOS DEL GRUPO "MICROBIOS MARINOS"

- CAMBIO. Diversidad y Función del Bacterioplancton en el Cantábrico Oriental: Depredación y Recursos Como Motores del Cambio Estacional. IP: Juan Iriberry, MICINN CTM-2010-19308, 2010 a 2013, 152.460,00 €
- CIRCUNNAVIGATION EXPEDITION MALASPINA 2010: Global Change and Biodiversity Exploration of the Global Ocean. IC: Carlos Duarte (IMEDEA-CSIC) IP UPV-EHU: Juan Iriberry, MICINN Consolidar-Ingenio CSD-2008-00077, 2008 a 2013, 5.658.000,00 € Total. UPV-EHU: 69.652,00 €
- EFICIENCIA. Eficiencia de Crecimiento del Bacterioplancton Marino y Depredación por Bacterívoros. IP: Juan Iriberry, MCYT CTM-2006-08023, 2006 a 2009, 107.690,00 €.
- QUIMIC. Comunicación Química en la Interrelación Protozoos-Bacterias. IP: Juan Iriberry, MCYT BOS-2003-06211, 2004 a 2007, 68.540,00 €
- DAMINO. D-aminoácidos como Indicadores de Productividad Biológica en Sistemas Marinos Costeros. IP: Marian Unanue, MCYT REN-2003-05276, 2004 a 2007, 63.250,00 €
- Bacterias Resistentes a la Depredación en los Sistemas Acuáticos: Origen, Función, Importancia. IP: Juan Iriberry, DGESIC-MEC, PB-97-0635, GV PI-98-25, 1998 a 2001, 69.717,00 €
- DHARMA: Diversidad, Heterotrofia, Autotrofia y Relaciones entre los Microorganismos Antárticos. IP: Carlos Pedrós-Alió, CICYT ANT-97-1155, 1998 a 1999, 204.344 € Total. UPV-EHU: 24.317,00 €
- EMPS: Heterotrophic Microbial Processes Associated with the Degradation of Particulate Material in Mediterranean Sea Waters. IC: Micheline Bianchi (Francia), IP: Juan Iriberry (España), Unión Europea MAS2-CT94-0090 y CICYT AMB-95-1217-CE, 1994 a 1996, 926.873,00 € Total. UPV-EHU: 74.002,00 €

MIEMBROS DEL GRUPO "MICROBIOS MARINOS" UPV-EHU

Investigador Principal:

Dr. Juan Iriberry, catedrático de universidad.

Investigadores:

Dra. Marian Unanue Vivanco, titular de universidad.

Dra. Begoña Ayo Millán, titular de universidad.

Dr. Iñigo Azúa Pérez, profesor agregado.

Dra. Itxaso Artolozaga Bengoetxea, profesora colaboradora.

Doctorandos en el momento actual:

Lda. Zuriñe Baña García.

Lda. Itziar Goirieta Boira.

Grupo de Ecología Microbiana Molecular

Instituto de Ecología Acuática, Universidad de Girona
Facultad de Ciencias, Campus de Montilivi, E-17071, Girona

El grupo de Ecología Microbiana Molecular (gEMM) de la Universidad de Girona cuenta con una dilatada y amplia experiencia en el campo de la ecología microbiana de ambientes lacustres. El grupo fue creado por los catedráticos Carles Abellà y Jesús García-Gil a principios de los 90 en la, por aquel entonces, naciente Universidad de Girona. En sus primeros años, las líneas de investigación del grupo se centraban en estudiar la dinámica y actividad de las poblaciones de bacterias fotosintéticas del azufre en los diferentes lagos y lagunas del sistema cárstico de Banyoles, un entorno de investigación ideal debido a la gran diversidad de ambientes y a la proximidad geográfica a nuestra universidad. Progresivamente, el gEMM ha diversificado tanto sus líneas de investigación como su área de actividad como resultado de la ampliación de su plantilla de investigadores y la obtención de proyectos financiados de ámbito tanto nacional como internacional.

En la actualidad, el gEMM está compuesto por once investigadores. Siete de ellos son doctores: un catedrático (Carles Abellà), tres profesores titulares (Lluís Bañeras, Carles Borrego [responsable actual, carles.borrego@udg.edu] y Xavier Vila), un profesor lector (Frederic Gich) y dos profesores asociados (Genoveva Montserrat y Rosalía Trias). En estos momentos forman parte también del grupo cuatro becarios predoctorales (Mireia Fillol, Arantzazu García, Anna Plasencia y Ariadna Vilar). A todos ellos se suman una técnico de laboratorio (Sra. Laia Mauricio) y miembros de otros centros de investigación que participan o han participado recientemente en algunas de las líneas de investigación del grupo. Entre estos últimos cabe destacar el Sr. Àlex Sánchez, del *Institut Català de Recerca de l'Aigua* (ICRA) y el Dr. Xavier Triadó, del *Centre d'Estudis Avançats de Blanes* (CEAB-CSIC).

Las líneas de investigación del gEMM pueden agruparse en dos apartados:

1. En el primero, más relacionado con la investigación básica, se agrupan diferentes proyectos que tienen como objetivo común el determinar el **impacto y papel ecológico de diferentes grupos microbianos** que habitan en sistemas acuáticos continentales (lagos, ríos, embalses y humedales) **en relación a los ciclos biogeoquímicos** (carbono, nitrógeno y azufre), así como establecer en qué medida los factores ambientales modulan tanto su diversidad como su actividad. En este sentido, se han desarrollado durante los últimos

años líneas de investigación centradas en el impacto de las arqueas lacustres en los ciclos del carbono y del nitrógeno, la actividad de las comunidades de bacterias desnitrificantes en humedales y la diversidad de bacterias fotosintéticas del azufre tanto en comunidades planctónicas como en tapetes microbianos.

2. El segundo apartado incluye proyectos de investigación aplicada, centrados en **microorganismos útiles en biotecnología e ingeniería ambiental**. Estas investigaciones tratan sobre la composición y actividad de las comunidades bacterianas en humedales de tratamiento y reactores biológicos así como la identificación y caracterización de los principales microorganismos implicados en procesos metabólicos con un claro interés biotecnológico y ambiental. En concreto, nuestros esfuerzos se han centrado en sistemas de depuración, potabilización y reutilización de aguas, tratamiento terciario de aguas residuales, la eliminación de nitrógeno en reactores biológicos (mediante sistemas de nitrificación y desnitrificación o de nitrificación parcial y anammox) y la bioremediación de suelos.

En el marco de estos dos apartados, se detallan a continuación algunos de los proyectos en los que el gEMM está trabajando en la actualidad:

Proyecto 1. *Interacciones planta-microorganismo en relación al ciclo del nitrógeno.*

IP: Lluís Bañeras (lluís.banyeras@udg.edu).

El conocimiento detallado del ciclo del nitrógeno y de los microorganismos responsables de las diferentes transformaciones de este elemento en un ecosistema acuático son de gran interés tanto a nivel ecológico como de conservación y gestión del propio entorno. Las transformaciones del N llevadas a cabo por los microorganismos pueden ser deseadas y potenciadas (p. e. la eliminación de amonio y otras formas de N en aguas residuales o el aumento de la disponibilidad del N en suelos agrícolas) o, en algunos casos, perjudiciales para el propio ambiente, tanto a nivel local como global (por ejemplo en la producción de gases de efecto invernadero). Comprender cómo los microorganismos transforman el nitrógeno, ya sea mediante la nitrificación y la desnitrificación o bien a través de procesos más

complejos como la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA) o la oxidación anaeróbica de amonio (ANAMMOX), es esencial para conocer el funcionamiento de los humedales y aporta datos para su gestión. Nuestra investigación se centra en caracterizar estos procesos en humedales naturales en las Marismas de Doñana y compararlos con los que tienen lugar en un sistema de humedales de tratamiento construidos en el Parque Natural *dels Aiguamolls de l'Empordà* (Girona). En concreto estamos investigando como la presencia de macrófitos afecta la diversidad y actividad de las comunidades microbianas nitrificantes y desnitrificantes (Ruiz-Rueda *et al.* 2009). La eliminación de nitrógeno de un sistema de humedales mediante vegetación es un proceso complejo, donde intervienen multitud de factores y donde las relaciones planta-microorganismos (a menudo muy específicas) adquieren una especial importancia. Debido precisamente a la especificidad de estas relaciones, estos sistemas ofrecen un escenario muy prometedor como novedosos sistemas de aislamiento de nuevas especies de microorganismos.

Proyecto 2. *Ecología y biología de arqueas en lagos estratificados.*

IP: Carles Borrego (carles.borrego@udg.edu).

Las arqueas son un componente común del plancton que ha pasado desapercibido para la limnología hasta la aplicación rutinaria de técnicas moleculares en ecología microbiana. El estudio de estos microorganismos, relacionados tradicionalmente con ambientes extremos, es actualmente un campo de estudio muy prometedor, descubriéndose a un ritmo frenético nuevos datos que avalan su enorme riqueza biológica y abundancia tanto en ambientes acuáticos como terrestres (Chaban *et al.*, 2009; Casamayor & Borrego, 2009). De su ubicuidad y abundancia puede suponerse un gran impacto tanto en los ciclos biogeoquímicos como en los flujos de energía globales. Uno de los ambientes donde la diversidad y actividad de las arqueas es menos conocida es, sin embargo, el plancton lacustre (Auguet & Casamayor, 2009) y por tanto, estos ambientes ofrecen una excelente oportunidad para explorar la ecología de uno de los grupos microbianos más interesantes y enigmáticos. Estamos estudiando la implicación de varios linajes de arqueas no extremófilas en los ciclos biogeoquímicos del C y del S en lagos cársticos caracterizados por anoxia estacional y una microbiota sulfureta muy activa. Nuestros resultados indican que las arqueas planctónicas son mucho más diversas de lo que podía suponerse, y que las zonas anóxicas ricas en sulfhídrico están habitadas por linajes característicos no muy frecuentes en otros ambientes lacustres o en el plancton marino (Llirós *et al.*, 2008; 2010). Nuestro principal interés es doble, por una parte determinar el papel de estas arqueas en el funcionamiento del ecosistema y su relación con las transformaciones biogeoquímicas del S y del C, y por otro, aislar los filotipos dominantes de la comunidad como primer paso para su caracterización genómica y funcional.

Proyecto 3. *Efecto de contaminantes sobre las comunidades microbianas del suelo y selección de bacterias útiles para su bioremediación.*

IP: Xavier Vila (xavier.vila@udg.edu).

La presencia de compuestos contaminantes en concentraciones elevadas en los suelos puede tener un impacto perjudicial sobre su microbiota indígena y, en consecuencia, sobre las funciones que desempeña en el ecosistema edáfico, la actividad biológica y en último término el papel que desempeñan los suelos en los sistemas terrestres, ya sean naturales o modificados por el hombre. Analizar los efectos, tanto sobre la composición como sobre la actividad de la comunidad microbiana propia de suelos mediterráneos, de varios contaminantes (principalmente compuestos clorofenólicos y metales) aplicados a distintas concentraciones es un objetivo de investigación aplicada que puede aportar, por lo tanto, una información fundamental para poder prever los efectos de los contaminantes y establecer los límites que puede tolerar el sistema. Por otro lado, los cambios que experimentan las comunidades microbianas en los suelos contaminados artificialmente con concentraciones elevadas de clorofenoles o metales permiten detectar y, en algunos casos aislar, cepas microbianas resistentes a dichos contaminantes ya que éstas se enriquecen espontáneamente en los microcosmos edáficos sometidos a contaminación y pueden también ser seleccionadas positivamente en cultivos de laboratorio. Obtener cultivos de bacterias resistentes y potencialmente útiles para procesos de bioremediación de suelos es el segundo objetivo de este proyecto de investigación aplicada. Dichos cultivos son también caracterizados, desde una perspectiva ecotoxicológica, y se valora su capacidad de biodegradar los contaminantes que se han utilizado para su enriquecimiento, una característica clave para determinar su posible utilidad en la recuperación de suelos contaminados.

Proyecto 4. *Bacterias desnitrificantes autotróficas en pilas de combustible microbianas (Microbial Fuel Cells, MFC).*

IP: Lluís Bañeras (lluis.banyeras@udg.edu).

Conseguir un sistema de depuración de aguas residuales urbanas que no sólo no requiera de un aporte de energía, sino que sea capaz de producirla, es un deseo compartido por la mayoría de investigadores y empresas del sector. Quizás todavía estamos lejos de conseguirlo, pero los recientes avances en el diseño de sistemas bioelectroquímicos, las pilas microbianas, nos sugieren que esta utopía pueda ser realidad en el futuro. Las pilas de combustible microbianas (MFC) son sistemas biológicos capaces de generar una cantidad neta de energía mediante la canalización de los electrones generados en las reacciones de respiración. Las MFC desnitrificativas combinan la oxidación aeróbica de materia orgánica en un ánodo, con la desnitrificación en el cátodo. Los electrones generados en el ánodo por parte de bacterias

electrogénicas (*Geobacter lovleyi*, entre otras) fluyen por un circuito eléctrico hasta el cátodo donde son utilizados para la desnitrificación. Un buen diseño permitiría depurar el agua residual eliminando materia orgánica y nitrato del ánodo y del cátodo, respectivamente. Este proceso es independiente de la relación C/N y permite eliminar N en el cátodo en ausencia de materia orgánica con la participación de bacterias desnitrificantes quimiolitotróficas. En la actualidad hemos completado los análisis de las comunidades bacterianas de pilas de MFC desnitrificativas y disponemos de una colección de más de 300 aislados con capacidad de reducir el nitrato sin aporte de materia orgánica. Nuestro reto es estudiar el potencial de estos organismos y aportar datos útiles para el diseño de nuevos sistemas de tratamiento.

Proyecto 5. Contribución de bacterias y arqueas oxidadoras de amonio en reactores biológicos utilizados en la eliminación de amonio de aguas residuales.

IP: Frederic Gich (frederic.gich@udg.edu).

El estudio de las comunidades de bacterias y arqueas oxidadoras de amonio en reactores SBR (*Sequence Batch Reactor*) y PN-SBR (*Partial Nitrification-Sequence Batch Reactors*) tiene gran interés desde el punto de vista biotecnológico para lograr una mayor eficiencia de la eliminación de nitrógeno. Gracias al control de las diferentes variables operacionales (pH, oxígeno disuelto, potencial redox, tiempo de residencia de los fangos) se pueden mantener comunidades microbianas estables y activas, permitiendo un estudio detallado de su dinámica y actividad a lo largo del tiempo. La utilización de técnicas moleculares de recuento específi-

cas para arqueas y bacterias oxidadoras de amonio (AOA y AOB, respectivamente) nos ha permitido conocer su identidad, distribución y abundancia en los dos tipos de reactores estudiados. Por otra parte, tenemos previsto monitorizar las variaciones en las concentraciones relativas de los genes para la amonio monooxigenasa de arqueas y bacterias mediante qPCR para poder relacionarlas con la estequiometría de las diferentes formas nitrogenadas (amonio, nitrito y nitrato) durante el proceso operativo y establecer qué efecto tiene la manipulación controlada de las variables físico-químicas sobre la actividad de uno y otro grupo de microorganismos.

REFERENCIAS

- Auguet, J.C., A. Barberan and E.O. Casamayor (2009) Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME J.* 4: 182-190.
- Casamayor, E.O. and C.M. Borrego (2009) Archaea in inland waters. In: Pace, M. (Ed.) *Encyclopedia of Inland Waters*. (Gene E. Likens, Editor), Vol. 3, pp: 167-181. Oxford: Elsevier.
- Chaban, B., S.Y.M. Ng and K.F. Jarrell (2006) Archaeal habitats - from the extreme to the ordinary. *Can. J. Microbiol.* 52: 73-116.
- Llirós, M., E.O. Casamayor and C.M. Borrego (2008) High archaeal richness in the water column of a freshwater sulphurous karstic lake along an inter-annual study. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 331-342.
- Llirós, M., F. Gich, A. Plasencia, J.C. Auguet, F. Darchambeau, E.O. Casamayor, J.-P. Descy and C.M. Borrego (2010) Vertical distribution of ammonia-oxidizing crenarchaeota and methanogens in the epipelagic waters of Lake Kivu. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.02864-09.
- Ruiz-Rueda, O., S. Hallin and L. Bañeras (2009) Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to plant species in a constructed wetland. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67: 308-319.

Virus entéricos, UB

Albert Bosch Navarro – Rosa M. Pintó Solé

Dpto. Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

El término virus entérico se aplica de forma genérica a cualquier virus de transmisión fecal-oral y no debe confundirse con el de *Enterovirus* que constituye un género dentro de la familia *Picornaviridae*. Nuestro grupo, como su nombre indica, se dedica al estudio de los virus entéricos, tanto desde una perspectiva molecular básica como desde una perspectiva aplicada como es el control de su papel como contaminantes ambientales y de alimentos.

Según los Centers for Disease Control (CDC) de Atlanta, se producen anualmente entre tres y cinco mil millones de casos de diarreas que causan alrededor de cinco millones de muertes, sobre todo en la población infantil. El primer

virus de gastroenteritis identificado fue el virus de Norwalk, en 1972, que es el prototipo de los norovirus, pertenecientes a la familia *Caliciviridae*, y el agente de transmisión alimentaria que causa un mayor número de casos de diarrea. Un año más tarde fueron descritos los rotavirus que todavía causan alrededor de medio millón de muertes infantiles cada año por gastroenteritis. Con el paso de los años otros virus causantes de gastroenteritis fueron descritos entre los cuales se encuentran los astrovirus pertenecientes a la familia *Astroviridae*. Recientemente atraen interés los sapovirus, también pertenecientes a la familia *Caliciviridae* como los norovirus, y cuyo papel en la gastroenteritis infantil parece

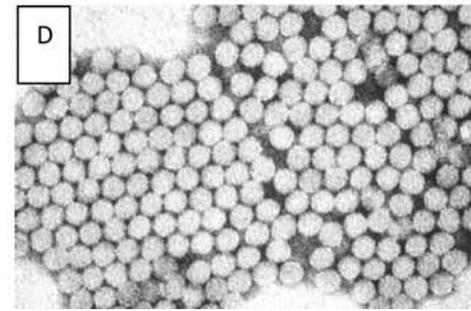
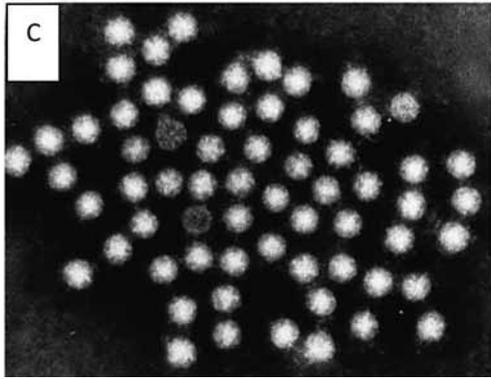
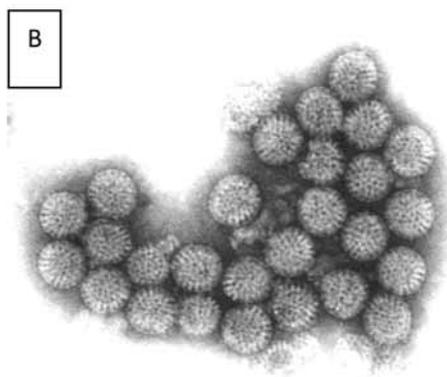
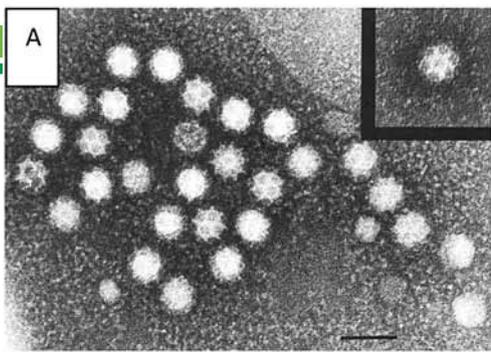


Figura 1. Virus entéricos objeto de estudio de nuestro grupo. A. Calicivirus; B. Rotavirus; C. Astrovirus; D. Virus de la hepatitis A.

ser relevante. Por otro lado, el virus de la hepatitis A, dentro de la anteriormente mencionada familia *Picornaviridae*, es un virus hepatotrópico de transmisión esencialmente fecal-oral que causa la mitad de todas las hepatitis a nivel mundial. Estos virus han sido el foco de interés de nuestro grupo durante más de tres décadas.

Un enfermo de gastroenteritis puede excretar niveles de virus de hasta 10^{13} partículas víricas por mL de deposición fecal y sus vómitos, explosivos, pueden contener unos 10^6 virus por mL. Las heces de un enfermo de hepatitis A pueden albergar hasta 10^8 virus por gramo. Dado que los habituales tratamientos de depuración de aguas residuales no consiguen una eliminación completa de los patógenos víricos, éstos se convierten en potenciales contaminantes del medio acuático, así como de alimentos como el marisco bivalvo cultivado en zonas contaminadas y frutas y verduras regadas con aguas contaminadas.

Puede verse un listado exhaustivo de las líneas de investigación del grupo en la página web del mismo (<http://www.ub.edu/microbiologia/viruse/index.htm>) en la que también se encuentran reseñadas las fuentes de financiación oficial de los últimos años.

Dentro de la virología ambiental un tema de interés actual del grupo es la puesta a punto de sistemas de detección y cuantificación para los virus de la hepatitis A, norovirus y sapovirus en muestras de agua, alimentos y también en muestras provenientes de pacientes. Este tema ha sido financiado por proyectos de la UE “SEAFOODplus”, “EVENT” y “DIVINE-NET” y el proyecto del Plan Nacional de Biotecnología “Estandarización de una RT-PCR a tiempo real para la cuantificación del virus de la hepatitis A, y caracterización de virus con cápsides mutantes”. Los resultados obtenidos han dado lugar a metodologías que han sido la base del desarrollo de métodos de referencia formulados por el comité de la UE CEN/TC275/WG6/TAG4 “Microbiology of food and

animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR- Part 1: Method for quantitative determination” y “Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR- Part 1: Method for qualitative determination”. En esta misma línea hemos depositado dos patentes que se encuentran actualmente en explotación “Control for assays based on reverse-transcription polymerase chain reaction. International PCT No. registro PCT/EP2007/055407, Estados Unidos, 2007” y “Standardized method and kit for the quantification of Hepatitis A virus. International PCT No. registro PCT/EP2007/055402, Estados Unidos, 2007”.

Las metodologías desarrolladas por el grupo nos han permitido llevar a cabo el primer estudio de estimación cuantitativa del riesgo de contraer hepatitis A después de consumir alimentos contaminados con el virus. Por otro lado también hemos podido llevar a cabo estudios de detección cuantitativa y caracterización genómica de norovirus de los genogrupos I y II, así como de sapovirus en la cuenca del río Llobregat que han sido financiados por el proyecto de la UE “HEALTHY-WATER”. Los resultados constituyen la primera descripción de la presencia de sapovirus en el ambiente fuera de Japón y proporcionan datos de los niveles de estos importantes patógenos gastrointestinales y de su prevalencia epidemiológica en esta cuenca que es fuente de abastecimiento de agua de bebida para una gran parte de la población catalana. También se han podido extraer conclusiones de la persistencia de estos virus después de tratamientos de depuración de aguas residuales y de potabilización para obtener agua de consumo.

Precisamente, la temática de la supervivencia de virus entéricos ha sido un tema estrella del grupo durante largo tiempo. Para un patógeno parásito intracelular obligado su capacidad para sobrevivir en las fases extracorpóreas es una cuestión crítica para determinar el riesgo asociado a su presencia en

un determinado tipo de muestra. En este campo, el Grupo de Virus Entéricos fue en 2001 el primer grupo de una universidad pública española en recibir la certificación oficial de cumplimiento de “Buenas Prácticas de Laboratorio” (BPL) en sus estudios de seguridad vírica (BPLI/0309/008/CAT), según RD 2043/1994. Seguimos validando la efectividad de técnicas emergentes de eliminación de virus. Dentro del proyecto Consolider-Ingenio 2010, Carnisenusa estamos evaluando la eficacia de tratamientos con haces de electrones acelerados y con pulsos lumínicos. El tratamiento mediante radiaciones ionizantes por electrones acelerados es limpio y no genera calor aunque se requieren altas dosis para eliminar virus como norovirus y virus de la hepatitis A. La tecnología de los pulsos lumínicos para la destrucción de microorganismos está todavía en vías de desarrollo. Introducida en la pasada década, consiste en emitir flashes de luz blanca en un espacio muy corto de tiempo (de 1 a 20 flashes por segundo) con una energía de 0,75 J/cm² por pulso. Los primeros datos obtenidos con este tratamiento son prometedores para la eliminación de norovirus y virus de la hepatitis A.

Todavía dentro de la temática de la supervivencia de virus en el medio ambiente llama la atención que virus teóricamente muy parecidos muestren una muy distinta estabilidad estructural. El ejemplo claro lo constituyen dos virus de la familia *Picornaviridae*: poliovirus y el virus de la hepatitis A. El primero se inactiva con relativa facilidad y el segundo es un virus muy resistente. Datos generados dentro de proyectos del Plan Nacional de Biotecnología “Diagnóstico molecular del virus de la hepatitis A y estudio de su variabilidad genética y estabilidad estructural” y “Mejoras en el diagnóstico cuantitativo del virus de la hepatitis A y avances para la producción de antígenos mediante la adaptación de sus estrategias replicativas y estructurales” nos han llevado a hipotetizar sobre la base molecular de este distinto comportamiento. De hecho el virus de la hepatitis difiere molecularmente en muchos aspectos de los otros miembros de la familia, entre otras cosas en su incapacidad para inhibir la síntesis de proteínas de la célula hospedadora y en un uso de codones muy descompensado y desoptimizado respecto al de la célula para evitar la competencia con la misma. El resultado de todo ello es el uso de codones infrecuentes y un control muy fino de la cinética de traducción, especialmente de la región genómica correspondiente a las proteínas estructurales del virus. Uno de los objetivos de este comportamiento sería asegurar un correcto plegamiento de las proteínas de la cápside vírica. Consecuencias de todo lo anteriormente expuesto son un ciclo multiplicativo muy lento y fuertes constricciones estructurales que hacen que hasta la fecha sólo se haya descrito un serotipo del virus de la hepatitis A (siendo una excepción dentro de la familia) y que la cápside de este virus sea extraordinariamente cohesiva lo que explicaría su extraordinaria estabilidad estructural y resistencia a la inactivación.

Aparte de los temas anteriormente mencionados el grupo sigue dedicándose activamente al estudio de la replicación de astrovirus, virus para los cuales todavía existen

muchas incógnitas y en los cuales nos hemos ganado un reconocimiento que nos ha conducido a ocupar la presidencia del grupo especializado correspondiente en el Comité de Taxonomía de Virus (ICTV). Por otro lado, también se llevan a cabo estudios de los mecanismos de inducción y respuesta a interferón in vitro por parte de norovirus y astrovirus, que son totalmente distintos entre sí.

LISTADO DE LAS PRINCIPALES PUBLICACIONES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS DE LA UB DE LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS (2005-2010)

Libros

- A. Bosch, (Editor). Human Viruses in Water. Dentro de la serie Perspectives in Medical Virology Series, vol. 17, A. J. Zuckerman; I. K. Mushahwar, series Eds., Elsevier, Amsterdam, 2007, ISBN - 978-0-444-52157-6.
- M. Koopmans, D. O. Cliver & A. Bosch (Editores). Foodborne Viruses: Progress and challenges. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, D.C., USA, 2008, ISBN - 978-1-55581-464-9.

Capítulos de libro

- A. Bosch, F.X. Abad & R.M. Pintó. Human pathogenic viruses in the marine environment. En “Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment”, S. Belkin, R. Colwell (Eds.), 2005. Springer, New York, NY, pp 109-131.
- A. Bosch, R.M. Pintó & F.X. Abad. Survival and transport of enteric viruses in the environment. En “Viruses in Food”, S. M. Goyal (Ed.). Food Microbiology and Food Safety Series, 2006. Springer, New York, NY, pp 151-187.
- S. Guix, A. Bosch & R.M. Pintó. Astrovirus replication. En: Structure-based study of virus replication. H.R. Cheng & T. Miyamura (Eds). Editorial World Scientific Publishing, Hackensack, N.J., USA, 2007, pp 571-595. ISBN 981-270-405-1.
- R. M. Pintó and A. Bosch. Rethinking virus detection in food. En “Foodborne Viruses: Progress and challenges” M. Koopmans, D. O. Cliver & A. Bosch (Eds). ASM Press, Washington, D.C., USA, 2008, pp 171-188, ISBN - 978-1-55581-464-9.
- A. Bosch, D.H. Lees, C.H. von-Bonsdorff, R.M. Pintó, L. Croci, D. De Medici & F.S. Le Guyader. Detecting virus contamination in shellfish. En “Improving seafood products for the consumer”, T. Borresen (Ed.) Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra, 2008, pp 194-211, ISBN-1-84569 019-2
- J. Quer, M. Martell, F. Rodriguez, A. Bosch, R. Jardí, M. Buti & J. I. Esteban. The impact of rapid evolution of hepatitis viruses. En “Origin and evolution of viruses”, 2n edition, E. Domingo, R. Webster & J. J. Holland (Eds). Academic Press, New York, 2008, pp 303-349, ISBN-13: 978-0-12-220360-2.
- A. Bosch, R.M. Pintó, & F.S. Le Guyader. Viral contaminants of molluscan shellfish. En “Shellfish Safety and Quality”, S. Shumway & G. Rodrick (Eds). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra, 2009, pp 83-107, ISBN-978-1-84569-152-3.
- A. Bosch, Steffen Mueller & R.M. Pintó. Coding Biases and Viral Fitness. En “The Picornaviruses”, E. Ehrenfeld, E. Domingo & R.P. Roos (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 2010, pp 271-283, ISBN-13: 978-1-55581-603-2.
- A. Bosch, S. Guix, N.K. Krishna, E. Méndez, S.S. Monroe, M. Pantin-Jackwood & S. Schultz-Cherry. Astroviridae. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2010. A.M.Q. King et al. (eds). Elsevier, London, New York (En Prensa).



El Grupo de Investigación de Virus Entéricos de la UB en febrero de 2010, de izquierda a derecha: Mari Costafreda, Fran Pérez-Rodríguez, Julián Andrés Cruz, Cristina Ferrer-Orta, Susana Guix, Nerea Beguiristain, Lucía D'Andrea, Cristina Fuentes, Anna Altisent, Rosa M Pintó y Albert Bosch.

Artículos

- S. Guix, S. Caballero, A. Bosch & R.M. Pintó. Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. *Virology*, 2005, 333: 124-131.
- S. Guix, A. Bosch & R.M. Pintó. Human Astrovirus Diagnosis and Typing: Current and future prospects. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41:103-105.
- F.X. Abad, A. Bosch & C. Navarro. Implementation of Good Laboratory Practice in a University Research Unit. *Quality Assurance Journal*, 2005, 9 : 304-311.
- M.I. Costafreda, A. Bosch & R.M. Pintó. Development, Evaluation and Standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for the Quantification of Hepatitis A Virus in Clinical and Shellfish Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 3846-3855.
- I. Abid, S. Guix, M. Aouni, R.M. Pintó & A. Bosch. Detection and characterization of human group C rotavirus in the pediatric population of Barcelona, Spain. *Journal of Clinical Virology*, 2006, 38: 78-82.
- W. Morsy El-Senousy, S. Guix, I. Abid, R.M. Pintó & A. Bosch. Astrovirus removal from water and sewage treatment plants evaluated by a competitive RT-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 164-167.
- R.M. Pintó, D. Alegre, A. Dominguez, W.M. El-Senousy, G. Sánchez, C. Villena, M. I. Costafreda, LL. Aragonès & A. Bosch. Epidemiology of hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiology and Infection*, 2007, 135: 270-273.
- G. Sánchez, A. Bosch & R.M. Pintó. Under the microscope: Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45: 1-5.
- R.M. Pintó, LL. Aragonès, M.I. Costafreda, E. Ribes & A. Bosch. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus (Review article). *Virus Research*, 2007, 127: 158-163.
- S. Guix, S. Caballero, C. Fuentes, A. Bosch & R.M. Pintó. Genetic analysis of the hypervariable region of the human astrovirus nsP1a coding region: design of a new RFLP typing method. *Journal of Medical Virology*, 2008, 80: 306-315.
- LL. Aragonès, A. Bosch & R.M. Pintó. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *Journal of Virology*, 2008, 82: 1688-1700.
- A. Kroneman, J. Harris, H. Vennema, E. Duizer, J. Gray, M. Itturiza, B. Böttiger, K. Mølbak, C. Johnsen, C-H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Kuusi, P. Pothier, A. Gallay, E. Schreier, J. Koch, G. Szücs, G. Reuter, K. Kristalovics, M. Lynch, P. McKeown, B. Foley, S. Coughlan, F.M Ruggieri, I. Di Bartolo, K. Vainio, E. Isakbaeva, M. Poljsak-Prijatelj, A. Hocevar Grom, A. Bosch, J. Buesa, A. Sanchez Fauquier, G. Hernández-Pezzi, K-O Hedlund & M. Koopmans. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *Journal of Public Health*, 2008, 30: 82-90.
- A. Bosch, S. Guix, D. Sano & R.M. Pintó. Review article. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19: 295-301.
- A. Kroneman, L. Verhoef, J. Harris, H. Vennema, E. Duizer, Y van Duynhoven, J. Gray, M. Itturiza, B. Böttiger, G. Falkenhorst, C-H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Kuusi, P. Pothier, A. Gallay, E. Schreier, M. Höhne, J. Koch, G. Szücs, G. Reuter, K. Kristalovics, M. Lynch, P. McKeown, B. Foley, S. Coughlan, F.M Ruggieri, I. Di Bartolo, K. Vainio, E. Isakbaeva, M. Poljsak-Prijatelj, A. Hocevar Grom, J. Zimsek Mijovski, A. Bosch, J. Buesa, A. Sanchez Fauquier, G. Hernández-Pezzi, K-O Hedlund & M. Koopmans. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46: 2959-2965.
- J. Gómez-Segura, S. Caballero, V. Moreno, M.J. Prieto & A. Bosch. Palladium(II) Binding to N(7) of Acyclovir. DNA interaction and Herpes Simplex virus (HSV-1) inhibitory activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, 103: 128-134.
- F.S. Le Guyader, S. Parnaudeau, J. Schaeffer, A. Bosch, F. Loisy, M. Pommepuy & R.L. Atmar. Detection and quantification of norovirus in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 2009, 75: 618-624.
- C. Tortajada, P. G. de Olalla, R. M. Pinto, A. Bosch & J. Caylà. Outbreak of hepatitis A among men who have sex with men in Barcelona, Spain, September 2008 – March 2009. *Eurosurveillance*, 2009;14(15). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19175>
- M.L. Sagristá, F. Postigo, M. A. de Madariaga, R.M. Pintó, S. Caballero, A. Bosch, M.A. Vallés & M. Mora. Photodynamic inactivation of viruses by immobilized chlorin-containing liposomes. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2009, 13: 1-11.
- R.M. Pintó, M.I. Costafreda & A. Bosch. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 7350-7355.
- D. Sano, R.M. Pintó, T. Omura & A. Bosch. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44: 808-812.
- LL. Aragonès, S. Guix, E. Ribes, A. Bosch & R.M. Pintó. Fine-Tuning Translation Kinetics Selection as the Driving Force of Codon Usage Bias in the Hepatitis A Virus Capsid. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(3): e1000797. [doi:10.1371/journal.ppat.1000797](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000797)
- A. Bosch & F.S. Le Guyader (Guest Editors). Special Issue: Viruses in Shellfish. *Food and Environmental Virology* 2010, 2: 115-193.
- R.M. Pintó, M.I. Costafreda, F.J. Pérez-Rodríguez, L. D'Andrea & A. Bosch. Hepatitis A virus: State of the art. *Food and Environmental Virology* 2010, 2: 127-135.

Grupo de Investigación MARS

El Grupo de Investigación MARS, (Microbiología de Aguas Relacionada con la Salud) del Dpto. de Microbiología de la Univ. de Barcelona, es un grupo consolidado de investigación de la *Generalitat de Catalunya*. La actividad de investigación del mismo se desarrolla en diversos aspectos directa o indirectamente relacionados con la transmisión de infecciones a través del agua.

La diversidad de formación y la experiencia de los componentes del grupo dentro de los diferentes ámbitos de la Microbiología, confieren al grupo de investigación un carácter interdisciplinar, abarcando desde estudios de campo, métodos tradicionales, cultivo celular, hasta técnicas moleculares, incluyendo estudios en Virología, Bacteriología y Parasitología; análisis de aguas, alimentos y otras matrices. Esta interdisciplinaridad se complementa con colaboraciones externas con investigadores de otras áreas del conocimiento.

Los miembros del grupo están integrados por seis *senior* organizados en tres grupos de investigación. El primer grupo está formado por los Drs. Joan Jofre, Francisco Lucena, Anicet Blanch y Maite Muniesa. El segundo y tercer grupo están dirigidos por las Dras. Rosa Araujo y Rosina Gironés. MARS reúne además a otros 20 investigadores y cuatro técnicos.

Las líneas de investigación del grupo abarcan diferentes ámbitos como:

1. MEJORAS METODOLÓGICAS:

- 1.1. *Aplicación de técnicas genómicas*. Esta área abarca dos aspectos: a) Aplicación de PCR cuantitativa para detectar patógenos (adenovirus, *E. coli* O157, *Cryptosporidium*) e indicadores (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*) en muestras con matrices complejas y con un número muy bajo de unidades. b) aproximaciones metagenómicas (DGGE y posterior secuenciación) para la identificación y la detección de algunas bacterias (*Vibrio*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*) de difícil o complejo cultivo.
- 1.2. *Valoraciones de riesgo microbiológico en aguas (QMRA)*. Se emplean estos análisis, de diferentes patógenos, como herramientas de gestión de plantas y de tratamientos de aguas basadas en los principios de ARPCP (Análisis del Riesgo y Control de Puntos Críticos).
- 1.3. *Disponibilidad de cepas huésped específicas para la enumeración de fagos*. Búsqueda de huéspedes que nos permitan detectar la contaminación fecal de aquellas espe-

Dpto. de Microbiología; Univ. de Barcelona
Avenida Diagonal, 645; 08014 – Barcelona.
<http://www.ub.edu/mars/>

cies con mayor aporte de contaminación en nuestro territorio (vacas, cerdo y aves) para aislar cepas huéspedes de *Bacteroides* con el fin de detectar la contaminación fecal de origen humano y/o animal.

- 1.4. *Normalización y estandarización*. Se participa en redes internacionales para el desarrollo y estandarización de algunos métodos.

2. MICROBIOLOGIA BÁSICA DE ALGUNOS PATÓGENOS Y COMENSALES ENTÉRICOS:

- 2.1. *Interacciones bacteriófagos/bacterias entéricas*. Estudiar dos fenómenos: a) la importancia de la transferencia horizontal de genes relacionados con virulencia, y tal vez de genes de resistencia a antibióticos, de bacterias entéricas; b) la importancia de los bacteriófagos en la regulación de las densidades de bacterias entéricas.
- 2.2. *Mecanismos de regulación por quorum sensing*. Evaluación de la importancia de los autoinductores relacionados con sistemas *quorum sensing* en mecanismos selectivos de reconocimiento de los huéspedes de bacterias comensales (*Vibrio*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides*) y el papel potencial de este mecanismo en la implantación de dichas bacterias.
- 2.3. *Supervivencia y desinfección*. Estudios de supervivencia de diferentes patógenos e indicadores en el entorno natural y en procesos de desinfección, para prever y cuantificar riesgos, y poder utilizar los indicadores de contaminación fecal en la elaboración de modelos predictivos.

3. ESTUDIOS DE PREVALENCIA:

Los estudios de prevalencia se realizan considerando: a) patógenos, con especial atención a los patógenos emergentes que se transmiten a través del agua, y los indicadores en excrementos de diferentes orígenes, aguas residuales sucias y depuradas, aguas superficiales, aguas subterráneas, bidosólidos y alimentos en contacto con aguas contaminadas. b) microorganismos indicadores del origen de la contaminación fecal.

4. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR:

Los estudios de epidemiología molecular se realizan con algunos de los patógenos, sobre todo virus, de los que se ha estudiado su prevalencia.

5. INDICADORES MICROBIANOS ALTERNATIVOS:

Estudio de la potencial utilidad de indicadores alternativos (colifagos) a los actuales y del uso de técnicas genómicas para detectar patógenos en la validación y seguimiento de tratamientos de aguas atendiendo sobre todo al funcionamiento de nuevas tecnologías de tratamientos avanzados y en los procesos de higienización de lodos de depuradora.

Varios miembros del grupo pertenecen a diferentes **REDES**: Red Española de plásmidos y otros elementos móviles (REDEEX), Red Española de bacteriófagos y elementos transductores (FAGOMA) o la *European Network for Environmental and Food Virology* (ENVIRONET). Todos los miembros del grupo están inscritos en el Instituto del Agua de la Universidad de Barcelona y son miembros de la Red XRB (*Xarxa de Referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya* - Unidad de Microbiología Ambiental).

A título indicativo cabe mencionar algunos de los **proyectos de investigación** vigentes en la actualidad:

- Movilidad de factores de virulencia del patógeno alimentario *E. coli* O157: H7 y otros serotipos de *E. coli* enterohemorrágica (Ministerio de Ciencia e Innovación). IP: Maite Muniesa.
- *Protecting the food chain from prions: shaping European priorities through basic and applied research* (Priority). EU - FW7 222887-2. IP: Rosina Gironés.
- *Integrated risk analysis using molecular methods of microbial emergent pathogens in water and food: stability, disinfection and source tracking*. (Ministerio de Ciencia e Innovación). IP: Rosina Gironés.
- *Integrated monitoring and control of foodborne viruses in European food supply chains* (VITAL). (EU - Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnology). IP: Rosina Gironés.
- Estudio de la eficacia de la desinfección de las aguas de consumo frente a *Legionella* spp libre o como endosimbionte de protozoos aplicando métodos de cultivo y moleculares. (Ministerio de Ciencia y Tecnología). IP: Rosa Araujo.
- Procedimientos para la discriminación del origen de la contaminación fecal animal en el agua. (Ministerio de Ciencia y Tecnología). IP: Anicet Blanch.
- SOSTAQUA. Valoraciones de riesgo en aguas regeneradas. CDTI - ZENIT. IP: Joan Jofre - Francisco Lucena.

MARS mantiene contactos, ya sea sólo de colaboración o mediante contratos, con muchas empresas del sector, tanto aquellas implicadas en el abastecimiento de agua potable (Sociedad General de Aguas de Barcelona, Consorcio Ter-Llobregat,...), con la depuración (Consorcio de la Costa Brava, *Empresa Metropolitana de Sanejament S.A. EMSSA, ...*), con empresas de desarrollo de nuevas tecnologías (Veolia, Tecma,...), con la administración (Sanidad) o agencias públicas (*Agència Catalana de l'Aigua*). Nuestro objetivo es mantener esas colaboraciones (algunas de las cuales ya tienen más de 20 años) y, si es posible, ampliarlas a otros organismos y/o empresas.

PUBLICACIONES DEL GRUPO MARS DURANTE LOS AÑOS 2009-2010

- New multiplatform computer program for numerical identification of microorganisms. Flores, O; Belanche, LA; Blanch, AR. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, **47**: 4133-4135. 2009
- Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. Imamovic, L; Serra-Moreno, R; Jofre, J, M. Muniesa. *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*, **108**: 1105-1114. 2009.
- Phylogroups, virulence determinants and antimicrobial resistance in *stx(2)* gene-carrying *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. Garcia-Aljaro, C; Moreno, E; Andreu, A, et al. *RESEARCH IN MICROBIOLOGY*, **160**: 585-591. 2009.
- Detection of somatic coliphages through a bioluminescence assay measuring phage mediated release of adenylate kinase and adenosine 5'-triphosphate. Guzman Luna, Carolina; Costan-Longares, Ana; Lucena, Francisco, et al. *JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS*, **161**: 107-113. 2009.
- The persistence of bifidobacteria populations in a river measured by molecular and culture techniques. Bonjoch, X; Lucena, F; Blanch, AR. *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*, **107**: 1178-11835. 2009.
- Resistance of Faecal Coliforms and Enterococci populations in sludge and biosolids to different hygienisation treatments. Bonjoch, X; Blanch, AR. *MICROBIAL ECOLOGY*, **57**: 478-483. 2009.
- Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. Muniesa, M; Payan, A; Moce-Llivina, L, et al. *WATER RESEARCH*, **43**: 1559-1564. 2009.
- Is the replication of somatic coliphages in water environments significant? Jofre, J. *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*, **106**: 1059-1069. 2009.
- Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. Imamovic, L; Jofre, J; Schmidt, H, et al. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, **75**: 1764-1768. 2009.
- Genotypic and phenotypic diversity among induced, *stx(2)*-carrying bacteriophages from environmental *Escherichia coli* strains. Garcia-Aljaro, Cristina; Muniesa, Maite; Jofre, Juan, Blanch, Anicet. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, **75**: 329-336. 2009.
- Comparison of *Vibrio* spp. populations found in seawater, in exhibition aquaria, in fish intestine and in fish feed. Blanch, AR; Hispano, C; Bulto, P, et al. *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*, **106**: 57-65. 2009.
- Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006. Casanovas-Massana, A; Lucena, F; Blanch, AR. *JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS* Volume: 81 Issue: 1 Pages: 1-5 2010.
- Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. Balleste, E; Bonjoch, X; Belanche, LA, et al. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, **76**: 1789-1795. 2010.
- Water-borne infectious disease outbreaks associated with water scarcity and rainfall events. Jofre, Juan; Blanch, Anicet R.; Lucena, Francisco. *WATER SCARCITY IN THE MEDITERRANEAN: PERSPECTIVES UNDER GLOBAL CHANGE*: 147-159. 2010.
- Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* species in surface waters of a Mediterranean area and in its prevailing pollution sources. Rodríguez S, Araujo R. *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*. Published: 2010 (In press).
- Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples, quantified by qPCR. Imamovic, L; Ballesté, E, Jofre, J, M. Muniesa. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 2010 (In press).

Indicadores de contaminación microbiológica en agua

Taxonomía y epidemiología de los géneros “Aeromonas” y “Arcobacter”

María José Figueras Salvat y Roxana Beaz Hidalgo

Grupo MicroAqua, Unidad de Biología y Microbiología,
Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud,
Universidad Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 REUS.

EL GRUPO MICROAQUA

Centra su investigación en la Microbiología Ambiental prestando servicios externos de análisis y asesoramiento a la vez que estudia la taxonomía y epidemiología de los géneros bacterianos *Aeromonas* y *Arcobacter* que son considerados patógenos emergentes en el hombre, de los que se desconocen muchos aspectos relacionados con su taxonomía, virulencia, diversidad genética y prevalencia tanto en agua como en alimentos. Entre los servicios externos el más importante es el que se realiza ininterrumpidamente desde el año 1990 para la Agencia Catalana del Agua (ACA) del Departamento de Medio Ambiente del gobierno catalán y que consiste en el control microbiológico de todas las zonas de baño de Cataluña. Cada sábado durante las 17 semanas que dura la estación balnearia se analizan 250 muestras de agua para los indicadores de contaminación fecal y el diagnóstico de los resultados que proporcionamos cada martes al ACA, y que se difunde al público cada semana. Para poder realizar este servicio con las máximas garantías el grupo inició una línea de investigación con dos objetivos: 1. Evaluar la fiabilidad de los métodos de cultivo recomendados para el análisis de los indicadores de contaminación fecal y 2. Evaluar la capacidad de los indicadores de contaminación fecal para predecir la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Arcobacter*, etc. Los resultados de nuestros estudios han demostrado la poca fiabilidad de los métodos microbiológicos y la experiencia adquirida nos ha permitido actuar como asesores de diversos organismos como el Ministerio de Sanidad y Consumo, el Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino, la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Programa de Medio Ambiente de la Naciones Unidas (en su programa para la prevención de la contaminación del Mar Mediterráneo - MED POL) y la Comisión Europea en el diseño de la nueva Directiva para la gestión de la calidad de las aguas de baño (2006/7/CE) que aplicamos en la actua-

lidad. De especial relevancia han sido las aportaciones realizadas en las guías desarrolladas por la OMS para la monitorización de las aguas de baño en las que también colabora el Prof. Juan José Borrego de la Universidad de Málaga.

(http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/bathing3/en/index.html; http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1/en/).

En la actualidad, los principales objetivos se centran en definir el riesgo de contaminación microbiológica de las aguas de baño en función de los criterios de la nueva directiva Europea y evaluar sus posibles limitaciones, así como en validar su capacidad de proteger la salud de los bañistas mediante estudios epidemiológicos. Asimismo seguimos investigando métodos alternativos rápidos para establecer la calidad sanitaria de las aguas de baño.

El papel del agua como vehículo de transmisión de enfermedades es conocido, no obstante, existen muy pocos estudios epidemiológicos que evalúen cuantitativamente el riesgo real para las personas expuestas al agua de baño o al consumo de agua potable. En este sentido hemos realizado dos estudios epidemiológicos, como los mencionados, en dos proyectos Europeos EPIBATHE y HEALTHY WATER. En el primero, se reclutaron a 2.250 personas, para un estudio aleatorizado durante el cual mientras el grupo de bañistas se encontraba en el agua recogíamos muestras de las mismas cada 20 minutos. El principal objetivo era evaluar si los nuevos estándares de calidad incluidos en la nueva directiva Europea para el agua de baño (2006/7/EC) protegían suficientemente a los bañistas de cualquier riesgo de infección. Los resultados de este estudio realizado por nuestro grupo en las playas Catalanas, ha demostrado la capacidad de la Directiva para proteger la salud de los bañistas. El segundo proyecto tuvo como objetivo evaluar microorganismos emergentes en aguas potables mediante estudios epidemiológicos y moleculares. Entre nuestras responsabilidades se incluyeron los estudios sobre *Arcobacter* y *Aeromonas*,



De izquierda a derecha: Arturo Levican, Roxana Beaz-Hidalgo, Carolila Sivera, Kendra Rodriguez, Catalina Nuñez, María José Figueras y Kathiusca Paredes.

así como la preparación de materiales formativos para difundir los *Water Safety Plans*, basados en la metodología del Análisis de Peligro y Puntos de Control Crítico desarrollados por la OMS para la industria del agua potable, considerando que estos serán de aplicación obligatoria según la modificación de la actual Directiva para el agua potable.

TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE AEROMONAS

Nuestro grupo tiene una amplia trayectoria en el estudio de este complejo de bacterias autóctonas del medio acuático capaces de producir infecciones gastrointestinales y extraintestinales en humanos (Figueras, 2005) así como diversas patologías en peces (Beaz-Hidalgo, 2010). Muchos de los estudios se han realizado en colaboración del Dr. Antonio Martínez-Murcia, profesor de la Universidad Miguel Hernández y director del *Molecular Diagnostic Center* (MDC) de Orihuela. Los objetivos se han centrado en: 1. Evaluar la incidencia de *Aeromonas* en muestras de origen clínico y ambiental para estudiar la taxonomía y filogenia del género y desarrollar técnicas de identificación molecular rápidas y fiables; 2. Determinar la presencia de genes que codifican factores de virulencia y estudiar los mecanismos de patogenicidad y 3. Investigar la epidemiología de especies de interés clínico.

La poca fiabilidad de los métodos fenotípicos para la identificación de *Aeromonas* tanto a nivel de especie como de género, demostrada repetidas veces (Figueras, 2005; Beaz-Hidalgo, 2010 y otras referencias incluidas en estos estudios), motivaron el desarrollo de una sonda específica de género (Chacón *et al.*, 2002) y de un método (RFLP-16S ARNr) que permitía la identificación de todas las especies descritas hasta entonces (Borrel *et al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000). El gen ARNr 16S no es útil para la identificación de *Aeromonas* spp. ya que la mayoría de especies muestran similitudes >99% (Beaz-Hidalgo

et al., 2009; Alperi *et al.*, 2010; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Figueras *et al.*, en prensa a) y además un 8.1% de las cepas presentan mutaciones en alguna de las copias de los operones de este gen (Alperi *et al.*, 2008). Este hallazgo nos llevó a centrar los estudios filogenéticos del género en las secuencias de genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, etc.) no estudiados hasta entonces, demostrando el gran poder discriminativo que tienen estos genes (Yañez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004) y su capacidad para caracterizar especies clínicas y ambientales cuya prevalencia estaba enmascarada por identificaciones incorrectas (Figueras, 2005; 2009; en prensa b; Alperi *et al.*, 2008; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009; 2010; Figueras *et al.*, 2009). Muy recientemente, el MDC ha realizado el primer análisis filogenético con las secuencias de 7 genes *housekeeping* (MLPA) en el que hemos colaborado (Martínez-Murcia *et al.*, en revisión en *Syst. Appl. Microbiol.*). Además, 5 de estos genes nos han sido de gran utilidad para caracterizar cinco especies nuevas para el género: *A. fluvialis*, *A. piscicola*, *A. sanarellii*, *A. taiwanensis* y *A. rivuli* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009, 2010; Alperi *et al.*, 2010 b,c; Figueras *et al.*, en prensa a).

Con respecto a la virulencia y epidemiología, hay que destacar que describimos por primer vez en cepas clínicas la presencia del Sistema de Secreción de Tipo III (T3SS) (Chacón *et al.* 2004) y que gracias a la experiencia de los Drs. Juan Tomás y Susana Merino de la Universidad de Barcelona pudimos describir conjuntamente la secuencia completa de los 35 genes que constituyen el T3SS de *Aeromonas* (Viches *et al.* 2004). Además, nuestro grupo ha descrito un nuevo caso de síndrome urémico hemolítico (SUH) asociado a *Aeromonas* (Figueras *et al.*, 2007) y recientemente hemos detectado la presencia de los genes que codifican las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*), responsables del SUH, en cepas de este género (Alperi y Figueras, 2010a). Actualmente seguimos trabajando en los mismos objetivos y colaborando con diversos hospitales, para los que identificamos genéticamente las cepas pertenecientes a este género.

TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE ARCOBACTER

El género *Arcobacter* fue propuesto en el año 1991 a partir de especies incluidas previamente en el género *Campylobacter* y sus especies son capaces de producir gastroenteritis y bacteremias en humanos así como numerosas patologías en animales (diarrea, mastitis, abortos) (Collado y Figueras, en revisión en *Clin. Microbiol. Rev.*). Los objetivos planteados para este género son similares a los descritos para *Aeromonas*. A pesar de que esta línea de investigación se inició en el año 2007, ha resultado ser muy productiva. Hemos demostrado por primera vez que la presencia de *Arcobacter* en agua está asociada a la contaminación fecal (Collado *et al.*, 2008; 2010) y constatado su elevada prevalencia en muestras de carne y moluscos (Collado *et al.*, 2009b). Desde la perspectiva de la Salud Pública estos resultados son muy relevantes, ya que recientemente estos microorganismos se han asociado a brotes hídricos. Además, se ha desarrollado el primer método de identificación molecular que permite reconocer todas las especies del género (RFLP-ARNr 16S) descritas hasta entonces (Figueras *et al.*, 2008) y su aplicación nos permitió reconocer tres especies nuevas: *A. mytili* y *A. molluscorum*, aisladas de mejillones (Collado *et al.*, 2009a; Figueras *et al.*, en revisión en *Syst. Appl. Microbiol.*) y *A. defluvii* aislada de aguas residuales (Collado *et al.*, en prensa). En la actualidad, estamos caracterizando otras posibles nuevas especies y optimizando los métodos de cultivo, detección e identificación. Asimismo, en colaboración con el MDC, estamos preparando el primer análisis filogenético del género basado en 5 genes *housekeeping*. También se determinará la patogenicidad de las distintas especies utilizando cultivos celulares y se desarrollarán métodos para establecer la presencia de genes que codifiquen sus factores de virulencia.

REFERENCIAS

- Alperi A, Figueras MJ. (2010 a) Shiga toxin (*stx1* and *stx2*) genes in *Aeromonas* clinical strains show sequences which are highly similar to those of the most virulent human variants of shiga toxin producing *E. coli*. *Clin. Microbiol. Infec.* **16**: 1563-1567.
- Alperi A, Figueras MJ, Inza I, Martínez-Murcia AJ. (2008). Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int. Microbiol.* **11**: 185-194.
- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. (2010 b). *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 72-77.
- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, KO WC, Morena A, Saavedra MJ, Figueras MJ. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., two new clinical species from Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 2048-2055.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Figueras MJ, Romalde JL. (2009). *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**: 471-479.
- Beaz Hidalgo R., Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ. (2010 c). Comparison of biochemical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* **33**: 149-153.
- Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1671-1674.
- Chacón MR, Castro-Escarpullí G, Soler L, Guarro J, Figueras MJ. (2002). A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**: 221-225.
- Chacón MR, Soler L, Groisman EA, Guarro J, Figueras MJ. (2004). Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1285-1287.
- Collado L, Cleenwerck I, Van Trappen S, De Vos P, Figueras MJ. (2009a). *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:1391-1396.
- Collado I, Figueras MJ. The genus *Arcobacter*: A review of its taxonomy, epidemiology and importance. *Clin Microbiol. Rev.* (en prensa).
- Collado L, Guarro J, Figueras MJ. (2009b). Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *J. Food. Prot.* **72**: 1102-1106.
- Collado L, Inza I, Guarro J, Figueras MJ (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environ. Microbiol.* **10**: 1635-1640.
- Collado L, Kasimir G, Perez U, Bosch A, Pinto R, Saucedo G, Huguet JM, Figueras MJ. (2010). *Water Res.* **44**:3696-702.
- Collado L, Levican A, Perez J, Figueras MJ. *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (en prensa).
- Figueras MJ. (2005). Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev. Med. Microbiol.* **16**: 145-153.
- Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. (2000). Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2023-2025.
- Figueras MJ, Aldea MJ, Fernández N, Aspíroz C, Alperi A, Guarro J. (2007). *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**: 231-234.
- Figueras MJ, Collado L, Guarro J. (2008). A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**:11-15.
- Figueras MJ, Alperi A, Saavedra MJ, Ko WC, Gonzalo N, Navarro M, Martínez-Murcia A. (2009). Clinical relevance of the recently described *Aeromonas aquariorum*. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 3742-3746.
- Figueras MJ, Alperi A, Beaz-Hidalgo R, Stackebrandt E, Brambilla E, Monera A, Martínez-Murcia AJ. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet in Germany. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (en prensa a, doi:10.1099/ijs.0.016139-0).
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Yigal S, Sivian L, Halpern H. Re-identification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum*. *Env. Microbiol. Rep.* (en prensa b).
- Figueras MJ, Collado L, Levican A, Perez J, Solana MJ, Yustes C. *Arcobacter molluscorum* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst. Appl. Microbiol.* (en revisión).
- Martínez-Murcia A, Moreno A, Saavedra MJ, Ocina R, López-Álvarez M, Lara E, Figueras MJ. Multilocus Phylogenetic Analysis of the Genus *Aeromonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* (en revisión).
- Soler L, Yañez MA, Chacón MR, Aguilera-Arreola MG, Catalán V, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1511-1519.
- Vilches S, Urgell C, Merino S, Chacón M, Soler L, Castro-Escarpullí G, Figueras MJ, Tomás JM. (2004). Complete Type III Secretion System of a Mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6914-6919.
- Yañez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**: 875-883.

Microbiología de los ambientes acuáticos hipersalinos

Antonio Ventosa

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

El Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla tiene una larga trayectoria en el estudio de la biodiversidad de los ambientes hipersalinos. Aunque sea una definición un tanto simplista, se consideran ambientes hipersalinos aquellos que poseen una concentración salina elevada, generalmente muy superior a la de los hábitats acuáticos marinos y oceánicos. En estos ambientes no sólo la elevada concentración salina limita la microbiota de los mismos, si no que otros factores tales como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto o las radiaciones solares pueden influir seleccionando los tipos de seres vivos que los habitan, que son microorganismos extremófilos que no solo toleran estas condiciones adversas, sino que en muchos casos se encuentran perfectamente adaptados a las mismas y de hecho, requieren para su desarrollo determinadas concentraciones de sal, siendo incapaces de crecer en condiciones de baja salinidad o en ausencia de la misma.

Entre los ambientes hipersalinos que hemos estudiado con más detalle se encuentran las salinas solares de estanque múltiple tan abundantes en nuestras costas españolas y los lagos hipersalinos. Entre las primeras se encuentran las salinas de Santa Pola (Alicante), Huelva, Cádiz, Mallorca o Gran Canaria; en diversos estudios también hemos realizado importantes aportaciones en lagos como el Mar Muerto, lagos hipersalinos localizados en Mongolia Interior (China) y más recientemente en zonas áridas de Irán.

Las salinas solares constituyen sistemas muy interesantes para estudios de biodiversidad y ecología de los ambientes hipersalinos, teniendo en cuenta que las mismas consisten en una serie de estanques con diferentes salinidades, que permiten concentrar el agua salina desde concentraciones bajas como la del agua de mar hasta la saturación de sales, disponiendo por tanto de toda una gama de salinidades que permite la realización de estudios en cada una de las etapas crecientes de salinidad, a diferencia de los lagos hipersalinos, cuya concentración salina es generalmente mucho más estable y por tanto los estudios de biodiversidad son más limitados en cuanto al parámetro salinidad. La abundancia de las salinas tanto costeras como de interior en nuestro país ha permitido que numerosos grupos de investigación en

Sevilla, Granada, Alicante, Mallorca, Barcelona, Madrid, etc. hayan realizado numerosos estudios microbiológicos en las mismas y que en conjunto hayan realizado importantes aportaciones al conocimiento de la microbiota, su actividad metabólica y a las numerosas aplicaciones de los microorganismos halófilos, tanto como modelos biológicos para el estudio de los mecanismos de estrés y supervivencia en condiciones extremas, así como para su utilización en procesos biotecnológicos (producción de solutos compatibles, polímeros y enzimas, utilización en la producción de alimentos, en procesos de biodegradación, etc.).

En los ambientes hipersalinos con más de un 10 % de sales son pocos los organismos eucariotas que forman parte de la microbiota normal de los mismos y fundamentalmente se trata de organismos procariotas, tanto pertenecientes a las arqueas como a las bacterias. Entre los eucariotas que podemos observar en hábitats con salinidades intermedias se encuentran el crustáceo *Artemia salina* o el alga unicelular *Dunaliella*, que puede crecer óptimamente en sistemas con concentraciones de sales de hasta el 20-25 %. Sin embargo, en los hábitats más hipersalinos solamente se encuentran procariotas, pertenecientes tanto al grupo de las arqueas como de las bacterias. Entre las arqueas se encuentran alguna especie metanógenas y fundamentalmente un grupo muy especializado de arqueas aerobias halófilas extremas denominadas haloarqueas. Estas haloarqueas se encuadran actualmente en el orden *Halobacteriales*, con una única familia *Halobacteriaceae* que incluye 29 géneros y más de 100 especies. A modo de ejemplo, cuando comenzamos a realizar estudios en estos ambientes hipersalinos las haloarqueas (entonces denominadas halobacterias, pues se incluían entre las bacterias si bien se consideraban bastante peculiares por sus características tales como la carencia de mureína en su pared celular o la presencia de lípidos polares muy diferentes a los de las otras bacterias) se agrupaban en tan solo dos géneros, *Halobacterium* (especies con morfología bacilar) y *Halococcus* (formas esféricas), desconociéndose que la mayoría de las haloarqueas poseen morfologías muy diversas que van desde células triangulares, poligonales o cuadradas (como la famosa especie *Haloquadratum walsbyi*). En este



Estanques (cristalizadores) de una salina en la que se observa la coloración rosa-roja debido al abundante desarrollo de microorganismos halófilos.

sentido, nuestro grupo (y otros grupos de investigadores de nuestro país) ha realizado importantes aportaciones, describiendo numerosas nuevas especies y géneros de procariontas, en muchos casos en colaboración con otros grupos de investigadores tanto españoles como de otros países. Por su trascendencia debemos citar la descripción de los géneros *Haloferax* y *Haloarcula* (en colaboración con investigadores de Alicante, Dres. Rodríguez Valera, Juez y Torreblanca y los Dres. Kates y Kamekura) y *Haloterrigena* (en colaboración con el Dr. Kamekura), que actualmente incluyen 11, 7 y 8 especies, respectivamente. Sin duda algunos de nuestros estudios más significativos se han basado en el conocimiento de las bacterias halófilas, que habitan junto con las haloarqueas en los ambientes hipersalinos. Estos estudios han sido pioneros y muchas de las bacterias aisladas y caracterizadas por nosotros son objeto de estudios más detallados por parte de otros muchos grupos de investigación, tal es el caso de las bacterias Gram negativas pertenecientes a los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*. Recientemente hemos realizado un estudio basado en el análisis por secuenciación multilócica (MLSA-Multilocus Sequence Analysis) de las especies, actualmente agrupadas en 10 géneros, pertenecientes a la familia *Halomonadaceae*. El análisis de las secuencias individuales y concatenadas de seis genes (16S rRNA, 23S rRNA, *atpA*, *gyrB*, *rpoD* y *secA*) nos ha permitido determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de este grupo microbiano, poner de manifiesto la importancia de la transferencia horizontal de genes en la evolución de dichas especies y establecer un esquema de clasificación basado en sus relaciones evolutivas.

Particularmente interesantes fueron los estudios relacionados con la microbiota del Mar Muerto que dieron lugar a los estudios de Tesis Doctoral de David Ruiz Arahal (actualmente en la Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia). El estudio permitió realizar un análisis comparativo de la microbiota de dicho lago, utilizando los mismos enriquecimientos que entre 1936 y 1940 Benjamin Elazari-Volcani usó para sus estudios pioneros en el campo del halo-

filismo, en los que puso de manifiesto que no se trataba de un mar “muerto” y que 50 años después y utilizando tanto las técnicas tradicionales como moleculares de caracterización mostraron una enorme diversidad tanto de bacterias halófilas como de haloarqueas (curiosamente incluyendo la especie *Haloferax volcanii* que fue denominada en su honor hace algunos años).

Nos gustaría resaltar que siempre hemos considerado fundamental que la investigación debe basarse en grupos de investigación amplios y trabajando en estrecha colaboración con otros grupos de prestigio nacionales y extranjeros; este hecho se refleja en que un gran porcentaje de nuestras publicaciones han sido realizadas en colaboración con otros grupos. En este sentido, debemos destacar un amplio estudio basado en un proyecto internacional, financiado a través de la Comisión Europea (*MGATech-Multigenome Access Technology for Industrial Catalysts*) y los gobiernos chino y sudafricano, en siete lagos hipersalinos de Mongolia Interior (China) y en los que además de nuestro grupo participaron los de los Dres. Grant (Universidad de Leicester, UK), Cowan (Universidad de Western Cape, Ciudad del Cabo, Sudáfrica), Jones (Genencor International, Holanda) y Yanhe Ma (Instituto de Microbiología, CAS; Beijing, China). Además de estudios relacionados con metagenómica, caracterización de halovirus o de nanoarqueas de ambientes hipersalinos, la aportación al conocimiento de la microbiota de dichos lagos hipersalinos (y alcalinos en el caso de dos de dichos lagos) ha sido de gran importancia. Utilizando técnicas moleculares (secuenciación del gen 16S rRNA) pusimos de manifiesto que la microbiota tanto de arqueas como de bacterias era mucho mayor de la que se había descrito hasta la fecha en ambientes semejantes. Por otro lado, muchos de estos microorganismos poseían características muy diferentes a las de los descritos anteriormente; sirva como ejemplo que en este estudio se aislaron y caracterizaron un número muy elevado de nuevos grupos de procariontas, algunos de los cuales todavía están en estudio, que nos ha permitido la descripción de 3 nuevos géneros y 12 nuevas especies de halo-

arqueas y 4 nuevos géneros y 9 nuevas especies de bacterias halófilas. Es indudable que algunos de estos nuevos microorganismos pueden ser utilizados en el futuro como modelos de estudio por otros grupos de investigadores en campos diversos como genómica o biotecnología.

A lo largo de los años nuestros estudios se han ido adaptando a las tecnologías al uso, inicialmente basados en el aislamiento y caracterización siguiendo las técnicas microbiológicas tradicionales, posteriormente quimiotaxonómicas y genéticas y más recientemente moleculares. Actualmente estamos realizando estudios en colaboración con las Dras. Emilia Quesada y Victoria Béjar, de la Universidad de Granada, financiados a través de un proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía, encaminados a la caracterización de nuevos grupos de microorganismos halófilos y a su posible aplicación en la producción de compuestos de interés biotecnológico. Por otro lado, estamos iniciando estudios de metagenómica en ambientes hipersalinos, precisamente en las mismas salinas que sirvieron para nuestras primeras investigaciones, localizadas en Santa Pola (Alicante) y en salinas de la provincia de Huelva, en estrecha colaboración con el grupo del Dr. Francisco Rodríguez Valera, de la Universidad Miguel Hernández de Alicante. Los resultados iniciales en dos estanques seleccionados, uno con salinidad intermedia y un cristalizador, son muy prometedores, confirmando muchas de las conclusiones de estudios de biodiversidad realizados anteriormente utilizando técnicas tradicionales, si bien observamos una mayor diversidad y sobre todo la presencia de grupos de microorganismos no relacionados con los aislados y descritos hasta la actualidad; el reto será diseñar nuevas estrategias que nos permitan proceder a su aislamiento y al estudio del papel que dichos microorganismos puedan jugar en estos sistemas salinos.

PUBLICACIONES RECIENTES SELECCIONADAS

- A.M. Castillo, M.C. Gutiérrez, M. Kamekura, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2006). *Halostagnicola larsenii* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1519-1524.
- M.C. Gutiérrez, A.M. Castillo, M. Kamekura, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2007). *Halopiger xanaduensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from saline lake Shangmatala in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1402-1407.
- I.J. Carrasco, M.C. Márquez, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2008). *Sediminibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1961-1967.
- M.C. Márquez, I.J. Carrasco, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2008). *Aquisalibacillus elongatus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium of the family *Bacillaceae* isolated from a saline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1922-1926.
- C. Sánchez-Porro, E. Mellado, A. P. Pugsley, O. Francetic and A. Ventosa (2009). The haloprotease CPI produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas ruthenica* is secreted by the type II secretion pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4197-4201.
- E. Pagalin, H. Wang, M. Venables, A. Wallace, W. D. Grant, D. A. Cowan, B. E. Jones, Y. Ma, A. Ventosa and S. Heaphy (2009). Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5750-5760.
- C. Sanchez-Porro, M. A. Amoozegar, R. Robban, M. Hajighasemi and A. Ventosa (2009). *Thalassobacillus cyri* sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 2565-2570.
- R. R. de la Haba, D. R. Arahál, M. C. Márquez and A. Ventosa (2010). Phylogenetic relationships within the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rRNA gene sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 737-748.

Microbiota de moluscos

Jesús López Romalde

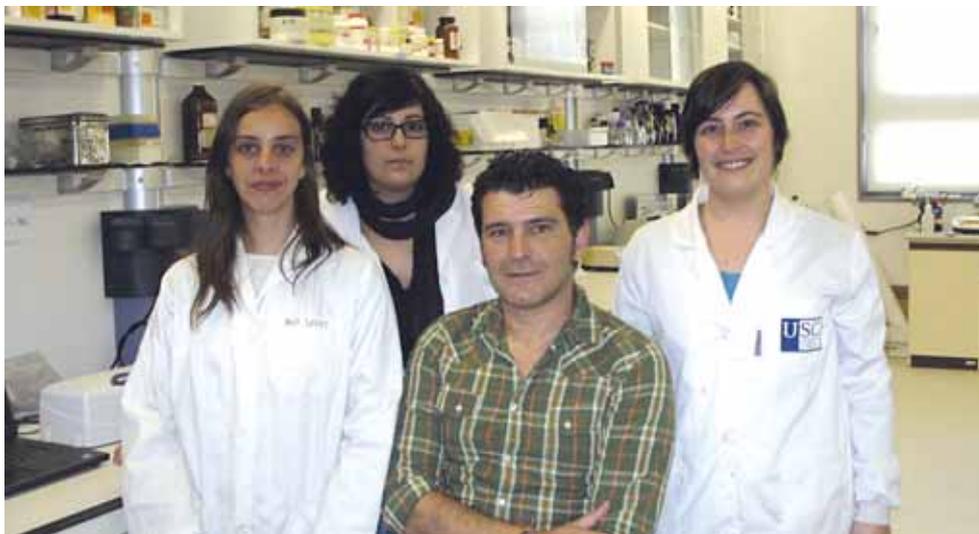
Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS-Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela

El cultivo de moluscos bivalvos en Galicia tiene gran importancia económica, ya que es una de las actividades de producción primaria esenciales en la región y presenta un mercado consolidado. Durante mucho tiempo la semilla necesaria procedía de la captación natural, pero en los últimos años el cultivo de ostra y almeja se enfrenta a una importante disminución de los bancos naturales, achacable a la sobreexplotación y a la entrada de moluscos de importación, tanto en fase larvaria como incluso de ejemplares adultos. Por otro lado, la producción de semilla en criaderos no está

garantizada debido a mortalidades fulminantes que pueden acabar con la producción en pocos días. Además, la introducción de importaciones, difíciles de controlar, aumenta el riesgo de entrada de nuevas enfermedades. De hecho, en las poblaciones en cultivo son también frecuentes los episodios de mortalidad, afectando principalmente a la almeja fina, más susceptible que otras especies de bivalvos.

Aunque se han realizado estudios sobre el estado sanitario de las poblaciones de moluscos bivalvos, la mayoría de estos trabajos se han centrado en enfermedades parasita-

Algunos de los miembros del Grupo (de izquierda a derecha: Ana L. Diéguez (investigadora contratada), Alejandra Doce (Becaria María Barbeito [Xunta de Galicia]), Jesús L. Romalde (Catedrático), Sabela Balboa (Becaria FPI).



rias. En el caso de las enfermedades bacterianas, los trabajos son escasos consistiendo, muchas veces, en la búsqueda específica de la enfermedad del anillo marrón mediante la observación macroscópica de los bivalvos. Cabe destacar la ausencia de estudios sobre la presencia de otras bacterias potencialmente patógenas en las poblaciones de bivalvos, en cultivo o naturales, en las diferentes zonas productoras de nuestro país, a excepción de unos estudios preliminares llevados a cabo en Andalucía en cultivos de almeja fina por el grupo del Dr. Borrego y la Dra. Castro.

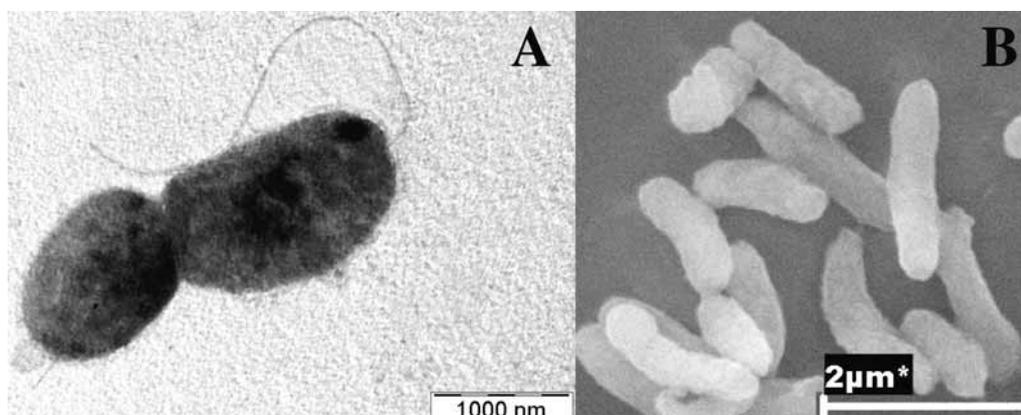
En la naturaleza no existen moluscos libres de bacterias, pero la distinción entre especies o cepas no patógenas y las verdaderamente patógenas no suele ser fácil, así como no lo es el análisis de los factores determinantes de la capacidad de virulencia de una especie o cepa determinada. En algunos casos hay evidencias de que pueda ser más un aspecto cuantitativo, ya que concentraciones altas de una cepa pueden provocar la muerte de los moluscos, mientras que concentraciones bajas son toleradas sin producir la muerte ni síntomas de enfermedad. El estrés parece ser otro factor importante en el control de la susceptibilidad de bivalvos a infecciones bacterianas.

El equipo de la Universidad de Santiago comenzó sus trabajos de patología de moluscos en la década de los 80, con el análisis de vibrios patógenos para ostra. A partir de los años 90 comienza su colaboración con el equipo de la Universidad de Málaga para el análisis genético de *V. tapetis*, agente causal de la enfermedad del anillo marrón en la almeja. Durante los últimos años, con el apoyo de diferentes cofradías gallegas, y gracias a la obtención de diferentes proyectos del Plan Nacional, nos hemos centrado en el estudio de la microbiota de bivalvos, tanto de bancos naturales como en cultivo, incluyendo fases larvianas, juveniles y adultas. Para ello hemos aplicado aproximaciones polifásicas que correlacionen fenotipo y genotipo de patógenos potenciales, así como la evaluación de factores de virulencia. Estos estudios nos están permitiendo conocer el estado sanitario actual, desde el punto de vista bacteriológico, de estas pobla-

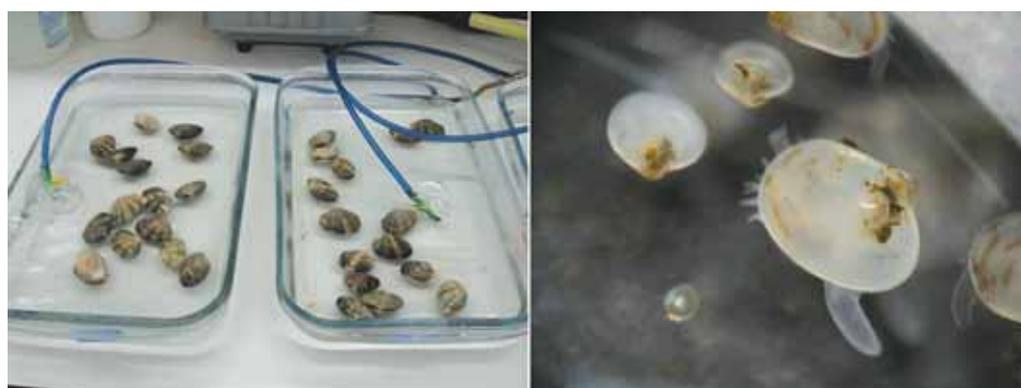
ciones, lo que redundará en el desarrollo de métodos de detección de los principales patógenos y el establecimiento de medidas preventivas de mortalidad. En este sentido, estamos estudiando de forma paralela la capacidad probiótica de bacterias asociadas a dichos cultivos.

Durante varios años se han realizado muestreos mensuales de almejas procedentes de cuatro cofradías gallegas, caracterizándose los principales grupos bacterianos detectados. Los muestreos han dado lugar a una colección de más de 3.000 cepas bacterianas. En la caracterización de las cepas fermentativas se observó una gran prevalencia de diferentes especies del género *Vibrio*. Así, del total de cepas fermentativas, el 77,67 % pertenecían al género *Vibrio*, el 17,35 % al género *Aeromonas* y el 4,98 % fueron aislados fermentativos aún no identificados. La caracterización polifásica, incluyendo métodos fenotípicos, genético-moleculares (AFLP, secuenciación, hibridación DNA-DNA) y quimiotaxonómicos mostró una gran diversidad entre los aislados estudiados. La mayoría de las cepas se identificaron como pertenecientes a especies conocidas dentro de la familia *Vibrionaceae*, como *V. alginolyticus*, *V. cyclitrophicus*, *V. diabolicus*, *V. kanaloae*, *V. pacinii*, *V. splendidus*, *V. tapetis* y *Aliivibrio (Vibrio) fischeri*. *Vibrio splendidus* formó un grupo muy heterogéneo, agrupándose algunos de nuestros aislados en varios *clusters* diferenciados que constituyeron nuevas especies. Así, hemos descrito cinco nuevas especies dentro del género *Vibrio*: *V. breoganii*, *V. gallaecicus*, *V. artaborum*, *V. atlanticus* y *V. celticus*, esta última con potencial patogénico para almeja, y una nueva especie dentro del género *Aliivibrio*: *A. finisterrrensis*, algunas de ellas en colaboración con el equipo del Dr. De Vos de la BCCM/LMG. Por otro lado, hemos descrito *V. ostreicida* como agente responsable de mortalidad en larvas de ostra en criadero.

Con respecto a los aislados con metabolismo respiratorio, la identificación de los grupos obtenidos en una caracterización preliminar en base a pruebas fenotípicas fue bastante complicada debido a la carencia en la literatura de claves apropiadas, hecho posiblemente relacionado con la elevada



Fotografías electrónicas de transmisión (A) y de barrido (B) de la cepa tipo de *Aliivibrio finistrensis* CMJ 11.1^T.



Fotografías electrónicas de transmisión (A) y de barrido (B) de la cepa tipo de *Aliivibrio finistrensis* CMJ 11.1^T.

diversidad de estas bacterias, incluso dentro de un mismo género o especie. Se sometió a los aislados de los distintos grupos a experimentos de secuenciación del gen del RNA ribosómico 16S, con el fin de determinar correctamente la adscripción de los mismos a especies bacterianas concretas. Los resultados obtenidos, indican que los géneros predominantes son *Pseudoalteromonas* (55 %) y *Alteromonas* (15 %). De los aislados asignados al género *Pseudoalteromonas* sólo un 36 % pudieron ser asignados a una especie concreta, como *P. haloplanktis*, *P. espejiana*, *P. issachenkonii* o *P. citrea*, quedando el resto de aislados identificados como *Pseudoalteromonas* sp. En el caso del género *Alteromonas*, ninguna de las secuencias obtenidas se relacionó con especies ya conocidas del género.

Otros géneros detectados en menor proporción son *Tenacibaculum* (*T. mesophilum*, *Tenacibaculum* sp.), *Psychrobacter* (*Ps. aquimaris*, *Ps. nivimaris*), *Shewanella* (*S. colwelliana*, *S. fidelia*, *S. halifaxensis*), *Polaribacter*, *Luteimonas*, *Kopriimonas*, *Lacitrix*, *Marinomonas*, o *Cobetia*. Asimismo se han detectado algunos aislados pertenecientes a géneros de bacterias Gram positivas como *Arthrobacter* o *Nesterenkonia*.

La falta de correlación entre los grupos bioquímicos y los resultados de secuenciación, nos indicó la existencia de un número importante de posibles especies nuevas en estos géneros bacterianos. Debido a la imposibilidad de caracterizar en profundidad por métodos moleculares la colección completa de aislados, se hizo una selección de los mismos para el estudio de factores de virulencia que fue realizado en colaboración con el grupo de los Drs. Borrego y Castro

de la Universidad de Málaga. Además, llevamos a cabo con las cepas seleccionadas diferentes ensayos de inoculaciones experimentales en larvas de almeja. En estos experimentos se demostró el potencial patogénico de 6 aislados, uno perteneciente a la especie *Tenacibaculum mesophilum* (descrita hasta ahora como especie ambiental), un aislado relacionado a las especies *Pseudoalteromonas citrea/aurantia*, otro como cercano a la especie *Alteromonas genovensis* y tres identificados sólo a nivel de género como *Pseudoalteromonas* spp., que constituirán nuevas especies dentro del género en función de los resultados obtenidos.

Además, dentro de las especies oxidativas caracterizadas hemos detectado algunas con potencial probiótico (algunas especies de *Pseudoalteromonas*), cuya caracterización polifásica se está abordando en la actualidad, gracias a la obtención de financiación para dos nuevos proyectos, uno del Plan Nacional (AGL2010-18438) y uno dentro del 7º Programa Marco europeo (REPROSEED).

ÚLTIMAS PUBLICACIONES DEL GRUPO INVESTIGADOR

- Beaz-Hidalgo, R., I. Cleenwerck, S. Balboa, M. De Wachter, F. Thompson, J. Swings, P. De Vos & J.L. Romalde. 2008. Diversity of *Vibrios* associated with reared Galician clams. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 215-222.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Doce, J. Pascual, A.E. Toranzo & J.L. Romalde. 2009. *Vibrio gallaecicus* sp. nov. isolated from cultured clams in Northwestern Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 111-117.

- Beaz-Hidalgo, R., I. Cleenwerck, S. Balboa, M. De Wachter, F. Thompson, J. Swings, P. De Vos & J.L. Romalde. 2008. Diversity of *Vibrios* associated with reared Galician clams. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 215-222.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Doce, J. Pascual, A.E. Toranzo & J.L. Romalde. 2009. *Vibrio gallaecicus* sp. nov. isolated from cultured clams in Northwestern Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 111-117.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Alperi, M.J. Figueras & J.L. Romalde. 2009. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 471-479.
- Prado, S., J. Montes, J.L. Romalde & J.L. Barja. 2009. Marine bacteria from genus *Phaeobacter* with inhibitory activity against aquaculture pathogens. *International Microbiology* 12: 107-114.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Doce, S. Balboa, J.L. Barja & J.L. Romalde. 2010. *Aliivibrio finisterrensis* sp. nov. isolated from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and emended description of the genus *Aliivibrio*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 223-228.
- Beaz-Hidalgo, R., S. Balboa, J.L. Romalde & M.J. Figueras. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports* 2: 34-43.
- Gómez-Gil, B., A. Roque, G. Rotllant, L. Peinado, J.L. Romalde, A. Doce, H. Cabanillas-Beltrán, L. Chimetto, & F.L. Thompson. 2010. *Photobacterium swingsii* sp. nov. isolated from marine organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (En prensa).
- Beaz-Hidalgo, R., Diéguez, A.L., I. Cleenwerck, S. Balboa, A. Doce, P. de Vos & J.L. Romalde. 2010. *Vibrio celticus* sp. nov., a new species within the Splendidus clade with pathogenic potential for clam. *Systematic and Applied Microbiology* doi: 10.1016/j.syapm.2010.06.007
- Diéguez A.L., R. Beaz-Hidalgo, I. Cleenwerck, S. Balboa, P. de Vos & J.L. Romalde. 2010. *Vibrio atlanticus* sp. nov. and *Vibrio artabrorum* sp. nov. isolated from clams *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (En prensa).

Patología bacteriana en acuicultura

Alicia Estévez-Toranzo

Dpto. Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología/CIBUS. Universidad de Santiago de Compostela

Los investigadores del equipo forman parte del grupo de Ictiopatología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Biología y del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela. Desde que se desarrolló esta línea hace 25 años, el grupo ha hecho un gran esfuerzo investigador en la caracterización fenotípica y genética de los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas que afectan a cultivos de peces de gran importancia económica a nivel mundial como son el rodaballo, dorada, lubina, lenguado, salmón y trucha, entre los que podemos mencionar a *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Yersinia ruckeri*, *Tenacibaculum maritimum*, *Lactococcus garvieae* y *Streptococcus parauberis* (Toranzo et al., 2005). Sin embargo, la acuicultura intensiva ha provocado que, una vez solventados unos problemas patológicos, emergieran nuevas enfermedades o nuevos grupos serológicos y/o genéticos dentro de los patógenos ya conocidos.

Entre los patógenos emergentes o reemergentes en los que el grupo ha centrado su investigación en los últimos años se encuentra *Edwardsiella tarda* en rodaballo, *Tenacibaculum maritimum* en rodaballo y lenguado y *Yersinia ruckeri*

y *Streptococcus phocae* en salmónidos. Hemos desarrollado para estos patógenos técnicas rápidas basadas en la PCR que permiten su detección específica no sólo a partir de cultivos puros sino a partir de tejidos. Además, la sensibilidad conseguida con estas técnicas permitió la detección de portadores asintomáticos. Asimismo, la aplicación de diferentes técnicas de tipado como son la electroforesis en campos pulsantes (PFGE), la amplificación aleatoria de los polimorfismos del DNA (RAPD-PCR) y otras técnicas basadas en la PCR como REP y ERIC, nos ha permitido determinar dentro de cada patógeno la variabilidad genética intraespecífica o líneas clonales, lo cual es de gran utilidad para estudios epidemiológicos y búsqueda del origen de una infección.

La investigación básica en la caracterización antigénica y genética de los patógenos mencionados nos ha permitido desarrollar estrategias de vacunación exitosas para prevenir las principales enfermedades bacterianas que han afectado y/o afectan a los cultivos marinos y continentales (Toranzo et al., 2005; Romalde et al., 2005, 2009; Castro et al., 2008) habiendo establecido para el caso del rodaballo un calendario vacunal a aplicar en su ciclo de crecimiento. Algunas de estas vacunas y estrategias de vacunación han sido patentadas y están siendo comercializadas.



Miembros del grupo (de izquierda a derecha): Beatriz Magariños (Prof. Contratado Doctor), Soledad Núñez (técnico FP), Nuria Castro (investigadora contratada), Alicia E. Toranzo (Catedrática), Celsa Pérez (administrativa grupo), Noemí Buján (becaria FPI), Asmine Bastardo (investigadora predoctoral FONDECYT, Venezuela).

AVANCES EN ENFERMEDADES EMERGENTES O REEMERGENTES

E*dwardsiella tarda* es un patógeno bacteriano perteneciente a la familia de las Enterobacterias que, desde 2005 hasta la actualidad, produce epizootias repetitivas en diferentes plantas de cultivo de rodaballo europeas. Los trabajos de investigación desarrollados por nuestro grupo han demostrado que todas las cepas que infectan al rodaballo forman un único grupo serológico, diferente al del resto de cepas de *E. tarda* aisladas de otros hospedadores (Castro *et al.*, 2006). Además, estudios de patogenidad con este grupo de aislados, han demostrado su elevado grado de virulencia y que no poseen especificidad de huésped, pudiendo infectar a otras especies como el lenguado y la lubina y siendo capaces de provocar la muerte de animales homeotermos con el consecuente riesgo para la salud pública (Castro *et al.*, 2010a). Desde el punto de vista molecular, aunque las cepas del rodaballo constituyen un grupo genético bastante homogéneo, empleando la técnica de RAPD y REP-PCR, se ha detectado la presencia de dos clones distintos que pueden coexistir en la misma planta o incluso en el mismo brote de mortalidad (Castro *et al.*, 2010b). Por otra parte, nuestro grupo ha evaluado diferentes protocolos de diagnóstico basados en la técnica de PCR con el fin de determinar el más sensible y específico para la detección del patógeno incluso en el caso de animales portadores (Castro *et al.*, 2010c). Además, hemos desarrollado una vacuna adyuvantada que confiere a los peces una protección superior al 90 % durante gran parte del ciclo de producción del rodaballo (Castro *et al.*, 2008).

Tenacibaculum maritimum (antes *Flexibacter maritimus*), bacteria halófila filamentosa con movilidad deslizante y con un estricto requerimiento de sales marinas, es el agente etiológico de la enfermedad conocida como tenacibaculosis o flexibacteriosis. Aunque *T. maritimum* constituye un grupo homogéneo desde el punto de vista bioquímico, serológicamente se han descrito tres serotipos predominantes en la península ibérica (O1, O2 y O3) sin una estricta asociación con el hospedador (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004a, 2006, Castro *et al.*, 2007). Sin embargo, desde el punto de vista molecular, demostramos la existencia de dos genogrupos principales que sí pudieron asociarse con el hospedador (Avendaño-

Herrera *et al.*, 2006). Además, hemos desarrollado un protocolo no destructivo de diagnóstico basado en la técnica de *nested-PCR* que permite la detección del patógeno en peces asintomáticos sin necesidad de su sacrificio (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004b). Los estudios que hemos llevado a cabo referente a mecanismos de virulencia nos han demostrado que *T. maritimum* posee, al menos, dos mecanismos de captación de hierro que son muy eficaces dentro del hospedador, uno relacionado con la producción de sideróforos y otro con la captación de hierro a partir de grupos hemo (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005). Más recientemente en colaboración con el grupo de la Dra. Ana Otero de la USC se ha comenzado a estudiar la posible implicación del sistema de “*Quorum Sensing*” (sistema de comunicación o lenguaje en bacterias) en la virulencia de este patógeno (Romero *et al.*, 2010). Dicho sistema está mediado por unas moléculas de bajo peso molecular (principalmente acil-homoserín-lactonas, AHL) que son liberadas al medio para controlar la densidad de población permitiendo que se expresen determinados factores de virulencia

Yersinia ruckeri causa la enfermedad de la boca roja (ERM), una patología que constituyó un importante factor limitante en el desarrollo de la salmónicultura a nivel mundial. Aunque el desarrollo de una vacuna efectiva permitió el control de la enfermedad, desde los últimos cinco años se están detectando brotes de ERM en peces previamente vacunados con el serotipo O1a. Por ello, actualmente estamos evaluando cepas de *Y. ruckeri* aisladas de diferentes brotes de ERM ocurridos entre 2003-2009 en salmónidos cultivados en Europa y Suramérica en búsqueda de información útil al desarrollo inmediato de estrategias más eficaces de control y prevención. Los resultados indican una importante variabilidad fenotípica, serológica y molecular entre estos aislados (Bastardo *et al.*, 2010) con respecto a los de hace algunos años. Aunque aproximadamente el 50 % de las cepas pertenecían al clásico serotipo O1a, hemos detectado la emergencia en peces vacunados de un elevado porcentaje de cepas del serotipo O1b y en menor proporción del O2b. Es interesante mencionar que los grupos genéticos detectados por técnicas moleculares de tipado estaban estrechamente relacionados con los serotipos. No obstante, se continúan nuevos estudios que permitan dilucidar las interrelaciones filogenéticas entre estos aislados así como las posibles causas de diseminación.

Lesiones externas en rodaballo producidas por *Tenacibaculum maritimum* (a). Tinción Giemsa de un frotis de las lesiones mostrando las típicas células filamentosas del patógeno (b).



Hemorragias oculares (a) y úlceras profundas con licuefacción muscular (b) producidas por *Streptococcus phocae* en salmón Atlántico.

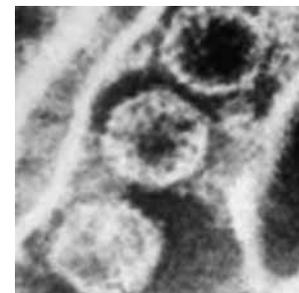


Streptococcus phocae, es un patógeno Gram positivo y β -hemolítico que, desde 2004, produce mortalidades masivas en los cultivos de salmón atlántico en Chile. Aunque el modo de transmisión y ruta de infección de esta enfermedad son desconocidos, no se descarta la hipótesis de un salto de especie desde su hospedador natural, las poblaciones de pinnípedos (focas) cercanas a las jaulas de salmones (Romalde et al., 2008). Recientes estudios de genéticos y de serotipificación así como el análisis de proteínas de membrana, ácidos grasos (FAME) y secuenciación de genes metabólicos (MLST) han mostrado la existencia de dos perfiles o líneas clonales estrechamente relacionados con el origen de aislamiento (Valdés et al., 2009). Sin embargo, el estudio del proteoma mediante MALDI-TOF MS no detectó diferencias entre los aislados de salmón y foca. En la actualidad se están llevando a cabo más estudios genéticos con el fin de dilucidar si los dos grupos clonales detectados podrían llegar a constituir dos subspecies distintas de *S. phocae*.

BIBLIOGRAFIA

- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J.L. & Toranzo, A.E. (2004a). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fish. *Dis.Aquat. Org.* 58: 1-8.
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Toranzo, A.E., Beaz, R. Romalde, J.L. (2004b). Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Dis.Aquat. Org.* 62: 75-83.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Lemos, M.L. & Magariños, B. (2005). The fish pathogen *tenacibaculum maritimum* possesses different iron uptake systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6947-6953
- Avendaño-herrera, R., Toranzo, A.E. & Magariños, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Dis.Aquat. Org.* 71: 255-266.
- Bastardo, A., Bohle, H., Ravelo, C., Toranzo, A. E. & Romalde, J.L. (2010). Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Chile. *Dis. Aquatic Org.* (en prensa).
- Castro N., Toranzo A.E., Barja J.L., Núñez S. & Magariños B. (2006) Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot. *J. Fish Dis.* 29: 541-547.
- Castro, N., Magariños, B., Nunez, S. & Toranzo, A.E. (2007). Reassessment of the *Tenacibaculum maritimum* serotypes causing mortalities in cultured marine fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Path.* 27: 229-233
- Castro N., Toranzo A.E., Núñez S. & Magariños B. (2008) Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunol.* 25: 208-212.
- Castro, N., Magariños, B., Núñez, S., Barja, J.L. & Toranzo, A.E. (2010a). *Edwardsiella tarda* from turbot: a potential risk for the marine aquaculture? *Int. Microbiol.* (En prensa).
- Castro, N., Toranzo, A.E., Barja, J.L. & Magariños, B. (2010b). Intraspecific genetic diversity of *edwardsiella tarda* strains from turbot. *Dis. Aquat. Org.* (En prensa).
- Castro N., Toranzo A. E., Núñez C. R. & Magariños B. (2010c) Evaluation of four polymerase chain reaction primer pairs for the detection of *Edwardsiella tarda* in turbot. *Dis.Aquatic Org.* 90: 55-61.
- Romalde, J.L., Ravelo, C., López-Romalde, S., Avendaño, R., Magariños, B. & Toranzo, A.E. (2005). Vaccination strategies to prevent important emerging diseases for spanish aquaculture In: Midtlyng, P.J. (ed), *Progress in Fish Vaccinology. Dev. Biol. Basel, Karger, Switzerland* Vol. 121, pp: 85-95.
- Romalde, J.L., Ravelo, C., Valdés, I., Magariños, B., de la Fuente, E., San Martín, C. & Avendaño-Herrera, R. (2008). *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid cultured in Chile. *Vet. Microbiol.* 130: 198-207
- Romalde, J.L., Magariños, B., Ravelo, C. & Toranzo, A.E. (2009). Vaccination strategies to prevent streptococcal disease in cultured fish. In *Fish Defenses, Vol. 2: Pathogens, Parasites and predators* (G. Zaccane, M.J. Manning, C.J. Secombes, B.G. Kappor, eds). *Sci. Publishers* (USA). Chap. 4: 111-149.
- Romero, M., Avenaño-Herrera, R., Magariños, B., Cámara, M & Otero, A. (2010). Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group. *FEMS Microbiol. Lett.* 304: 131-139.
- Toranzo A.E., Magariños B. & Romalde J.L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture system. *Aquaculture* 246: 37-61
- Valdés, I., Jaureguiberry, B., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., Magariños, B. & Avendaño-Herrera, R. (2009). Genetic characterization of *Streptococcus phocae* strains isolated from atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *J. Fish Dis.* 32: 351-358.

Virus de salmónidos y vacunas DNA



Sylvia Rodríguez Saint-Jean y Sara Isabel Pérez Prieto.

Grupo de Virología en Acuicultura. Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC-
Departamento de Microbiología Molecular y Biología de la Infección.

C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid

Los brotes de enfermedades producidas por microorganismos se consideran una importante restricción para la producción en acuicultura y aquellas cuyo agente etiológico es un virus están afectando al desarrollo económico del sector en numerosos países. Entre los virus que producen mayores pérdidas económicas internacionalmente cabe mencionar al **virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)**, de la familia *Birnaviridae* y género *Aquabirnavirus* y de especial interés en nuestro país porque es el de mayor prevalencia, al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y al virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) que pertenecen a la familia *Rhabdoviridae*, género *Novirhabdovirus*. Tanto IPNV como IHNV son capaces de inducir persistencia y en animales supervivientes a la infección se produce un estado de portador (*carrier*) asintomático. El IPNV es muy simple y extraordinariamente estable y se caracteriza por poseer un genoma RNA de doble cadena y de dos segmentos, A y B, dentro de una cápsida icosaédrica sin envuelta.

El segmento A del RNA contiene dos pautas de lectura abierta (ORF). La de mayor tamaño codifica una poliproteína precursora que es escindida por la proteasa viral no estructural (NS) VP4 o puede que por proteasas celulares para generar las proteínas maduras estructurales VP2 y VP3. La ORF de menor tamaño, que precede y se solapa parcialmente con la ORF de la poliproteína, codifica una proteína NS de 17 kDa conocida como VP5. El segmento B codifica una proteína de 94 kDa, VP1 que es la RNA polimerasa RNA-dependiente del virión. Existen diversas revisiones sobre el virus, algunas de miembros de este Grupo Especializado de la SEM. En nuestro país, el primer equipo de microbiólogos que inició a comienzos de los 80 estudios globales sobre enfermedades bacterianas y víricas en peces, es el de los Dres Alicia Estévez Toranzo y Juan Luis Barja, de la Universidad de Santiago de Compostela, que generosamente nos ayudaron a los demás en nuestros comienzos en los años 90.

GRUPO DE VIROLOGÍA DEL CIB

A nuestro equipo le interesó en primer lugar la epidemiología para tener una visión de conjunto de los virus que podían aislarse en las instalaciones de trucha arco-iris (cultivo

continental mayoritario en España) y disponer de aislados autóctonos. Así llegamos también al estudio de la interferencia vírica que observamos en una coinfección natural IPNV-IHNV y pudimos reproducirla en el laboratorio. En esta coinfección se manifiesta una inactivación del IHNV inducida por IPNV. Comprobamos que esta interferencia produce una disminución significativa del título infectivo, por inhibición de la síntesis de RNA viral, y a la que podría contribuir también la actividad antivírica mediada por interferón. Esta actividad es diferencial entre rhabdovirus, pues demostramos que la presencia de IPNV no inactiva al virus VHSV. A partir de este hallazgo nos interesó explorar los niveles de protección frente a distintos virus. Así, en células estimuladas con inductores de IFN demostramos una acción inhibitoria alta frente a IHNV pero no frente a VHSV, y utilizando la proteína antivírica Mx como marcador de interferón, determinamos la relación entre presencia de Mx y disminución de infección. Hemos comprobado altos niveles de protección para IPNV, IHNV y para la coinfección de ambos, que, en el caso del IHNV, alcanzan el 100%.

Paralelamente, establecimos una activa colaboración con el Grupo de Microbiología de Juan José Borrego, de la Universidad de Málaga para estudiar virus del entorno marino y técnicas de detección y con Carolina Tafalla del CISA-Valdeolmos (INIA) de Madrid, para determinar la estimulación del sistema inmune innato en truchas vacunadas frente IPNV o VHSV.

VACUNAS

Todo lo relacionado con protección frente a estos virus ha sido y es una línea de investigación de gran interés, en especial la que implica el diseño de vacunas. La consecución de vacunas eficaces frente a virus, es un objetivo aún no alcanzado en la industria de la acuicultura. Dentro de las iniciativas ejercidas con mayor éxito experimental en los últimos años, las vacunas DNA ofrecen las mejores perspectivas; de ellas, las de rhabdovirus de salmónidos son las más desarrolladas. Las vacunas DNA frente a IPNV, aún están poco exploradas, pese a ser el virus de mayor prevalencia y cada vez de más interés en Europa y Latinoamérica porque: 1) afecta también a peces de mayor tamaño y valor comercial, 2) presenta coinfecciones con otros virus (IHNV, anemia

Miembros del Grupo (de izquierda a derecha): Sara Isabel Pérez Prieto, y Sylvia Rodríguez Saint-Jean, Investigadoras Titulares, Ana I de las Heras, becaria, Mercedes Sánchez Carmona y Luis Guaita Beneit, Ayudantes de Investigación.



infecciosa del salmón-ISA(-) y 3) porque los portadores asintomáticos del virus, no sólo contribuyen a mantenerlo y dispersarlo en la instalación, sino que presentan mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas oportunistas.

Así, en nuestro laboratorio hemos construido plásmidos con el inserto del gen VP2 o del ORF de la poliproteína del virus IPN, que se han probado mediante inyección intramuscular, en trucha común y arco-iris. Demostramos que inducían expresión de IFN y Mx, así como anticuerpos neutralizantes y niveles de protección altos en infecciones a los 15 y 30 días postvacunación.

VACUNAS ORALES

Hasta ahora, la ruta más frecuente de administración para las vacunas DNA es la intramuscular. No obstante, la administración de una vacuna por inyección a peces es una tarea demasiado laboriosa y problemática, sobre todo en los de pequeño tamaño, que generalmente son los más susceptibles a la infección. Se están estudiando otras rutas alternativas como la vacunación en masa por vía oral o por baño inmersión. La sonicación y el choque hiperosmótico parecen mejorar el resultado de la vacunación por baño-inmersión. La vacunación oral apenas ha sido explorada aunque tiene numerosas ventajas pues es fácil de administrar, se pueden inmunizar animales muy pequeños, tiene menor coste y sirve para preparar vacunas multivalentes. Cuando la vacuna se administra por vía oral las células diana son las de la mucosa entérica. Para evitar que la vacuna DNA se inactive por ácidos gástricos y enzimas digestivas presentes en el tracto gastrointestinal debe estar contenido en una formulación que proteja al antígeno.

Por todo esto, consideramos de especial interés nuestro último trabajo que, hasta donde sabemos, es la primera descripción de una vacuna DNA oral para virus de salmónidos. En él demostramos que la vacuna pDNA-VP2 administrada por vía oral (protegida en microesferas de alginato) es eficaz frente a IPNV, logrando más de un 80 % de protección y una

disminución de portadores del virus. El éxito completo de una vacuna radicaría no solo en la protección eventual y disminución de mortalidad de una población determinada, sino en impedir la supervivencia del virus en forma persistente, y con ello, evitar los portadores de virus, que transmiten vertical y horizontalmente la infección. Aun hay pocos estudios sobre sistema inmune y portadores de IPNV. Además, puesto que las vacunas DNA orales apenas ahora comienzan a ensayarse en peces, se sabe poco de los mecanismos involucrados en la incorporación y presentación del antígeno tras su administración. En nuestro trabajo hemos detectado los transcritos exógenos en diversos órganos a los 7 días postvacunación y la expresión de VP2 se mantiene en hígado, bazo y ciegos pilóricos a los 15, 30 y 60 días tras la vacunación oral. El riñón se perfila de nuevo como un órgano diana para la detección y evaluación de la eficacia de la vacuna y de la actividad viral. Dedujimos que la protección observada se explica por una combinación de la inducción de respuesta inmune innata (a niveles similares que la obtenida tras vacunación intramuscular) y respuesta inmune específica, con títulos neutralizantes anti-IPNV considerables. El nivel máximo de expresión del mRNA de Mx se detectó a los 15 días post-vacunación y la protección se relaciona directamente con la expresión de VP2, puesto que el plásmido sin inserto no induce Mx ni IFN. Es interesante resaltar que los niveles de virus encontrados en peces vacunados supervivientes tras 45 días de infección con el virus, fueron inexistentes o mínimos.

En la actualidad nos planteamos estudiar el potencial protector frente a los virus IPNV e IHNV de plásmidos de expresión de genes que codifican las proteínas antigénicas de cada virus, su sinergia si son administrados conjuntamente y su capacidad para eliminar/reducir los estados de persistencia viral y por tanto, la aparición de peces portadores asintomáticos del virus. Todo ello utilizando preferentemente la administración oral, en el modelo trucha arco iris y en trucha común. En este contexto, nos interesa también el

estudio de la expresión génica en respuesta a las vacunas DNA. Hasta ahora se han venido analizando mediante PCR semi-cuantitativa y PCR en tiempo real pero dado que muy recientemente, Agilent ha comercializado una micromatriz (*microarray*) de 35K para trucha arco iris, nos proponemos aplicarlo en nuestros próximos ensayos de vacunas, y determinar los cambios en la expresión de series de genes relacionados con inmunidad y/o virulencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la excelente labor técnica de Mercedes Sánchez y Luis Guaita, del personal técnico de los diversos Servicios del CIB y la colaboración de la Delegación Provincial de Medio Ambiente y Desarrollo Rural en Cuenca, que ha proporcionado las truchas de experimentación. El grupo ha sido subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación en sucesivos Planes Nacionales (actualmente AGL2007-60256/ACU).

ALGUNAS PUBLICACIONES DEL GRUPO

- Rodríguez, S, Alonso, M & Pérez-Prieto, SI. 2005. Comparison of two birnavirus-rhabdovirus coinfections in fish cell lines. *Dis Aquatic Org* 67: 183-190
- Pérez Prieto, S I & Rodríguez Saint-Jean, S. 2005. Enfermedades virales de peces objeto de cultivo. En: *Inmunología e inmunopatología en piscicultura*. pp 61-85. Chaves, García y Messeguer Eds. Universidad de Murcia/Universidad Internacional del Mar. pp 61-85
- Rodríguez Saint-Jean, S & Pérez Prieto, S I. 2005 Resistencia a la infección por virus de salmónidos: inducción y potenciación de un estado antivírico celular. *Boletín IEO* 21 (1-4): 121-130
- Rodríguez Saint-Jean, S & Pérez-Prieto, SI. 2006. Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines. *Vet Immunol & Immunopathol* 110: 1-10.
- Tafalla, C, Rodríguez Saint-Jean, S & Pérez-Prieto, SI. 2006. Immunological consequences of the coinfection of brown trout (*Salmo trutta*) with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Aquaculture* 256:15-22
- Rodríguez & Pérez Prieto SI. (2007). Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections. *Fish & Shellfish Immunol* 23: 390-400,
- de las Heras, A., Rodríguez Saint-Jean, S. & Pérez-Prieto, S.I., (2008) Salmonid fish viruses and cell interactions at early steps of the infective cycle. *J Fish Dis* 31: 535-546.
- de las Heras, A. Pérez Prieto, S.I. & Rodríguez Saint-Jean, S., (2009) In vitro and in vivo immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunol* 27: 120-129.
- Rodríguez Saint-Jean, Ana I de las Heras, Sara I Perez-Prieto. (2010) The persistence of infectious pancreatic necrosis virus and its influence on the early immune response. *Vet Immunol & Immunopathol*, 31; 535-546
- De las Heras, A, Rodríguez Saint-Jean, S and Pérez-Prieto, SI. (2010). Immunogenic and protective effects of an oral dna vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish & Shellfish Immunol* 28:562, (doi:10.1016/j.fsi.2009.12.006).
- Cuesta, E. Chaves-Pozo, A. I. de las Heras, S. Rodríguez Saint-Jean, S. Pérez-Prieto, C. Tafalla (2010) An effective fish DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than rhabdovirus DNA vaccines *Vaccine* 28: 3291-3300.

Grupo de Patología Viral en Acuicultura

Carlos P. Dopazo (carlos.pereira@usc.es / tlf 881816083)

Isabel Bandín (isabel.bandin@usc.es / tlf: 881816087)

Unidad de Ictiopatología-Scc Patología Viral.

Instituto de Acuicultura, campus Vida. 15782, Univ. Santiago de Compostela

El Grupo de Patología Viral en Acuicultura, que forma parte de la Unidad de Ictiopatología (coordinada por el catedrático Juan L. Barja) del Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, trabaja en esta línea desde hace más de 2 décadas. El grupo, dirigido por los profesores Carlos P. Dopazo e Isabel Bandín, está constituido por tres investigadores postdoctorales (Juan Manuel Cutrín, José G. Oliveira y Carmen López-Vázquez), tres doctorandos (María Lago, Sandra Souto y Diego Vázquez) y 3 técnicos de laboratorio

fijos, además de un número variable de técnicos FP y becarios en formación.

El trabajo de investigación del grupo se centra en tres líneas: a) *desarrollo, optimización y validación de técnicas de diagnóstico de virus*, b) *epidemiología molecular y análisis filogenético*, y c) *análisis de factores de virulencia*, fundamentalmente enfocadas al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y virus de la necrosis nerviosa viral (NNV).

De arriba a abajo y de izquierda a derecha: (1ª fila) Carlos P. Dopazo, Johnny Franqueira, (2ª fila) Alicia Silva, Sandra López, Sandra Souto, (3ª fila) Carmen López-Vázquez, Isabel Bandín, Dolores Vázquez, Juan Manuel Cutrín, (4ª fila) José G. Olveira, María lago, Noelia Forján.



La primera es la línea en la que el grupo lleva más tiempo involucrado, trabajando siempre en la optimización y validación de las más avanzadas técnicas de diagnóstico disponibles en cada momento, tanto para IPNV, VHSV y NNV, como para otros virus (ISAV, KHV, IHNV, IHNNV, EHNV) considerados de riesgo por la Unión Europea. En los últimos años, los esfuerzos del grupo se han centrado en la optimización y validación de la PCR en tiempo real y PCR cuantitativa. Por otro lado, como subproducto de los resultados de esta línea de investigación, estamos trabajando en el diseño de sondas internas específicas para construir una matriz (*macroarray*), basado en PCR en tiempo real, para diagnóstico y tipado de virus.

Respecto a la segunda línea de investigación, llevamos años trabajando en el estudio de los virus presentes en peces portadores en diversas poblaciones salvajes presentes en Flemish Cap (Terranova), en aguas costeras de Galicia y en las poblaciones de salmón salvaje que remontan los ríos gallegos. Estos estudios están enfocados a conocer la evolución, a lo largo del tiempo, de la representatividad de diversos virus presentes en estos peces portadores, el efecto de la interacción entre especies, entre distintas poblaciones, e incluso entre el medio salvaje y la acuicultura.

A partir del trabajo con virus obtenidos del medio salvaje, así como fruto del estudio de los factores moleculares implicados en la modulación de la virulencia, hemos demostrado que el intercambio de segmentos genómicos que se produce de modo natural, tanto en *Aquabirnavirus* como en *Betnodavirus*, tiene un importante papel en la regulación de la especificidad de huésped y en la virulencia de estos virus. Además, nuestros últimos resultados (no publicados) demuestran la existencia de poliploidía en *Aquabirnavirus*, un fenómeno que podría explicar por qué es tan difícil de predecir la virulencia de estos virus en función a su serotipo o genotipo.

Otra de las actividades que destacan a este grupo deviene del desarrollo y aplicación de las más avanzadas técnicas de diagnóstico y tipado de virus, así como nuestra capacidad

de aplicación de herramientas epidemiológicas, lo cual nos da la capacidad de aportar a las empresas del Sector, herramientas de prevención y control de patologías virales, y nos proporciona un vínculo de conexión con numerosas empresas de acuicultura de toda la península ibérica.

Por otro lado, nuestro grupo colabora con las administraciones autonómica y nacional implicadas en conservación de la naturaleza y en el control oficial, según directivas de la UE, de las patologías de riesgo en acuicultura. Asimismo, mantenemos una estrecha colaboración con el *EU Fish Diseases Reference Laboratory* de Aarhus, Dinamarca (Dr. Niels Olesen), con el *Fish Virology Group-Aberdeen Marine Lab*, Scotland (Dr. Mike Snow), el *Center of Marine Biotechnology, University of Maryland* (Dr. Vikram Vakharia), así como con los grupos de los Drs. J.F. Rodríguez (CNB-CSIC, Madrid), J.J. Borrego (Univ. Málaga), F. Real y F. Acosta (Univ. Gran Canaria), y E. Alcaide y C. Esteve (Univ. Valencia).

Finalmente, este grupo lidera la coordinación de ReGABA, la Red Gallega de Biotecnología, a la que pertenecen en la actualidad cerca de 30 grupos de investigación en acuicultura de toda Galicia.

PUBLICACIONES RECIENTES

- López-Vázquez, C., Dopazo, C.P., Olveira, J.G., Barja, J.L. & Bandín, I. 2006. Development of a rapid, sensitive and non-lethal assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of Virological Methods* 133: 167-174.
- Bandín, I., Olveira, J.G., Borrego, J.J., Dopazo, C.P. & Barja, J.L. 2006. Susceptibility of the fish cell line SAF-1 to betanodavirus. *Journal of Fish Diseases* 29: 633-636.
- López-Vázquez C., Raynard, R.S., Bain, B., Snow, N., Bandín, I. & Dopazo, C.P. 2006. Genotyping of marine VHSV isolated in the Flemish Cap by nucleotide sequence analysis and restriction fragment length polymorphism. *Diseases Aquatic Organisms* 73: 23-31.
- Cutrín, J.M., Dopazo, C.P., Thiery, R., Leao, P., Olveira, J.G., Barja, J.L. & Bandín, I. 2007. Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *Journal of Fish Diseases* 30: 225-232.

- López-Vázquez, C., Dopazo, C.P., Barja, J.L. & Bandín, I. 2007. Experimental infection of turbot (*Scophthalmus maximus*) with viral haemorrhagic septicaemia virus isolates from wild and farmed marine fishes. *Journal of Fish Diseases* 30: 303-312.
- Olveira, G., Soares, F., Engrola, S., Dopazo, C.P. & Bandín, I. 2008. Antemortem versus postmortem detection of Betanodavirus in Senegalese Sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20: 215-219.
- Bandín, I. & Dopazo, C.P. 2008. Métodos de estudio en patología de peces. En: *Aulas del Mar. Acuicultura y Cultivo de Peces: Inmunología e Inmunopatología* (A. García Ayala, V. Mulero Méndez y J. Meseguer Peñalver, eds), Universidad Internacional del Mar. Universidad de Murcia, pp. 30-38.
- Romero-Brey, I., Bandín, I., Cutrín, JM, Vakharia, V. N. & Dopazo, C. P. 2009. Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases* 32: 585-595.
- Cutrín, J.M., Olveira, J.G., Bandín I. & Dopazo, C.P. 2009. Validation of real time RT-PCR applied to cell culture for diagnosis of any known genotype of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of Virological Methods* 162: 155-162.
- Dopazo, C.P. & Bandín, I. 2009. Techniques of diagnosis of fish and shellfish virus and viral diseases. In: *Handbook of Seafood and Seafood Products* (L. Nollet, ed), CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 604-635.
- Dopazo, C.P. & Bandín, I. 2009. Patología viral de peces. En *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo* (M. Tavares-Dias, ed). Embrapa-Amapá, Macapá, Brasil, pp. 495-535.
- Olveira, J.G., Souto, S., Dopazo, C.P., Thiery, R., Barja, J.L. & Bandín, I. 2009. Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *Journal of General Virology* 90: 2940-2951.

Patógenos de animales acuáticos de interés en salud pública y acuicultura

Carmen Amaro González

Dpto. Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia

Nuestro equipo de investigación existe como grupo independiente desde el año 2004 y está formado, en la actualidad, por Carmen Amaro (CA), profesora titular, Belén Fouz (BF), profesora contratada doctora, Eva Sanjuan (ES), investigadora post-doctoral, Francisco J. Roig (FJR), técnico superior de investigación, Amparo Llorens (ALI) y Ricardo García (RG), técnicos medios de investigación y David Pajuelo (DP) y Agnes Canyol (AC), becarios de investigación (Figura 1). Nuestro equipo incluye, además, a dos investigadores de la Universidad de Tainan en Taiwan que participan en nuestros proyectos, la catedrática de Universidad Lien-I Hor y el investigador post-doctoral Chung-Te Lee. Llevamos a cabo dos líneas de actuación, una de investigación básica y otra de investigación aplicada a las necesidades de las empresas de acuicultura.

Investigación básica: La investigación básica que realizamos tiene como principal objetivo desentrañar los mecanismos de patogenidad que permiten a las bacterias patógenas de peces producir enfermedades y cómo los peces se defienden mediante la actuación del sistema inmunitario. Hemos escogido como modelo para el estudio de la relación hospedador patógeno la anguila (*Anguilla anguilla*) y *Vibrio*

vulnificus. La anguila es una especie de especial interés en nuestra Comunidad Autónoma que se encuentra, en la actualidad, en peligro de extinción. *V. vulnificus* es una bacteria acuática que causa epizootias o brotes de una septicemia hemorrágica con altos índices de mortandad que ha ocasionado el cierre de piscifactorías en todo el mundo (Figura 2). Esta especie es, además, capaz de infectar al ser humano y causar su muerte por septicemia, generalmente tras el consumo de marisco crudo, o infecciones graves en heridas expuestas a la interacción con peces o con el agua de mar (Figura 3). Es, por tanto, una especie zoonótica, lo que aumenta el interés de su estudio.

Nuestras aportaciones al conocimiento del patógeno y de su relación con la anguila son las siguientes:

Filogenia. La especie *V. vulnificus* es fenotípicamente muy heterogénea y está dividida en tres biotipos y múltiples serovariedades. Las cepas virulentas para peces se clasifican en el biotipo 2, que se creía tenía características fenotípicas que lo distinguían del resto. El estudio filogenético de la especie mediante la secuenciación parcial de genes *housekeeping* y de virulencia, todos ellos cromosómicos, revela que ésta se

Figura 1. Grupo de investigación. De izquierda a derecha, AC, BF, DP, CA, RG, FRM, ALI y ES.



divide en tres linajes que no se corresponden con los biotipos. Las cepas del biotipo 2 aparecen en los árboles filogenéticos en el linaje I distribuidas en subgrupos relacionados con la serovariedad y estando, en cada subgrupo, más relacionadas con cepas de biotipo 1 de piscifactoría que con el resto de cepas del mismo biotipo. Este resultado sugiere que el biotipo 2 es polifilético y que, presumiblemente, ha aparecido por adquisición de nueva información por transferencia genética horizontal (TGH), lo que apoya su reclasificación como patovar que agrupa las cepas de *V. vulnificus* con potencial para infectar y desarrollar vibriosis en peces.

Plásmidos^{2,3,4}. Un 40 % de las cepas de biotipo 1 y un 100 % de las cepas de biotipos 2 y 3 poseen plásmidos de alto peso molecular, siendo uno de ellos de 70 Kb y exclusivo de las cepas de biotipo 2. La secuencia de éste plásmido revela que contiene un operón que codifica para una toxina de la familia de las MARTX (toxinas multifuncionales que se auto-procesan y que contienen regiones terminales con secuencias repetidas) y para un sistema de transporte y modificación de la toxina así como una mayoría de genes que codifican para proteínas hipotéticas o con baja homología con proteínas conocidas. La curación del plásmido implica la pérdida de virulencia para los peces y de la capacidad de resistir sus defensas innatas mientras que no se ven afectadas la virulencia para ratones y la resistencia al suero humano. Un 80 % de las cepas de biotipo 2 posee un segundo plásmido de 56 Kb que contienen un operón *tra* completo. Este plásmido es conjugativo y presenta dos regiones designadas ID1 e ID2 que son idénticas a dos regiones similares en el plásmido de virulencia. De hecho, ambos plásmidos recombinan y, de esta forma, el plásmido de virulencia se transmite entre cepas por conjugación. Este hallazgo apoya la hipótesis sobre el origen del biotipo 2 que habría surgido dentro de la especie por adquisición del plásmido de virulencia por TGH por parte de cepas de *V. vulnificus* de piscifactoría.

Genes de virulencia^{5,6,7,8}. El gen plasmídico *rtxA1* codifica la toxina MARTX y está duplicado en el cromosoma. El análisis

bioinformático de la proteína revela que ésta es modular y que su estructura es diferente a la de los biotipos 1 y 3. El análisis filogenético pone de manifiesto que la historia de la toxina del biotipo 2 es completamente diferente a la de los biotipos 1 y 3 y que se trata de una proteína formada por módulos diferentes con historias también diferentes. Uno de estos módulos está duplicado y la duplicación probablemente fue anterior a la divergencia entre linajes filogenéticos lo que significaría que el plásmido fue adquirido antes de la división de las cepas de biotipo 2 en subgrupos. Las mutaciones en el gen plasmídico y cromosómico implican la pérdida de la virulencia de la bacteria y una reducción significativa de la resistencia de la bacteria a la fagocitosis por fagocitos de peces y por amebas de peces. Estos resultados sugieren que la toxina es esencial para la supervivencia de la bacteria tanto dentro como fuera del pez. El gen cromosómico *vvp* codifica una proteasa que también producen los otros biotipos. Las mutaciones en este gen provocan que las cepas de *V. vulnificus* pierdan la capacidad de colonizar las mucosas que cubren la superficie de los peces y de las algas al verse afectada la quimiotaxis y la capacidad para formar biofilmes. Al perder esta capacidad, se produce una disminución significativa del grado de virulencia para peces de las cepas de biotipo 2 usando la inmersión como modelo de infección. Finalmente, el gen cromosómico *gne*, que codifica para una epimerasa de azúcares, es esencial para la biosíntesis del antígeno O de las cepas de biotipo 2 de la serovariedad zoonótica (serovariedad E). Las mutaciones en este gen hacen que la bacteria pierda la virulencia tanto para peces como para ratón así como su capacidad para resistir la fagocitosis, la acción del complemento del suero de mamíferos y de peces y la resistencia a los péptidos microcidas. Este mutante es un candidato idóneo para ser evaluado como vacuna viva.

Respuesta inmunitaria^{9,10}. Las anguilas responden a la infección con *V. vulnificus* y a la vacunación por inyección y baño desarrollando una protección en mucosas y sistémica basada en anticuerpos así como una cierta memoria inmunológica. El patrón de respuesta es muy repetitivo. Tras la



Figura 2. Vibriosis de la anguila causada por *V. vulnificus* mostrando hemorragias en la piel ano y aletas y una gran úlcera cerca de la cabeza (foto de la autora).

vacunación (mediante inmersión prolongada en tres dosis), los animales empiezan produciendo anticuerpos de mucosa en agallas, con un máximo a los 3 días, y en piel e intestino, con un máximo a los cinco, momento en que comienzan a elevarse los anticuerpos en sangre de forma significativa alcanzándose un máximo a los 7 días y manteniéndose los niveles significativamente superiores a los controles no vacunados durante más de un mes.

En la actualidad, nuestros principales objetivos en investigación básica son:

1. Secuenciación de genomas de nuevas cepas bacterianas y del transcriptoma de la anguila. Este apartado se realiza en colaboración con el Dr. Simon Mackenzie de la Universidad de Barcelona.
2. Seleccionar genes/islas de virulencia mediante el análisis comparado de los genomas de la misma especie y cepas de otras bacterias patógenas de peces y del hombre.
3. Obtención de mutantes deficientes en genes/islas candidatos y valoración de su virulencia *in vivo* e *in vitro* mediante el uso de líneas celulares y otros modelos de simulación de la interacción patógeno-hospedador.
4. Obtención de proteínas recombinantes y caracterización de su función mediante el uso de modelos *in vitro* adecuados.
5. Filogenia de los plásmidos de *V. vulnificus*
6. Diseño de micromatrices (*microarrays*) para el estudio de la interacción patógeno hospedador mediante el uso de modelos *in vitro* seleccionados. Este apartado se realiza en colaboración con el Dr. Simon Mackenzie de la Universidad de Barcelona.

Investigación aplicada. El grupo realiza trabajos de investigación en colaboración directa con administraciones y empresas nacionales e internacionales vinculadas al sector de la acuicultura con el objetivo de esclarecer y prevenir

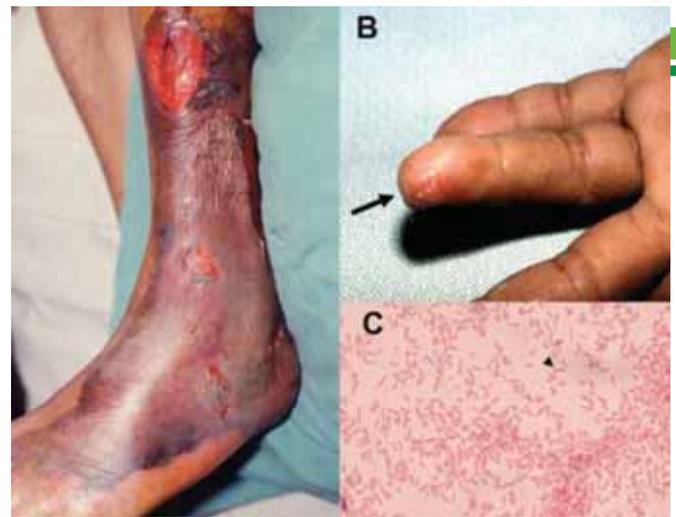


Figura 3. Vibriosis humana causada por *V. vulnificus*. (A). Tejido necrótico y ulcerado. (B). Origen de la infección, un pinchazo con un pez espinoso. (C). Tinción de Gram de una muestra de sangre de paciente con septicemia mostrando células de *V. vulnificus* en cultivo puro (tomado de textbookofbacteriology.net).

patologías diversas causadas por bacterias y/o virus en diferentes especies de peces cultivados, tanto clásicas como de nueva introducción (anguila, dorada, lubina, corvina, rodaballo, lenguado, trucha...). Estos trabajos incluyen:

- Detección y tipado de patógenos bacterianos y/o víricos clásicos y emergentes, incluidos algunos zoonóticos (*V. vulnificus*, *Listonella anguillarum*, *Photobacterium damsela*, *Mycobacterium marinum*, *Edwardsiella tarda*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, virus de la necrosis pancreática infecciosa, betanodavirus, herpesvirus...) y diagnóstico de enfermedades^{11,12,13}.
- Terapia antibacteriana: minimización del uso de antibióticos efectivos.
- Profilaxis: optimización de estrategias de inmunestimulación y de prevención de enfermedades, desarrollando nuevas alternativas nutricionales, respetuosas con el medio ambiente, y nuevas vacunas y protocolos de administración adaptados a las diferentes fases del ciclo productivo del animal.
- Epizootiología de enfermedades: vías de transmisión, búsqueda de reservorios y hospedadores susceptibles.
- Control de la calidad microbiológica del agua.

El trabajo de investigación aplicada que hemos realizado en *V. vulnificus* ha consistido en el desarrollo de:

- Un método molecular de diagnóstico de la vibriosis de la anguila y de detección de portadores sanos, de interés en acuicultura y también en salud pública porque permite determinar si el agente causal de la vibriosis pertenece a la serovariedad zoonótica¹⁴.
- Un método molecular de detección de cepas/muestras (fundamentalmente ostras) peligrosas en salud pública por contener cepas de *V. vulnificus* con potencial para infectar al ser humano¹⁵.
- Una vacuna y un procedimiento de vacunación a gran escala que protege a las anguilas de la vibriosis duran-

te todo el periodo que permanecen en la piscifactoría. El protocolo consiste en una inmunización triple por inmersión prolongada a intervalos de 15 días¹⁶.

Entre las empresas con las que colaboramos, cabe destacar Valenciana de Acuicultura S.A, TROUW España S.A., Culmarex S.A., PHARMAQ AS y ARC Skretting (Noruega).

BIBLIOGRAFÍA

1. Sanjuan E, González-Candelas F, and Amaro C. Sequence based typing reveals a polyphyletic origin of *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Appl. Env. Microbiol.* (en prensa).
2. Lee CT, Amaro C, Wu KM, Valiente E, Chang YF, Tsai SF, Chang CH, and Hor LI. 2008. A common virulence plasmid in biotype 2 *Vibrio vulnificus* and its dissemination aided by a conjugal plasmid. *J Bacteriol.* 190:1638-48.
3. Roig FJ, Amaro C. Plasmid diversity in *Vibrio vulnificus* biotypes. 2009. *Microbiology.* 155(Pt 2):489-97.
4. Valiente E, Lee CT, Lamas J, Hor L and Amaro C. 2008. Role of the virulence plasmid pR99 and the metalloprotease Vvp in resistance of *Vibrio vulnificus* serovar E to eel innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 24(1):134-41.
5. Roig, FR, González-Candelas F, and Amaro C. MARTX of *Vibrio vulnificus*: domain organization and evolution. *Appl. Env. Microbiol.* (en prensa).
6. Valiente E, Lee CT, Hor LI, Fouz B and Amaro C. 2008. Role of the metalloprotease Vvp and the virulence plasmid pR99 of *Vibrio vulnificus* serovar E in surface colonization and fish virulence. *Environ Microbiol.* 10:328-38.
7. Valiente E, Padrós F, Lamas J, Llorens A and Amaro C. 2008. Microbial and histopathological study of the vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E in eels: The metalloprotease Vvp is not an essential lesion factor. *Microb Pathog.* 45(5-6):386-93.
8. Valiente E, Jiménez N, Merino S, Tomás J, and Amaro C. 2008. *Vibrio vulnificus* biotype 2 serovar E *gne* but not *galE* is essential for lipopolysaccharide biosynthesis and virulence. *Infect Immun.* 76:1628-38.
9. Esteve-Gassent MD, and Amaro C. 2004. Immunogenic antigens of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* serovar E. *Fish Shellfish Immunol.* 17(3):277-91.
10. Esteve-Gassent MD, Fouz B, and Amaro C. 2004. Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. *Fish Shellfish Immunol.* 16(2):93-105.
11. Sanjuán E, and Amaro C. 2004. Protocol for specific isolation of virulent strains of *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) from environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 70(12):7024-32.
12. Fouz, B., J. L. Larsen, and C. Amaro. 2006. *Vibrio vulnificus* serovar A: an emerging pathogen in European anguilliculture. *Journal of Fish Diseases* 29:285-291.
13. Hodneland K, García R, Balbuena J.A., Zarza C, and Fouz B. A real-time RT-PCR assay for sensitive detection of betanodavirus in fish. *J.Fis. Dis.* (en prensa).
14. Fouz, B., C. Zarza, and C. Amaro. 2006. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *Journal of Fish Diseases* 29:339-346.
15. Roig FJ, Sanjuán E, Llorens A, Amaro C. 2010. *pilF* Polymorphism-based PCR to distinguish *Vibrio vulnificus* strains potentially dangerous to public health. *Appl Environ Microbiol.* 76(5):1328-33.
16. Esteve-Gassent, M. D., R. Barrera, and C. Amaro. 2004. Vaccination of market-size eels against vibriosis due to *Vibrio vulnificus* serovar E. *Aquaculture* 241:9-19.

Patología de especies acuícolas cultivadas

Dolores Castro

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

Nuestro grupo está constituido básicamente por investigadores del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga y forma parte del Grupo de Investigación consolidado del Plan Andaluz de Investigación denominado "Patología, Genética y Biotecnología de Especies Acuícolas", Ref. RNM-112, dirigido por el Dr. Juan J. Borrego. Este grupo comenzó el estudio de patologías que afectan a especies acuícolas cultivadas en 1988. En una primera etapa nuestros trabajos se centraron en el estudio de patologías de origen bacteriano, para continuar, desde 1996, con la caracterización de patologías de origen vírico, iniciándose esta andadura con el estudio de las infecciones producidas por el virus de linfo-

cistis (LCDV) en peces marinos cultivados. Desde 2004, hemos ampliado nuestro ámbito de estudio a la caracterización de inmunogenes implicados en la respuesta inmune innata de peces. En resumen, las principales líneas en las que actualmente trabaja el grupo de investigación son: 1) diagnóstico de patologías de origen bacteriano y vírico que afectan a nuevas especies de peces marinos cultivados; 2) caracterización intraespecífica de patógenos bacterianos implicados en brotes epizooticos y estudio de potenciales factores de virulencia; 3) patogénesis y transmisión de las principales patologías víricas detectadas; y 4) estudio del sistema inmune innato del lenguado senegalés frente a infecciones víricas.



Miembros del grupo (de izquierda a derecha, detrás): Alejandro Labella (Investigador contratado), M^a Carmen Alonso (Prof. Titular), Benjamín López (Becario FPI, IFAPA Centro El Toruño), Patricia Moreno (estudiante POP), Estefanía Jiménez (Investigadora contratada); (delante): Daniel Álvarez (Becario FPI), Dolores Castro (Prof. Titular), Juan José Borrego (Catedrático), Esther García (Prof. Contratada Doctor), Isabel López (estudiante POP).

Las principales especies piscícolas marinas cultivadas en el Sur de España son la dorada, la lubina y el lenguado senegalés. Sin embargo, como consecuencia de la necesidad de diversificación del sector, la Comunidad Autónoma Andaluza ha comenzado a desarrollar el cultivo de otras especies marinas, destacando los espáridos urta, pargo y sargo. El cultivo intensivo de estas especies ha venido acompañado por la aparición de brotes esporádicos de mortalidad que han podido asociarse principalmente a las especies bacterianas *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio harveyi* y *V. splendidus*, si bien en algunos casos se detectaron co-infecciones con los virus de la necrosis nerviosa vírica (VNNV) y de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) (Labella *et al.*, 2006; García-Rosado *et al.*, 2007).

Photobacterium damsela subsp. *damsela* se ha aislado repetidamente de brotes de mortalidad ocurridos en instalaciones de cultivo andaluzas en los últimos años, implicando mayoritariamente a la urta, aunque también se ha aislado de otras especies como el sargo, la dorada, la lubina y la corvina. La aplicación de diversas técnicas de tipado molecular, como son la amplificación aleatoria de polimorfismos del DNA (RAPD-PCR) y las técnicas de amplificación de elementos repetitivos REP-PCR y ERIC-PCR, ha confirmado la existencia de una gran variabilidad intraespecífica, lo cual puede ser de utilidad para estudios de trazabilidad de las infecciones por esta bacteria (Labella *et al.*, 2010a). También se ha evaluado la toxicidad de diversas cepas de este patógeno y sus productos extracelulares (ECP). La mayoría de las cepas analizadas pueden considerarse como moderadamente virulentas para la urta, si bien sus ECP son letales, resultando también citotóxicos para diversas líneas celulares de peces y mamíferos. La virulencia de las cepas analizadas no ha podido correlacionarse con la actividad hemolítica ni con la producción de la toxina damselsina (Labella *et al.*, 2010b).

En cuanto a las patologías de origen vírico, se han desarrollado metodologías (tanto inmunológicas como moleculares) para el diagnóstico sensible y específico de distintos patógenos víricos, concretamente del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), LCDV y VNNV, que han resultado adecuadas para la detección de portadores asintomáticos de estos virus (Cano *et al.*, 2006; 2007; Lopez-Jimena

et al., 2010a; b). Asimismo, se han puesto a punto diversas técnicas para la detección *in situ* de estos patógenos, imprescindibles para realizar estudios de patogénesis y transmisión (Alonso *et al.*, 2004; Cano *et al.*, 2009a;b;c).

Nuestra línea de investigación más reciente pretende abordar el estudio de la respuesta inmune del lenguado senegalés frente a las infecciones víricas, y se lleva a cabo en colaboración con investigadores del área de Genética del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología Animal de la Universidad de Málaga, integrados en el grupo RNM-112. La proteína Mx es una de las proteínas antivíricas inducidas por interferon más extensamente estudiada en peces (García-Rosado *et al.*, 2010). Nuestro grupo de investigación ha clonado el gen que codifica la proteína Mx del lenguado senegalés (SsMx) (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2006) y ha estudiado su cinética de expresión en lenguados inoculados con poli I:C o aquabirnavirus (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2006; Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008a). El efecto antiviral de SsMx ha sido demostrado tanto *in vivo*, mediante inducción de lenguados con poli I:C y posterior inoculación con aquabirnavirus (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008a), como *in vitro*, mediante la sobreexpresión de SsMx recombinante en células embrionarias de salmón y posterior inoculación con IPNV y VHSV (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008b; Alvarez-Torres *et al.*, 2010).

LA ENFERMEDAD DE LINFOCISTIS EN DORADA

La enfermedad de linfocistis (LCD) es la única patología de origen viral descrita en doradas cultivadas en España (Borrego *et al.*, 2001). El agente etiológico de esta enfermedad es el LCDV, miembro del género *Lymphocystivirus*, familia *Iridoviridae*. Estudios filogenéticos recientes, basados en la secuencia del gen que codifica la proteína principal de la cápside (MCP), han permitido establecer la existencia de una gran variabilidad genética en este género, estableciéndose al menos 8 genotipos que se relacionan con el rango de hospedador, constituyendo las cepas aisladas a partir de doradas cultivadas un genotipo diferenciado (Cano *et al.*, 2010).

Los estudios sobre la patogénesis del LCDV son relativamente escasos, limitados en la mayoría de los casos a estudios histopatológicos. En el caso de las infecciones en dorada se

ha establecido la distribución del virus en diversos tejidos mediante aislamiento de partículas infectivas en cultivos celulares, detección del genoma viral por PCR, así como por técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Los resultados de estos estudios sugieren que la infección por LCDV en ejemplares juveniles de dorada presenta un carácter sistémico, tanto cuando esta cursa de forma clínica como asintomática, y que la multiplicación del virus parece ocurrir en fibroblastos, hepatocitos y macrófagos. Por otra parte, se ha comprobado que el virus persiste en el hospedador tras la desaparición de los síntomas, detectándose antígenos y genomas víricos en riñón y bazo, dermis e hígado (Cano *et al.*, 2009a).

Al igual que ocurre en otras infecciones virales de peces, no existen medidas profilácticas adecuadas para el control de la enfermedad de linfocistis en doradas, sino que la prevención debe pasar por evitar la introducción del virus en las piscifactorías y por establecer medidas higiénico-sanitarias que permitan su eliminación. Para ello es esencial conocer cuáles son los reservorios del virus en las piscifactorías, así como su implicación en la transmisión vírica. Se han identificado portadores del LCDV en distintas etapas del cultivo de la dorada (reproductores, huevos, larvas, postlarvas y juveniles), habiéndose detectado también el virus en cultivos de rotíferos y artemias utilizados para el alimento de las larvas (Cano *et al.*, 2009b;c). La detección de quistes de *Artemia* portadores de LCDV de origen natural, así como la persistencia del virus a lo largo del ciclo de vida del crustáceo, sugieren que *Artemia* puede ser un reservorio de LCDV, y que sus quistes deben ser considerados como un elemento crítico de introducción del virus en las instalaciones de cultivo larvario (Cano *et al.*, 2009c). El significado de los posibles reservorios del LCDV en su transmisión a larvas de dorada debe ser estudiado más exhaustivamente, si bien estudios preliminares han permitido reconocer una transmisión horizontal vía agua y alimento (Cano *et al.*, 2009b).

REFERENCIAS

- Alonso, M.C., I. Cano, D. Castro, S.I. Perez-Prieto & J.J. Borrego. 2004. Development of an *in situ* hybridisation procedure for the detection of sole aquabirnavirus in infected cell cultures. *J. Virol. Methods*, 116: 133-138.
- Alvarez-Torres, D., E. García-Rosado, M.A. Fernández-Trujillo, D. Castro, J. Béjar, J.J. Borrego & M.C. Alonso. 2010. Actividad antiviral de la proteína Mx de lenguado senegalés. VIII Reunión del Grupo de Microbiología del Medio Acuático, SEM. Vigo. p. 107-108.
- Borrego, J.J., D. Castro, M.C. Balebona, E. García-Rosado & L. López-Cortés. 2001. Patologías que afectan al cultivo de dorada (*Sparus aurata*) en la Comunidad andaluza. Servicio de Publicaciones y Divulgación, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Cano, I., M.C. Alonso, E. García-Rosado, S. Rodríguez Saint-Jean, D. Castro & J.J. Borrego. 2006. Detection of lymphocystis disease virus (LCDV) in asymptomatic cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.) using an immunoblot technique. *Vet. Microbiol.*, 113: 137-141.
- Cano, I., P. Ferro, M.C. Alonso, S.M. Bergmann, A. Römer-Oberdörfer, E. García-Rosado, D. Castro & J.J. Borrego. 2007. Development of molecular techniques for detection of lymphocystis disease virus in different marine fish species. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 32-40.
- Cano, I., P. Ferro, M.C. Alonso, C. Sarasquete, E. García-Rosado, J.J. Borrego & D. Castro. 2009a. Application of *in situ* detection techniques to determine the systemic condition of lymphocystis disease virus infection in cultured gilt-head seabream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.*, 32: 143-150.
- Cano, I., E. García-Rosado, M.C. Alonso, B. Lopez-Jimena, J.B. Ortiz-Delgado, J.J. Borrego, D. Castro & C. Sarasquete. 2009b. Transmission of lymphocystis disease virus (LCDV) in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). 14th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", EAFF. Praga (República Checa). p. 196.
- Cano, I., B. Lopez-Jimena, E. García-Rosado, J.B. Ortiz-Delgado, M.C. Alonso, J.J. Borrego, C. Sarasquete & D. Castro. 2009c. Detection and persistence of Lymphocystis disease virus (LCDV) in *Artemia* sp. *Aquaculture*, 291: 230-236.
- Cano, I., E.J. Valverde, B. Lopez-Jimena, M.C. Alonso, E. García-Rosado, C. Sarasquete, J.J. Borrego & D. Castro. 2010. A new genotype of *Lymphocystivirus* isolated from cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *J. Fish Dis.*, 33: 695-700.
- Fernandez-Trujillo, M.A., J. Porta, J.J. Borrego, M.C. Alonso, M.C. Alvarez & J. Bejar. 2006. Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.*, 21:577-582.
- Fernandez-Trujillo, A., P. Ferro, E. García-Rosado, C. Infante, M.C. Alonso, J. Bejar, J.J. Borrego & M. Manchado. 2008a. Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish Shellfish Immunol.*, 24: 279-285.
- Fernandez-Trujillo, M.A., E. García-Rosado, M.C. Alonso, J.J. Borrego, M.C. Alvarez & J. Bejar. 2008b. *In vitro* inhibition of sole aquabirnavirus by Senegalese sole Mx. *Fish Shellfish Immunol.*, 24:187-193.
- García-Rosado, E., I. Cano, B. Martín-Antonio, A. Labella, M. Manchado, M.C. Alonso, D. Castro & J.J. Borrego. 2007. Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *Int. Microbiol.*, 10: 193-199.
- García-Rosado, E., M.C. Alonso, M.A. Fernández-Trujillo, M. Manchado & J. Bejar. 2010. Characterization of flatfish Mx proteins. En: *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Neumann, L. & S. Meier (eds.). Nova Science Publishers, Inc. New York, p. 99-128.
- Labella, A., M. Vida, M.C. Alonso, C. Infante, S. Cardenas, S. Lopez-Romalde, M. Manchado & J.J. Borrego. 2006. First isolation of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* from cultured redbanded seabream, *Pagrus auriga* Valenciennes, in Spain. *J. Fish Dis.*, 29: 175-179.
- Labella, A., M. Manchado, M.C. Alonso, D. Castro, J.L. Romalde & J.J. Borrego. 2010a. Molecular intraspecific characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains affecting cultured marine fish. *J. Appl Microbiol.*, 108: 2122-2132.
- Labella, A., N. Sanchez-Montes, C. Berbel, M. Aparicio, D. Castro, M. Manchado & J.J. Borrego. 2010b. Toxicity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains isolated from new cultured marine fish. *Dis. Aquat. Org.*, doi: 10.3354/dao02275.
- Lopez-Jimena, B., N. Cherif, E. García-Rosado, C. Infante, I. Cano, D. Castro, S. Hammami, J.J. Borrego & M.C. Alonso. 2010a. A combined RT-PCR and dot-blot hybridization method reveals the co-existence of SJNNV and RGNNV betanodavirus genotypes in wild meagre (*Argyrosomus regius*). *J. Appl. Microbiol.*, 109: 1361-1369.
- Lopez-Jimena, B., E. García-Rosado, C. Infante, I. Cano, M. Manchado, D. Castro, J.J. Borrego & M.C. Alonso. 2010b. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from asymptomatic redbanded seabream (*Pagrus auriga*) and common seabream (*Pagrus pagrus*) using a non-destructive procedure. *J. Fish Dis.*, 33: 311-319.

El microbio es la estrella

Una guía de películas para el microbiólogo

Manuel Sánchez

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología. Edificio Torrepinet. Campus de Elche
Universidad Miguel Hernández. 03202 Elche, Alicante, ESPAÑA

m.sanchez@umh.es

Tel: 34-966-65-8499 • Fax: 34-966-65-8586

Muchos profesores utilizan como un recurso docente en sus clases referencias a secuencias de famosas películas o series de televisión. La enseñanza de la microbiología no es una excepción [1, 2, 3]. Son innumerables las ocasiones en las que los microorganismos interpretan un papel cinematográfico. La mayor parte de las veces son meros “extras” que ponen en aprietos a los personajes causándoles algún tipo de patología infecciosa como la peste, el cólera, la tuberculosis o la gangrena. Pero en otras, los microbios son los protagonistas, bien en forma de terrible enemigo a batir por unos esforzados científicos y/o médicos empeñados en una épica lucha, o bien en forma de arma biológica capaz de aniquilar a toda la humanidad. Y finalmente, hay ocasiones en la que los microbios son los héroes, llegando incluso a ser los salvadores del planeta.

Antes de la aparición de las nuevas tecnologías de la información, los ejemplos cinematográficos debían limitarse a las obras más reconocibles por el gran público. La aparición de internet ha supuesto la posibilidad de acceder fácilmente a una mayor cantidad de información visual [4], por lo que el abanico de ejemplos es enorme. Y aunque no debe olvidarse que una película es una mera representación artística de la realidad que no tiene porqué reflejarla con verosimilitud; ya sea en el aspecto histórico, social o científico; el docente puede hacer de la necesidad virtud al explicar correctamente los errores e inexactitudes que aparezcan en dichas obras.

NO HAY ENEMIGO PEQUEÑO

Los microbios son uno de los mejores “malos” del celuloide. El cine nació un poco más tarde que la microbiología como ciencia, por lo que no debe de sorprendernos que las enfermedades infecciosas ya aparezcan en las primeras películas mudas. La primera versión de la historia de Margarita Gautier está realizada en 1907 y se trata de la película alemana *Kameliadamen*, protagonizada por Oda Alstrup. Era una época previa al descubrimiento de los antibióticos, así que enfermedades como la tuberculosis o el cólera podían ser consideradas como seguras sentencias de muerte. Paradójicamente, la gripe de 1918, la pandemia más mortal que ha padecido la humanidad, no ha sido re-

creada en la pantalla salvo en documentales. Paso a comentar una pequeña lista de las enfermedades más famosas del celuloide.

Tuberculosis

Si hay una bacteria con “glamour” esa es *Mycobacterium tuberculosis*. Sarah Bernhardt en *La dame aux camélias* (1911), Greta Garbo en *Margarita Gautier* (1936), Sara Montiel en *La bella Lola* (1962) o Nicole Kidman en *Moulin Rouge!* (2001) son unos cuantos ejemplos de las numerosas versiones de la misma historia: la desdichada protagonista sufre una tuberculosis que la consume lentamente pero sin alterar su belleza, tan sólo la dota de una elegante palidez, un poco de tos y en la que la hemoptisis da color a sus labios. También existe la contrapartida masculina en los personajes del compositor Federico Chopin: *Canción Inolvidable* (1944), *Un invierno en Mallorca* (1969); o del pistolero Doc Hollyday, participante del más famoso duelo del Far-West: *Pasión de los fuertes* (1947), *Duelo en Ok Corral* (1971), *Tombstone* (1993) o *Wyatt Earp* (1994).

Aunque probablemente la mejor representación de “la peste blanca” como una enfermedad de la alta sociedad burguesa de los siglos XIX y XX sea la adaptación de la obra de Tomas Mann *La montaña mágica* (1982). En un momento dado, el protagonista incluso llega a decir que *la enfermedad tiene algo de noble*. En comparación, son escasos los filmes que muestran los estragos de la tuberculosis en las capas más humildes de la sociedad: *El ángel borracho* (1948) de Kurosawa, *La colmena* (1982) de Mario Camus; o en el Tercer Mundo: *La ciudad de la Alegría* (1992) o *El jardinero fiel* (2005).

Lepra

En términos cinematográficos, *Mycobacterium leprae* es justo lo contrario de su pariente. Generalmente aquellos que la padecen en el celuloide suelen ser personajes secundarios de la trama y a causa de las terribles desfiguraciones que provoca, todo el mundo teme contagiarse. En ocasiones los enfermos son miembros de las clases altas como en *Braveheart* (1995) o *El reino de los cielos* (2005), pero lo que suele representarse en la pantalla son las terribles condiciones de las leproserías o lazaretos, como *Ben-Hur* (1925 y 1959), *Molokai* (1959), *El diablo a las 4* (1961), *Papillón* (1973), o la antes citada *La ciudad de la alegría*.

Gangrena

Podría definirse a esta enfermedad como la “eterna secundaria” de las innumerables películas de temática bélica. Allá donde haya heridos de guerra habrá posiblemente un cirujano amputando un miembro infectado. Probablemente la secuencia más reconocible del gran público sea la de Escarlata O’Hara en medio de todos los soldados yacentes en *Lo que el viento se llevó* (1939). Sin embargo quiero destacar aquí dos cintas. La primera es la italiana *El oficio de las armas* (2001), que nos narra el destino del condotiero Juan de Medici “el de la Bandera Negra”. Fue herido en una pierna con un proyectil de un falconete durante una escaramuza en las Guerras de Italia del siglo XVI y él mismo se encargó de sostener el candelabro que iluminaba al cirujano que le amputó la pierna. La segunda es *Misión de audaces* (1959). En ella, William Holden interpreta a un médico militar que para evitar la infección de una herida utiliza un remedio indio basado en una cataplasma con un “moho azul”.

Fiebres

Aquí tenemos el “cajón de sastre” de las enfermedades del cine. Si uno necesita hacer pasar un mal rato a los protagonistas nada mejor que un buen cuadro febril acompañado de escalofríos, sudoración y delirios. La causa puede ser el cólera, la malaria, las fiebres tifoideas, la fiebre amarilla, o cualquier otra infección exótica. La enfermedad suele ser mortal para los actores secundarios tal y como le ocurre al personaje de Beth que sufre de escarlatina en las numerosas versiones de *Mujercitas* (1933, 1944 y 1994). Hay ocasiones en que la fiebre se convierte en un vínculo entre dos enamorados como en *El húsar en el tejado* (1995), donde Juliette Binoche pasa una noche en compañía de Vincent Pérez y de *Vibrio cholerae*. Algo similar le ocurre a Humphrey Bogart con Katherine Hepburn y *Plasmodium falciparum* en *La reina de África* (1951) o a Valeria Golino, Timothy Dalton y la viruela en *La puta del rey* (1990). Otras veces, la enfermedad no es grave pero determina el destino del protagonista, como la otitis infantil de James Stewart en *¡Qué bello es vivir!* (1946), la infección urinaria que sufre Tom Hanks en *La milla verde* (1999), la gripe de Clint Eastwood en *En la línea de fuego* (1993), o la escarlatina de David Kross en *El lector* (2008). Una variante de este aspecto es la situación en la que los afectados son los amigos o la familia del protagonista. Ejemplos de esto lo tenemos en *Jezabel* (1938) y la fiebre amarilla, *Dersu Uzala* (1975) con la viruela, en *Entrevista con el vampiro* (1994) con la peste, o en *Los últimos días del Edén* (1992) y las enfermedades importadas. Y otras veces la fiebre es letal, como le ocurre a John Malkovich que padece fiebre tifoidea en *El cielo protector* (1990) o a Tom Hulce y su posible glomerulonefritis postestreptocócica en *Amadeus* (1984) [5].

SEX, BUGS AND MOVIES

Hasta la aparición del SIDA y el cambio social que supuso, las enfermedades de transmisión sexual (ETS) como la sífilis y la gonorrea, raramente eran nombradas en el cine. La mayor parte de las veces lo hacían en forma de películas de propaganda para informar al personal militar o estudiantil



José María Costa.

de los peligros que suponía su contagio. En otras, simplemente desaparecía cualquier referencia a ellas, como es el caso de la sífilis que sufría Toulouse-Lautrec en la película de John Huston *Moulin Rouge* (1953). Las excepciones se encuentran en el biopic dedicado a Ehrlich y del que hablaremos más adelante, y en la obra de Kurosawa *El duelo silencioso* (1949). El maestro japonés fue el precursor en mostrar la vergüenza y el desasosiego interno de aquellos que padecen una enfermedad que genera un profundo rechazo social.

La muerte del actor Rock Hudson por SIDA transformó por completo las cosas. El mundo del cine comprendió que el silencio no era una buena medida terapéutica. Las ETS comenzaron a aparecer en la pantalla con más frecuencia, como es el caso del personaje interpretado por Meryl Streep en *Memorias de África* (1985), que debe de someterse a una cura basada en el salvarsán tras ser contagiada de sífilis por su infiel marido. En el cine español se llegó incluso a frivolar el tema de la gonorrea y la sífilis con la comedia *La vida alegre* (1989). Pero la norma es que los personajes cinematográficos que sufren sífilis no tengan tanta suerte, tal y como les ocurre a los interpretados por Michelle Pfeiffer en *Las amistades peligrosas* (1988) o a Ariadna Gil en *Alatriste* (2006). Aunque es el personaje de John Willmont interpretado por Johnny Deep en *El Libertino* (2004) el que muestra de manera bastante realista lo que significaba padecer esa enfermedad en el siglo XVII.

Pero es el SIDA la enfermedad que más atención ha recibido por parte del séptimo arte. Según la *Internet Movie Database* hay 464 títulos en los cuales aparece “AIDS” como palabra clave, lo que la convierte en la más cinematográfica de todas las enfermedades. La mayoría de esos títulos lidian con la forma en la que los enfermos se enfrentan al problema que sufren, desde la desesperanza de Ed Harris en *Las horas* (2002), al optimismo resignado de Stephen Fry en *Los amigos de Peter* (1992). Algunos, como el docudrama *En el filo de la duda* (1993), mostraban los diferentes aspectos: sociales, políticos y científicos; de la epidemia de VIH en sus comienzos. Sin embargo fue *Philadelphia* (1993) la película que marcó un punto de inflexión en la manera en la que la sociedad veía y trataba a los individuos seropositivos. El deterioro paulatino de Tom Hanks va paralelo a la concienciación por parte de Denzel Washington de lo que significa ser discriminado.

Manuel Sánchez es licenciado en Biología por la Universidad Complutense (1988). Realizó su tesis doctoral en el Centro de Investigaciones Biológicas bajo la dirección del profesor Miguel Vicente (1993) trabajando en el mecanismo de división celular en *Escherichia coli*. Durante su estancia postdoctoral trabajó dentro del grupo del doctor Cornelis Murre en la Universidad de California San Diego. A su regreso a España (1997) se incorporó al equipo docente del área de Microbiología de la Universidad Miguel Hernández donde continúa en la actualidad. Forma parte del grupo investigador de microbiología de la Dra. Francisca Colom estudiando la presencia medioambiental de las levaduras patógenas del género *Cryptococcus*. Es el responsable del blog de divulgación científica "Curiosidades de la Microbiología" y del programa radiofónico "Tú, yo y los microbios".



LOS CAZADORES DE MICROBIOS

Durante la década de los años 30 del siglo pasado coincidieron los primeros tiempos del cine sonoro con las investigaciones y el desarrollo de sustancias con poder antimicrobiano. Los microbios eran una amenaza, pero podían ser combatidos mediante la ciencia. No debe extrañarnos que en esa época se filmaran la mayor parte de las películas dedicadas a la vida de los *cazadores de microbios*, como los denominó Paul de Kruif. La primera de todas fue la adaptación del best-seller *El Doctor Arrowsmith*, dirigida por John Ford en 1931. A pesar de los años transcurridos, hay aspectos de dicha película que no han perdido actualidad, como es la preocupación por publicar, la búsqueda de fondos para la investigación, el mal uso de la publicidad de los descubrimientos científicos para conseguir esos fondos, los debates éticos de la experimentación con seres humanos, y los sacrificios personales que se hacen cuando una persona decide seguir su vocación científica.

Pasteur mereció dos películas, una francesa y otra norteamericana. La segunda es *La tragedia de Pasteur* (1936) dirigida por William Dieterle e interpretada por Paul Muni. La productora no confiaba mucho en que la biografía de un químico francés, que había desarrollado un método para el tratamiento de alimentos que llevaba su nombre, fuera de interés para el público. Dieterle tuvo que realizarla con un presupuesto bastante magro. Inteligentemente le impuso un tono melodramático, muy al gusto de aquellos tiempos, en la que Pasteur era presentado como un visionario incomprendido y un luchador incansable frente a la amenaza de los microbios. La cinta fue un gran éxito de taquilla que animó a producir otras biografías filmadas.

El éxito del *biopic* sobre Pasteur incitó a los alemanes a realizar el suyo sobre Robert Koch. Y no repararon gastos en ello. Protagonizada por Emil Jannings, "el mejor actor del mundo" según algunos críticos de la época, *Robert Koch, el vencedor de la muerte* (1939) fue diseñada por el régimen nazi como un producto de propaganda que mostrara la superioridad de la ciencia "aria". Consiguió un relativo éxito en su tiempo, pero por su nefasto origen ha caído en el olvido. Si obviamos su deleznable aspecto propagandístico, es una cinta que relata bastante correctamente los esfuerzos de Koch en identificar al bacilo que lleva su nombre y así poder luchar de manera efectiva contra la tuberculosis. La respuesta aliada a la propaganda alemana vino nuevamente de William Dieterle y *La bala mágica del Dr. Ehrlich* (1940). Dieterle mostró que los descubrimientos de Koch fueron labor de muchas personas, entre ellos el alemán de origen judío Paul Ehrlich. El actor Edwar G. Robinson da vida al conocido como padre de la quimioterapia, que desarrolló las técnicas que permitieron teñir a *M. tuberculosis*, y descubrió el salvarsán para el tratamiento de la sífilis.

La obra *El Doctor Arrowsmith* también supuso la consagración de un estereotipo del cine que podríamos denominar como el *microbiólogo misionero*. El protagonista es un médico que se va a un país del Tercer Mundo a luchar contra las enfermedades infecciosas. Así, Arrowsmith se va a luchar contra la peste en el Caribe, pero también puede ser el cólera: *El velo pintado* (1934) y su *remake* del año 2006, *La jungla en armas* (1939); la esquistosomiasis en *Por el valle de las sombras* (1944); la tuberculosis en *Historia de una monja* (1959); el paludismo en *Camino de la jungla* (1962); la lepra en *La ciudad de la alegría* (1992); el mal de Chagas en *Casas de fuego* (1995) y la tuberculosis en *El jardinero fiel* (2005).

Hay otros cazadores de microbios del celuloide. Uno de los más curiosos es Robert Franklin Stroud y su lucha contra la septicemia hemorrágica aviar. John Frankenheimer llevó su vida a la pantalla con Burt Lancaster como protagonista en *El hombre de Alcatraz* (1962). Otro es el personaje interpretado por Richard Widmark en *Pánico en las calles* (1950) de Elia Kazan. Al más puro estilo de un *thriller* clásico, Widmark se ve inmerso en una carrera contra reloj para dar caza a Jack Palance y controlar un brote de peste neumónica en Nueva Orleans. Esta película sirvió como base para desarrollar en el año 2005 la serie televisiva *Medical Investigation*, sobre un grupo de profesionales del CDC de Atlanta cuya misión es controlar posibles epidemias y brotes infecciosos.

APOCALIPSIS MICROBIANO

La percepción de la ciencia por el gran público volvió a cambiar tras el final de la Segunda Guerra Mundial. Aunque la tecnología fue esencial en la derrota de las potencias del Eje, quedó demostrado que la ciencia podía salvar al mundo, pero que también era capaz de destruirlo. Durante la Guerra Fría se filmaron las primeras películas cuyo tema era la desaparición de la humanidad debido a un apocalipsis microbiológico. Temática que ha vuelto a renacer en estos últimos tiempos, aunque con una diferencia fundamental. Es de notar que las películas más antiguas tratan de man-

tener una cierta verosimilitud científica en la descripción de los patógenos, mientras que los *remakes* más modernos la sacrifican en aras del efectismo y el *gore* más burdo.

El modelo inicial fueron las devastadoras epidemias de peste padecidas por Europa durante los siglos XV y XVI ya que dejaron un profundo efecto en nuestro acervo cultural. Quizás la película más conocida sobre la Muerte Negra sea *El séptimo sello* (1957), la obra maestra de Bergman, aunque es una película basada en un anacronismo ya que en el siglo XIII la peste aún no había llegado a Europa. Más correctas en el aspecto histórico son *La máscara de la Muerte Roja* (1964), particular adaptación de la obra de Poe realizada por Roger Corman, con Vincent Price en el papel del príncipe Prospero, y la interesante *El último valle* (1970) protagonizada por Omar Shariff y Michael Caine. No puede dejar de nombrarse la adaptación de la obra de Albert Camus aunque la calidad de la producción cinematográfica, *La peste* (1992), está muy lejos de la literaria. *Yersinia pestis* también tiene papeles estelares como arma biológica aunque en producciones bastante flojas. En *El puente de Cassandra* (1976) no encuentran una forma mejor de eliminar una cepa neumónica hipervirulenta que arrojando un tren con los infectados a un río. Y en *Los señores del acero* (1985) el director Paul Verhoeven recrea la utilización de los cadáveres de apestados para rendir fortalezas medievales, aunque con una cepa que causa la muerte fulminante en menos de 10 minutos (!).

En poco tiempo los virus desbancaron a las bacterias como los microorganismos más temibles del celuloide, sobre todo si estos habían sido manipulados por el hombre para convertirlos en armas biológicas que podían ser robadas y utilizadas por terroristas. Pero en realidad los patógenos se convertían en una versión más del *McGuffin* de Hitchcock dentro de producciones al más puro estilo James Bond. La primera de ellas fue *Estación 3: Ultrasecreto* (1965) que nos relata la recuperación de un arma biológica denominada virus Satán diseñada a partir de un Virus de la Polio. En su reciente actualización, *Misión Imposible II* (2000), nos encontramos con el virus Quimera, una variante del virus de la gripe que se multiplica en el interior de los eritrocitos (!) y que va con temporizador incorporado (!). En la misma categoría podríamos incluir a *El último patriota* (1998), *Sin control* (2002) o *Transporter II* (2005).

No creo equivocarme si digo que *La amenaza de Andrómeda* (1971) es la película más “microbiológica” que se ha realizado hasta la fecha (no así su reciente *remake*). Basada en una novela de Michael Crichton, el director Robert Wise mostró los esfuerzos de un grupo multidisciplinar de científicos para contener un patógeno extraterrestre. Por primera vez el público vio lo que era un laboratorio de alta seguridad biológica y se familiarizó con las escafandras y los trajes de protección. Nada que ver con lo que muestra la cinta *Estallido* (1995), en cuya secuencia de comienzo podemos ver las puertas de los laboratorios de bioseguridad abiertas y a alguno de sus operarios quitándose las máscaras en su interior. Aunque eso es *pecata minuta* si lo comparamos con la obtención del suero a partir de un simple mono capuchino, para curar a todo un poblado de la

infección de un virus parecido al Ébola pero que se transmite por vía aérea.

En ocasiones se consigue controlar con más o menos éxito la infección, aislando a los pacientes en una cabaña como en *Cabin fever* (2002), o tras un muro como en *Doomsday* (2008). Otras veces la humanidad no tiene tanta suerte y su forma de vida queda drásticamente alterada como en *V de Vendetta* (2005), o queda prácticamente aniquilada como muestran las películas *Apocalipsis* (1994), *Doce monos* (1995) o *Carriers* (2009). Es interesante hacer notar que en *Apocalipsis*, el escritor Stephen King se inspiró en la pandemia de 1918 para crear al *Capitán Trotamundos*, un arma biológica basada en el virus de la gripe que acababa con el 99,4% de la población del planeta.

Dentro del apartado apocalíptico capítulo aparte merecen los virus *zombificantes*. La idea se la debemos al director George A. Romero que la reflejó en su película *The Crazies* (1973), de la que recientemente se ha hecho un *remake*. En su origen, el virus no creaba zombis, sino que era un arma biológica diseñada para transformar a la gente en psicópatas asesinos. Esa misma situación volvió a aparecer en la película *Situación de Riesgo* (1985) aunque en este caso no era un virus, sino una cepa modificada de *Pseudomonas fluorescens* la que convertía en unos psicópatas a los trabajadores de un laboratorio secreto militar. Cabe destacar que los infectados sufrían toda una serie de síntomas de infección y que la locura era el último de ellos. Esta idea sirvió como base para la película *Resident Evil* (2002), un claro exponente de la deriva hacia terrenos más del estilo *gore*, como también lo son sus numerosas continuaciones y títulos como *28 días después* (2002) o *Rec* (2007). En todas esas cintas hay un virus cuya infección convierte en un santiamén a cualquier ser humano en un zombi putrefacto hambriento de carne fresca. De todas ellas quizás el virus *zombificante* más original sea el que aparece en la película *Soy leyenda* (2007), un virus de las paperas modificado genéticamente para tratar la leucemia y que debido a una mutación espontánea se transforma en una pesadilla.

Pero es justo reconocer que también hay ejemplos cinematográficos en los que los microorganismos ayudan a la humanidad. En el futuro distópico mostrado en *Cuando el mañana nos alcance* (1973) son una de las fuentes de alimentación de un mundo superpoblado. También son el alimento, en forma de proteína unicelular, de los escasos humanos libres en la película *Matrix* (1999). Y por último, los microbios también son capaces de salvar a la humanidad de una invasión alienígena como se muestra en *La guerra de los mundos* (1953 y 2005).

EL LADO OSCURO

Uno de los estereotipos cinematográficos que aparece en muchas de las anteriores películas es el “científico malvado” que no se detiene ante nada ni nadie para realizar sus diabólicos experimentos en los seres humanos. Por desgracia ese estereotipo está basado en diversos hechos reales. Durante la Guerra Chino-Japonesa y la II Guerra Mundial, la Unidad 731 del ejército japonés fabricó armas biológicas

y utilizaron a hombres, mujeres y niños chinos como sujetos de experimentación de las mismas. Los soldados japoneses se referían a ellos como *maruta* (maderos). Llegaron a desarrollar una bomba de cerámica para transportar pulgas que transmitiesen la peste y fue utilizada en diversas ocasiones. Se estima que en total causaron más de 200.000 muertes. La película china *Los hombres detrás del Sol* (1988) cuenta la historia de la infame unidad, pero al recrearse en la truculencia y el sadismo se queda convertida en una vulgar película de serie Z, perdiéndose todo su mensaje de denuncia de las atrocidades japonesas.

Mucho más interesante desde el punto de vista bioético es el telefilm *El experimento Tuskegee* (1997) que cuenta la historia del estudio clínico realizado a lo largo de cuarenta años en dicha localidad de Estados Unidos con población masculina negra que sufría de sífilis y que ha vuelto a primera plana tras la reciente noticia sobre experimentos similares realizados de manera ilegal en Guatemala. Iniciado en 1932 con el objetivo de estudiar el desarrollo de la enfermedad en el tiempo y elaborar estrategias sociales para controlar su diseminación entre las capas más humildes evolucionó a un estudio prospectivo en el que los pacientes se convirtieron en meros sujetos experimentales. Cuando apareció la penicilina, los investigadores hicieron realidad el dicho de que el infierno está empedrado de buenas intenciones, pues decidieron continuar el estudio e impidieron la suministración de antibióticos a los pacientes para curarles.

MICROBIOS ANIMADOS

Los microorganismos también han sido protagonistas de diversas obras animadas. Generalmente en el papel de “malvados” aunque el microorganismo en cuestión no sea patógeno como le sucede a Plankton en la serie *Bob Esponja*. También hay ejemplos “diferentes” como en la película *Shorts: La piedra mágica* (2009) en la que se habla de los microorganismos como una futura fuente de energía. Como era de esperar tratándose de dibujos animados, la factoría Disney elaboró durante los años 50, 60 y 70 una serie de cortos para informar de los peligros del paludismo y otras enfermedades. Quizás el más curioso es el titulado *VD Attack Plan* (1973) para la prevención de la sífilis y la gonorrea, realizado en plena época de liberación sexual y amor libre. Ahondando en las enfermedades infecciosas, en el reciente corto *Mi amiga la rata* (2007), Remy el protagonista de *Ratatouille* (2007) da una estupenda explicación de la relación entre pulgas, ratas y humanos y las epidemias de peste bubónica durante la Edad Media. Hay que destacar que en la película *Merlín el encantador* (1963) tenemos un ejemplo de patógeno “bueno”, cuando Merlín se transforma en el germen de la “malalíptacopterosis” para derrotar a la señora Mim. Otros estudios de Hollywood también han reflejado a los microbios en sus películas. El de Steven Spielberg produjo la interesante historia de *Balto* (1995) sobre el transporte de suero antidiftérico a una población en Alaska en la que se declaró un brote de difteria infantil. Más floja es *Osmosis Jones* (2001) que en

tono de cine negro nos relata las aventuras de un linfocito tras la pista de un patógeno que causa la “muerte roja”. Aunque el micromundo más interesante en el que se refleja los inherentes problemas de comunicación entre la escala macroscópica y microscópica es el reflejado en la película *Horton* (2008).

Sin duda, la serie más conocida por el pequeño público es *Érase una vez la vida* (1986). A pesar de que en algunos aspectos ha quedado algo anticuada hay que reconocerle a esta producción francesa un gran valor pedagógico, sobre todo en la presentación de diversos patógenos bacterianos y víricos. Y en este apartado no podía faltar la animación japonesa. En la muy recomendable *Mi vecino Totoro* (1988) el director Hayao Miyazaki refleja la preocupación de una familia en la que uno de los miembros sufre tuberculosis. Pero lo sorprendente es la serie *Moyashimon* (2007) que podría traducirse por “Cuentos de la Agricultura”, y en la que asistimos a unas auténticas lecciones de microbiología industrial y ambiental a través de las aventuras del estudiante de Ciencias Agrícolas Tadayasu Sawaki y de sus amigos microscópicos entre los que están los hongos *Aspergillus oryzae*, y *Saccharomyces cerevisiae* o la bacterias *Bacillus subtilis* var. *natto*. y *Lactobacillus brevis*.

CONCLUSIONES

El Séptimo Arte ofrece una panoplia muy diversa de “situaciones microbiológicas” que pueden ser aprovechados por el docente para transmitir y formar a sus alumnos de manera entretenida. No en vano, una imagen vale más que mil palabras. A pesar de que la inmensa mayoría de esas situaciones tratan sobre los microbios patógenos y sus efectos en el ser humano, también pueden encontrarse algunas excepciones interesantes. Es importante no olvidar que el cine es fundamentalmente un arte y que no tiene porque reflejar correctamente la realidad, y aunque muchas veces se sacrifica la verosimilitud en aras del espectáculo, no es menos cierto que también se aprende a base de corregir y explicar los errores que puedan encontrarse en las películas. El cine, además de una fábrica de sueños, también es una buena herramienta docente. Y es que *hasta lo más pequeño puede cambiar el futuro*.

REFERENCIAS

- José Elías García-Sánchez, María José Fresnadillo y Enrique García-Sánchez. El cine en la docencia de las enfermedades infecciosas y la microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20(8):403-6.
- Revista de Medicina y Cine: <http://revistamedicinacine.usal.es/index.php>
- Sánchez, M. Curiosidades de la microbiología – Cine y bichos. <http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com/search/label/Cine%20y%20Bichos>
- Internet Movie Database. <http://www.imdb.com/>
- Vicente, M. El asesino de Mozart. Esos pequeños bichitos. <http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2009/08/23/123595>.

XIV Curso de Iniciación a la Microbiología

Juan Ignacio Reguera Useros y David Rodríguez Lázaro
Organizadores del Curso



Asistentes al XIV curso de iniciación a las puertas del Monasterio de Santa María de La Santa Espina en Castromonte, Valladolid.

Entre los días los días 6 y 9 del mes de julio se celebró en el Monasterio de Santa María de La Santa Espina en Castromonte, Valladolid, el **XIV Curso SEM de Iniciación a la Investigación en Microbiología**. En el curso participaron 20 alumnos de distintas Universidades españolas. Las conferencias fueron impartidas por 10 Profesores e Investigadores procedentes de diferentes Universidades y centros de investigación y abarcaron diferentes aspectos de la Microbiología.



Foto de "familia" en la "Ermita de Nuestra Señora de la Anunciada", Uruëña.

Tras llegar los alumnos el día anterior al inicio del curso y pasar una primera noche en el monasterio, se inició el curso con el ACTO DE INAUGURACIÓN presidido por los profesores Dr. D. Julio Rodríguez Villanueva y Dr. D. Antonio Rodríguez Torres de las Universidades de Salamanca y Valladolid. En este acto también intervinieron el Dr. Humberto Martín Brieva, Secretario de la Sociedad Española de Microbiología, los organizadores del Curso, los Dres. Juan Ignacio Reguera Useros y David Rodríguez Lázaro así como D. Manuel Pérez-Minayo Reguera, Alcalde del Municipio de Uruëña, Valladolid. Tras el acto de apertura, la primera conferencia del curso fue impartida por el Prof. Dr. Miguel Viñas Ciordia de la Universidad de Barcelona con el título "**El microbiólogo básico en centros médicos: ¿Qué hace un chico como tú en un sitio como éste?**", en la cual nos resumió su dilatada experiencia como investigador-microbiólogo básico en el contexto hospitalario. Tras una excelente comida castellana en el incomparable recinto de la bodega del Monasterio y una apasionante y entretenida sobremesa, el Prof. Dr. José Pedro Martínez García de la Universidad de Valencia impartió la conferencia "**Biopelículas microbianas: ningún microorganismo es una isla**", introduciendo a los estudiantes en el mundo de los biopelículas producidas por microorganismos. Segui-

damente, el Prof. Dr. José Antonio Gil Santos de la Universidad de León desarrolló la conferencia "**Identificación de una nueva proteína del citoesqueleto de *Corynebacterium glutamicum* y su regulación por fosforilación**" en la cual resumió los principales avances realizados por su grupo de investigación en los últimos años.

La segunda jornada del curso comenzó con la exposición por parte de la Prof. Dra. Monserrat Llagostera de la Universidad Autónoma de Barcelona de la conferencia "**Propuesta e implementación del primer Grado de Microbiología en España**" en la que se recogió la génesis del grado de microbiología y la situación actual dentro del nuevo marco europeo de educación universitaria. Seguidamente el Prof. Dr. César Nombela Cano de la Universidad Complutense de Madrid presentó la conferencia "**Antimicrobianos y pared celular: exploración racional de nuevas dianas farmacológicas en microorganismos eucarióticos**" en la que resumió la investigación realizada por su grupo en los últimos veinte años. Posteriormente, el Prof. Dr. Elías Fernando Rodríguez Ferri de la Universidad de León impartió la conferencia "**Microbiología y Sanidad Animal. Análisis de la situación actual**" en la que contextualizó el papel que la veterinaria y sus profesionales han desempeñado en la microbiología y el rol de ésta última en la

Comida de celebración en la bodega del Monasterio de Santa María de La Santa Espina.



Sanidad Animal. Después de la comida, la Dra. Marta Hernández Pérez presentó una de las nuevas líneas y aproximaciones de investigación en microbiología en la conferencia **“La metagenómica como herramienta aplicada al estudio de la Ecología Microbiana”**. El resto de la tarde se dedicó a diferentes actividades socioculturales. Se realizó una visita a los municipios de San Cebrián de Mazote y Urueña. En San Cebrián de Mazote se visitó su basílica, una de las iglesias mozárabe de mayor tamaño que ha llegado hasta nuestros días. A continuación se visitó el municipio de Urueña donde se visitó la “Ermita de Nuestra Señora de la Anunciada”, iglesia del siglo XII, único ejemplar del estilo románico catalán de toda la región castellano-leonesa. Ya en Urueña, la primera “Villa del Libro” de España, se visitó sus murallas y el castillo, así como las diferentes librerías que allí se encuentran. Finalmente se visitó el museo del libro, donde el Ayuntamiento nos ofreció un ágape. Para finalizar el día, y hacer única esta edición, tanto los alumnos como los profesores pudimos ver cómo la Selección Española de Fútbol llegaba a una final de un Campeonato del Mundo (si eso ya era difícil, hay que añadir que ¡¡¡vimos el partido en un Monasterio del siglo XII en una pantalla gigante de más de 50 pulgadas!!!!).

El tercer día del curso se inició con la conferencia **“Gastroenteritis víricas”** impartida por el Prof. Dr. Albert Bosch Navarro de la Universidad de Barcelona que con su habitual maestría deleitó a los asistentes con una introducción al apasionante mundo de los virus entéricos. A continuación el Prof. Dr. Carlos Hardisson Rumeu de la Universidad de Oviedo impartió la conferencia **“Reflexiones sobre los compuestos antibacterianos”** en la que recogió los principales aspectos y conclusiones sobre la antibioterapia

derivadas de los estudios realizados por su grupo de investigación. Finalmente, la Prof. Dra. Emilia Quesada Arroquia cerró el curso con la conferencia titulada **“Bacterias halófilas: lo que sabemos y lo que ignoramos”** en la que introdujo a los alumnos a la microbiología ambiental centrándose en estos microorganismos extremófilos.

El curso finalizó con el Acto de Clausura, donde se entregaron los diplomas acreditativos y unas breves intervenciones de los coordinadores del curso y el Decano de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos, Prof. Dr. José Miguel García Pérez. Terminado el acto se realizó una visita turística al Monasterio donde se pudo contemplar su iglesia del siglo XIII donde se encuentra la reliquia de una de las espinas que Jesucristo portó en su corona, así como el Museo de aperos agrícolas y una extensísima colección de más de 3.000 ejemplares mariposas, insectos y distintos artrópodos de los cinco continentes que uno de los hermanos del Monasterio ha recopilado durante más de 30 años.

Desde aquí, los coordinadores del curso queremos agradecer sinceramente a D. Luis Pinedo Buendía, Director del Centro de Formación Agraria “La Santa Espina”, centro ubicado en las dependencias monacales, por haber hecho todo lo posible (e imposible) para que la estancia de los alumnos y profesores haya constituido un recuerdo imborrable. Asimismo, queremos agradecer a los patrocinadores de este curso; la Fundación Areces, la Consultoría de Técnicas Ambientales SL, y la Universidad de Burgos. Finalmente, también queremos agradecer (y felicitar) a la pieza fundamental de estos cursos de iniciación: los ponentes, los cuales con su desinteresada participación definitivamente estimularon el interés por la investigación en microbiología a los asistentes al curso.

MATERIAL DE REFERENCIA MICROBIOLÓGICO

Para facilitar el control de calidad en el laboratorio.

Fácil de usar, rápido, seguro, trazable y cuantitativo.

BAControl

MATERIAL DE REFERENCIA BACTERIOLÓGICO
CUANTITATIVO DE USO DIARIO

Cada pastilla contiene un número determinado de células viables y cultivables.

Es el material apropiado para la realización de controles de calidad rutinarios, como controles de proceso, creación de gráficos de control o controles de calidad de medios de cultivo.



CARACTERÍSTICAS

Homogéneo
Estable a largo plazo
Cuantitativo
Fácil conservación
Preparación sencilla

VENTAJAS

Fácil de usar
Rápido
Seguro
Trazable
Cómodo y práctico



Y SI LO QUE BUSCAS ES UN VALOR CERTIFICADO,

BACuanti

el material de referencia bacteriológico cuantitativo y certificado (cultivo, PCR y DNA).



C/ Dracma 16
Pol. Ind. Las Atalayas
03114 Alicante (España)

T. +34 966 10 55 01
F. +34 966 10 55 03

www.ielab.es
ielab@ielab.es