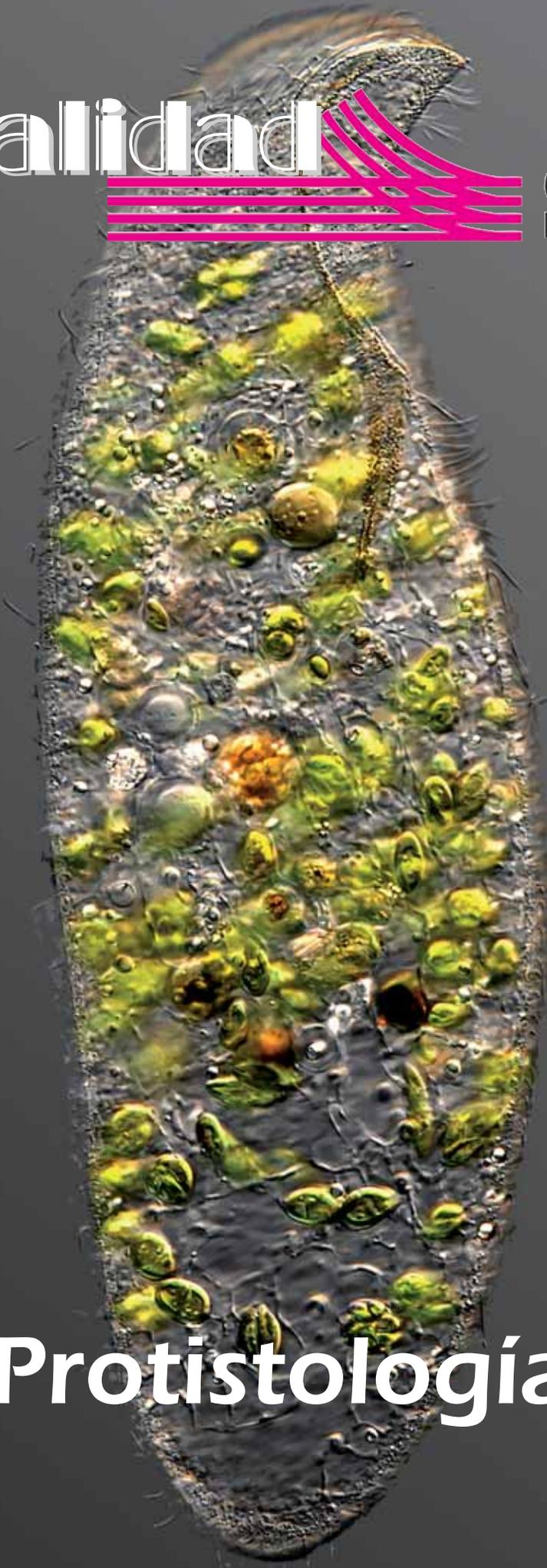


Actualidad



SEM



Protistología

Número 51

Junio 2011

Junta Directiva de la SEM

Presidente

Ricard Guerrero

Dpto. Microbiología. Facultad de Biología.
Universidad de Barcelona.
Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.
rguerrero@iec.cat

Vice-Presidente

Francisco García del Portillo

Centro Nacional de Biotecnología. CSIC.
C/Darwin, 3. Campus Universidad Autónoma.
28049 Madrid. fgportillo@cnb.csic.es

Secretario

Humberto Martín Brieva

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense. 28040 Madrid.
humberto@farm.ucm.es

Secretario electo

Juan Alfonso Ayala Serrano

Centro Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC.
C/ Nicolás Cabrera, 1.
Campus Universidad Autónoma. 28049 Madrid.
jayala@cbm.uam.es

Tesorera

Irma Marín Palma

Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid
Cantoblanco, 28049 Madrid. imarin@cbm.uam.es

Editores de publicaciones

INTERNATIONAL MICROBIOLOGY

Jordi Mas Castellà

Fundació Catalana per a la Recerca i la Innovació.
Paseo de Lluís Companys, 23. 08010 Barcelona.
jordi.mas25@gmail.com

Actualidad SEM

Federico Navarro García

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense. 28040 Madrid.
fnavarro@farm.ucm.es

NoticiaSEM:

Rafael Giraldo Suárez

Dpto. Microbiología Molecular Centro de
Investigaciones Biológicas, CSIC.
C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid.
rgiraldo@cib.csic.es

Directora de la Colección Española de Cultivos Tipo

Esperanza Garay

Dpto. Microbiología y Ecología.
Edificio de Investigación. C/ Doctor Moliner, 50.
46100 Burjassot (Valencia).
esperanza.garay@uv.es

Vocales

Jordi Barbé

Dpto. Genética y Microbiología.
Facultad de Biociencias.
Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra,
08290 - Barcelona. Jordi.Barbe@uab.cat

Jesús López Romalde

Dpto. Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia. 15706 Santiago de
Compostela. (A Coruña). mpromald@usc.es

Emilia Quesada Arroquia

Departamento de Microbiología.
Facultad de Farmacia. Campus de Cartuja,
18071 Granada.
equesada@ugr.es

Joaquín Moreno Casco

Dpto. Biología Aplicada. E.P.S.
Universidad de Almería.
04120 La Cañada de San Urbano. Almería.
jcasco@ual.es

Diego A. Moreno Gómez

Dpto. Ing. CC. Materiales. E.T.S.
Ingenieros Industriales. UPM.
C/ José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid.
diego.moreno@upm.es

David Rodríguez Lázaro

Grupo Tecnología y Seguridad Alimentaria.
ITACyL. Carretera de Burgos, Km. 119
47071 Valladolid.
ita-rodla@itacyl.es

Presidentes de Grupos

Biodeterioro y Biodegradación

Asunción de los Ríos

Instituto de Recursos Naturales.
Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC.
Serrano 115 dpdo. 28006 Madrid.
arios@ccma.csic.es

Hongos Filamentosos y Levaduras (Micología)

Amparo Querol

Departamento de Biotecnología de los Alimentos
Instituto de Agroquímica y Tecnología de
Alimentos.-46100 Burjassot, Valencia
aquerol@iata.csic.es

Biología de Microorganismos Patógenos

Ángel Domínguez

Departamento de Microbiología y Genética.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Salamanca. E-37007 Salamanca.
ado@usal.es

Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

Tomás González Villa

Dpto. Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia.
15782 Santiago de Compostela.
tomas.gonzalez@usc.es

Microbiología de los Alimentos

Francisco Javier Carballo García

Área de Tecnología de los Alimentos.
Facultad de Ciencias de Ourense.
Campus Universitario, s/n. Universidad de Vigo.
32004 Vigo.
carbateg@uvigo.es

Microbiología Molecular

María Molina Martín

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid.
Plaza de Ramón y Cajal s/n.
28040 Madrid.
molmifa@farm.ucm.es

Microbiología del Medio Acuático

Juan José Borrego García

Dpto. Microbiología. Facultad de Ciencias.
Campus Universitario Teatinos.
29071 Málaga.
jjborrego@uma.es

Microbiología de Plantas

Antonio de Vicente

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias.
IHSM-UMA-CSIC.
Campus de Teatinos. Universidad de Málaga.
28071 Málaga.
adevicente@uma.es

Protistología

Ana Martín-González

Dpto. Microbiología-III, Facultad de Biología.
Universidad Complutense (UCM).
C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid (Spain).
anamarti@bio.ucm.es

Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad

Jorge Lalucat Jo

Dpto. Biología. Área de Microbiología.
Universidad de les Illes Balears.
Crta. Valldemosa, Km. 7,5.
07071 Palma de Mallorca.
jlalucat@uib.es

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

SUMARIO



"*Loxodes rostrum*, ciliado con algas endosimbiontes encontrado en hábitats de agua dulce con baja intensidad lumínica y pequeñas concentraciones de oxígeno disuelto. Fotografía de Martin Kreutz."

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



VIAJES

El Corte Inglés

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 51
Junio 2011

«In memoriam»: Lorenzo de la Hoz Perales	2
Reuniones y Congresos	
Reunión del Grupo de Taxonomía, Filogenia y Diversidad Microbiana en Sevilla	3
David Ruiz-Arahal y Antonio Ventosa	
XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos	4
David Rodríguez Lázaro	
VIII Reunión del grupo de Microbiología Molecular	7
María Molina	
La era «ómica» ya es una realidad en la microbiología de plantas	9
Ramón Penyalver	
Informes de los grupos	11
Nuevos socios de la SEM	12
Tesis doctorales	13
M. ^a Adoración Herreros Elías, Aránzazu Valverde de Francisco, Alberto Pablo Macho Escribano, Álvaro San Millán Cruz, Amparo Gamero Lluna, Antonio Jesús Sánchez Valenzuela, David Benito Pescador, Elisabeth Rodríguez Güell, Aura Lyli Orozco Solórzano, Elvira Romero Guzmán, Inés García de la Banda García, Irati Martínez Malax-etxebarria, Joaquín Bernal Bayard, Isabel M. Matas Casado, Jose R. López Fernández, Lorena Palacios Domingo, Iria Uhía Castro, Liliana Tavares dos Santos, Nuria Salazar Garzo, Manuel Romero Bernárdez, M. ^a de Lourdes Moreno Amador, María Luján Jiménez Pranteda, Rafael Ruiz de la Haba, Miriam Martínez Castro, Rebeca Pérez Arnedo, Teresa Pérez González, Pablo Fernández Piñar, Tomás García Cayuela, Unai Pérez Sautu	
Socios que deberían actualizar datos	24
Especial «Grupo Especializado de Protistología»	
Presentación del Grupo Especializado de Protistología	25
Ana Martín González y Aurelio Serrano Delgado	
Biodiversidad Críptica	27
Genoveva F. Esteban, Bland J. Finlay, Francisco Guerrero, Francisco Jiménez-Gómez, Gema Parra, Andréa Galotti y José Luis Olmo	
El pirofosfato inorgánico, metabolito clave de una bioenergética sostenible bajo condiciones crónicas de estrés en procariontes, protistas y vegetales	31
Aurelio Serrano	
Ecología, aplicaciones biotecnológicas y sistemática de protistas	34
Lucía Arregui, Pilar Calvo, Almudena Guinea, Mercedes Martín-Cereceda, Blanca Pérez-Uz, Humbert Salvadó y Susana Serrano	
Identificación y caracterización de nuevas estrategias terapéuticas para el control de las enfermedades protozoarias	37
Dolores González Pacanowska y Luis M. Ruiz Pérez	
Biología celular y molecular del estrés microbiano: los ciliados como modelo	40
Juan Carlos Gutiérrez y Ana Martín-González	
Aplicabilidad de las microalgas en estudios de contaminación de sistemas acuáticos ..	43
Ángeles Cid Blanco	
Dinoflagelados tóxicos marinos: Aspectos ecológicos, sanitarios y filogenéticos	45
Beatriz Reguera y Irma Marín	
CECT, año 2010	49
Esperanza Garay, directora de la CECT	

Lorenzo de la Hoz Perales

Juan A. Ordóñez
Catedrático de la UCM



Estimados lectores y socios de la SEM:

El profesor Don Lorenzo de la Hoz Perales falleció el 31 de Marzo. Tenía 55 años. Permítaseme unas letras para glosar a un científico cabal y querido en todos los ambientes.

Allá por el año 1978 se celebró en León un encuentro internacional sobre Bioquímica y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos.

Un joven cabo que hacía la “mili” con destino en la guarnición de León de sementales del ejército asistió como oyente. Se acercó a mí y se presentó. Así conocí a Lorenzo. Finalizado el servicio militar, consiguió una beca de FPI bajo la supervisión de Don Bernabé Sanz, quien lo puso a mi cargo, y desde entonces ya no volvimos a separarnos. Pronto se nos unió Isabel y formamos un cohesionado triunvirato que ha caminado durante tres décadas en sinergia con otros compañeros del Departamento (Lola, Marisa y Gonzalo), sin olvidar a dos de nuestras discípulas (Manuela y Eva) que hoy día son Profesoras Titulares.

Como compañero y amigo muy próximo a él, me llegan muchos mensajes de numerosas Universidades, IRTA, INIA, CSIC, AINIA AZTI y de diversas industrias cárnicas, en los que expresan emocionadas condolencias por su muerte.

La trayectoria universitaria de Lorenzo es totalmente ortodoxa: licenciado, becario FPI, Doctor “cum laude”, Profesor Titular y finalmente Catedrático. Dos estancias en el extranjero (en el *Hannah Research Institute* de Ayr y en el *Torry Research Station* de Aberdeen), asistencias a congresos, participación en cursos de postgrado, publicaciones de sobra en revistas SCI (más del centenar), etc. También desarrolló actividades de gestión, como director del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UCM durante 8 años, miembro de la Junta Directiva del Grupo de Microbiología de los Alimentos de la SEM, participación en diversas comisiones, evaluador de la ANEP y otras agencias similares y de numerosos artículos de revistas internacionales. En fin, un historial muy brillante labrado con trabajo, dedicación y sabiduría.

La actividad investigadora de Lorenzo ha estado ligada al sector cárnico, habiendo formado parte de más de dos decenas de proyectos de investigación, siendo coautor de un centenar de artículos científicos de los que más del 70% fueron publicados en revistas de difusión internacional. También codirigió una docena de tesis doctorales. Trabajó en líneas de investigación relacionadas con la reducción de grasas en la carne de monogástricos, microbiología y bioquímica de cultivos iniciadores de productos cárnicos madurados o la aplicación de tecnologías emergentes para la higienización de productos cárnicos listos para su consumo. En la actualidad también ejercía como coordinador del subproyecto “Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de productos

cárnicos listos para su consumo (RTE)”, incluido en el macroproyecto “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables” (Carnisenusa), circunscrito al programa Consolider-Ingenio-2010.

En su vida extrauniversitaria también tenía su propia personalidad. Por ejemplo, era muy hábil elaborando aguardientes con frutas de todo tipo: guindas, uvas, higos, orejones de melocotón, etc., tenía una gran destreza (adquirida en sus estancias en Escocia) para degustar whiskys “*single malt*” y era un experto conocedor de las setas comestibles que todos los otoños buscaba, recogía, regalaba y cocinaba. No obstante, sus mayores aficiones eran la colección de estilográficas y piezas de alfarería. Tenía plumas de muchas marcas y siempre escribía con estilográfica relegando los prácticos bolígrafos. Compraba plumas usadas a precio barato en los mercadillos escoceses, en el rastro o, vía Internet, en la subasta de eBay, y después las reparaba.

La otra gran afición era la alfarería. Tenía potes, cántaras, botijos, pucheros, etc. pero su pasión eran las cántaras. Cuando íbamos de comisiones o tribunal, él llevaba una copia de una tesis doctoral realizada en los años 1970 por alguna (no recuerdo el nombre) licenciada en Filosofía donde venían recogidas las alfarerías que aún quedaban en España. La tesis se hizo antigua y cada vez encontrábamos menos alfareros; iban muriendo pero Lorenzo no cesaba. Recuerdo que en una ocasión en Cáceres me dijo “vamos a Arroyo de la Luz que todavía queda un alfarero”. Dicho y hecho, finalizada la defensa de la tesis doctoral, cogimos el coche y camino del pueblo; encontramos al alfarero y adquirí alguna pieza pero el hecho más importante fue un descubrimiento singular en una de las iglesias del pueblo, la dedicada a la Asunción donde había, y hay, un magnífico retablo del escultor Morales “el divino”. ¡Qué maravilla! Yo, cuando viajaba, le traía siempre una cántara; de Mallorca, Marruecos, Melilla, etc. Por cierto, la de Melilla la compré en una tienda de cosas antiguas y cuando se la regalé, me dijo ¡qué bonita, es berebere! No sólo le gustaba coleccionarlas sino que era un ducho en la materia. En su casa, una planta está llena de piezas de alfarería.

He sentido mucho su falta, Isabel también. El triunvirato quedó mutilado. Ahora nos las tenemos que arreglar sin sus sentencias. Era muy pragmático y agudo cuando teníamos que decidir algo, nosotros dudábamos qué camino tomar; él no opinaba, más bien sentenciaba de inmediato y tenía la virtud de acertar. ¡Cómo lo vamos a echar de menos!

Solo me queda dedicarles a su mujer, Marta, y a su hija, Ana, esta pequeña glosa y decirles que Lorenzo dejó huella allá por donde pasó. Que es un lujo pertenecer a la familia de una persona como Lorenzo, sencillo en sus costumbres, agudo en sus apreciaciones, seguro en sus decisiones, noble en sus relaciones con los compañeros, honesto en su trabajo, metódico en sus aficiones y, finalmente, querido y respetado en los ambientes científicos, académicos y sociales. Todos esos atributos se los había ganado con su sencillez, aplomo, sinceridad y tolerancia.

Descanse en paz.

Reunión del Grupo de Taxonomía, Filogenia y Diversidad Microbiana en Sevilla

David Ruiz-Arahal
Universidad de Valencia
y Antonio Ventosa
Universidad de Sevilla



Miembros del Bergey's Manual Trust y del IJSEM. De pie, de izqda a derecha: K. Suzuki, J. Bowman, P. Meyers, A. Oren, J.F. Bernardet, P. Kämpfer, P. De Vos, K. H. Schleifer, H.J. Busse, R. Dunford, M. Goodfellow, H. Christensen, W.B. Whitman. Sentados, de izqda a derecha: A. Ventosa, S. Ferris, K. Rowlett, M.E. Trujillo y J. Staley.

Del 13 al 15 de mayo de 2010 se celebró en Sevilla el XIII Meeting on Microbial Taxonomy, Phylogeny and Diversity. La denominación en inglés ya apunta a que se trataba de una edición bastante singular. De hecho contaba con la participación de los miembros del Bergey's Manual Trust y del Comité Editorial del *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM). Esta ocasión se debió a que por primera vez ambos se reunían en España, concretamente en los días previos, fruto de las negociaciones de Antonio Ventosa quien además estuvo al frente del comité organizador de la reunión.

El transcurso de las actividades fue completamente en inglés, y la reunión contó con una elevada participación: 77 inscritos procedentes de 15 centros de España y 16 del extranjero. La reunión se mantuvo fiel a la costumbre de dar más relevancia a los jóvenes investigadores que expusieron con soltura, y aparentemente sin complejos, junto a investigadores de renombre como Hans-Jürgen Busse, Paul de Vos, Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Aharon Oren, Karl-Heinz Schleifer, James T. Staley y William B. Whitman, que impartieron las ponencias. El programa científico contó además con 21 comunicaciones orales, una sesión especial, *Sequencing and Microbiology*, a cargo de Miguel Álvarez de Roche Applied Science, y 15 comunicaciones en forma de póster.

El premio a la mejor comunicación oral (diploma y 300 €) recayó en José Antonio Morillo Pérez mientras que el premio al mejor póster (diploma y 200 €) fue para Maribel Farfán.

Por su parte el programa social fue también excepcional: un cóctel de bienvenida (13 de mayo), una animada cena de gala en el Hotel Alfonso XIII (14 de mayo) y una excursión a Jerez de la Frontera para visitar las bodegas González-Byass (15 de mayo), permitieron momentos de mucha camaradería que todos los participantes apreciaron.



XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

19-22 septiembre 2010, Valladolid

David Rodríguez Lázaro

Presidente del Comité Organizador del Congreso



Acto oficial de Inauguración del Congreso.

El lunes 20 de septiembre se realizó la inauguración oficial del congreso presidida por el Excmo Sr. Francisco Javier Álvarez Guisasaola, Consejero de Sanidad de la Junta de Castilla y León, acompañado por la Excmo. Sra. M^a Ángeles Porres Ortún, Alcaldesa-Presidenta sustituta del Excmo. Ayuntamiento de Valladolid, el Excmo Sr. Francisco Javier Carballo García, Presidente del grupo de Microbiología de los Alimentos de la Sociedad Española de Microbiología y el Dr. David Rodríguez Lázaro, Presidente del Comité Organizador del Congreso. En este acto de inauguración se tuvieron unas palabras de recuerdo y cariño para nuestro compañero y amigo el Dr. Juan Ignacio Reguera Useros profesor de la Universidad de Burgos, miembro de los Comités Científico y de Organización de este Congreso, tristemente fallecido dos semanas antes del inicio del mismo. Este XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos ha sido dedicado a su memoria.

La organización de esta edición se ha desarrollado en torno a las conferencias de inauguración y clausura, cuatro mesas redondas, cuatro sesiones de comunicaciones orales y dos sesiones de comunicaciones de póster. Además, se han dispuesto una conferencia invitada, cuatro works-

Del 19 al 22 de septiembre de 2010 se ha celebrado en el Palacio Conde Ansúrez de la Universidad de Valladolid la XVII edición del Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos (www.microalimentos-valladolid2010.com) que ha contado con más de 200 asistentes. El Congreso se inició el domingo día 19 de septiembre con una visita guiada por los puntos más representativos de la ciudad en el BUS TURÍSTICO “Móntate y recorre Valladolid” por gentileza del Excmo. Ayuntamiento de Valladolid.

hops empresa y un simposio Ciencia-Empresa. La conferencia inaugural corrió a cargo del Prof. Peter Raspor de la Universidad de Ljubljana (Eslovenia) con el título “The role of Food Microbiology in Food Safety and Quality” y a continuación se celebró la Mesa Redonda I con el título “Estrategias emergentes de conservación de los alimentos” patrocinada por NC Hyperbaric, S.L y moderada por el Dr. Miguel Prieto Maradona de la Universidad de León. Los ponentes fueron el Dr. John N. Sofos de la Universidad del Estado del Colorado (EE.UU.), el Dr. Frank Devlieghere, de la Universidad de Gante (Bélgica) y el Dr. Pablo Fernández Escámez de la Universidad Politécnica de Cartagena. En esta mesa redonda se describieron los principales aspectos emergentes en la conservación e higienización de los alimentos tales como la aplicación de tratamientos combinados, el efecto de los mismos en los alimentos y la aplicación de la biología de sistemas microbiológicos en tecnologías no térmicas. Para finalizar la jornada de mañana, se ofreció una recepción oficial y ágape en el Excmo. Ayuntamiento de Valladolid.

La Mesa Redonda II patrocinada por el Laboratorio Conda-Pronadisa estuvo dedicada a los avances en técni-



Entrega del Premio CASCAJARES al mejor microbiólogo de los alimentos, al Dr. José Miguel Soriano.

cas moleculares en microbiología de los alimentos y fue moderada por el Dr. Raúl Ortiz de Lejarazu de la Universidad de Valladolid y contó con los siguientes ponentes: la Dra. Rosa Aznar de la Universidad de Valencia, la Dra. María del Carmen Macián de la CECT, el Dr. Jesús García-Gil de la Universidad de Gerona, y el Dr. Martin Wagner de la Universidad Veterinaria de Viena. Esta mesa redonda se centró en el papel que los nuevos avances en técnicas de biología molecular han supuesto en el avance del diagnóstico en microbiología de los alimentos así como en la taxonomía bacteriana y en los estudios de ecología alimentaria. Como ejemplo se presentó un caso concreto del papel de estas técnicas en la elucidación de un brote de listeriosis en alimentos en Austria. Una vez finalizada la jornada del lunes se realizó una ruta turística "la Ruta del Hereje" basada en la novela del mismo nombre de D. Miguel Delibes por gentileza del Excmo. Ayuntamiento de Valladolid.

La Mesa Redonda III, coordinada por el Dr. Elías Rodríguez Ferri de la Universidad de León tuvo por título "*La microbiología de los alimentos más allá de los patógenos alimentarios*", y en ella participaron como ponentes el Dr. Baltasar Mayo, del IPLA-CSIC, el Dr. Miguel Ángel Asensio de la Universidad de Extremadura, el Dr. Manuel Martínez-Bueno de la Universidad de Granada, y la Dra. Marta Hernández Pérez del ITACyL. En esta mesa redonda se destacó el papel que juega el tracto gastrointestinal como fuente de microorganismos funcionales, la capacidad de proteínas ascomicetos para controlar el desarrollo de mohos toxigénicos en alimentos, las estrategias que se han desarrollado para la caracterización de la microbiota de quesos artesanales andaluces, y el papel de la metagenómica en el estudio de las alteraciones del queso como la hinchazón tardía.

La Mesa Redonda IV sobre temas emergentes en seguridad alimentaria fue coordinada por el Dr. Albert Bosch Navarro de la Universidad de Barcelona y contó con los ponentes: Dr. Gonzalo Zurera de la Universidad de Córdoba, Dr. Bruno Gonzalez Zorn de la Universidad Complutense de Madrid, Dra. Nerea Beguiristain de la Universidad de Barcelona y Dra. Sara Bover-Cid del IRTA. Se analizaron



Entrega del Premio OXOID a la mejor Tesis doctoral en Microbiología de los Alimentos, al Dr. Avelino Álvarez Ordóñez.

los nuevos enfoques para la gestión de la Seguridad Alimentaria a través de la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM) en alimentos como base científica para el establecimiento de los Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSO). Además se abordaron los últimos descubrimientos en resistencias a antimicrobianos, así como nuevas técnicas de eliminación de virus en alimentos y la modelización de la inactivación de *Listeria monocytogenes* por altas presiones hidrostáticas en jamón curado.

Además de las mesas redondas se han realizado dos conferencias plenarios: La primera fue realizada por el Ilmo. Sr. Jorge Llorente Cachorro, Director de la Agencia de Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria de la Junta de Castilla y León con el título "*Control Oficial de los riesgos microbiológicos*". En la misma se describieron las actividades que realiza la administración sanitaria y los principales resultados obtenidos en los últimos años en las inspecciones y controles realizados a nivel de Castilla y León. Asimismo, también se impartió la conferencia "*Simposio Ciencia-Empresa*" por parte de D. Carlos Ignacio Franco Alonso del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial, en la que se resumieron las principales líneas de ayudas que el Ministerio de Ciencia e Innovación tiene para la Investigación Industrial Aplicada.

Además en esta edición se ha contando con la inestimable ayuda del sector industrial. Se ha recibido ayuda de 23 patrocinadores y se han presentado 4 Workshops de empresa: Workshop Oxoid "*BAX Q7: Screening de patógenos alimentarios. Practicable, rápida y fiable*", Workshop Applied Biosystems "*Sistema de detección de patógenos alimentarios por PCR-Real Time: Una solución completa*", Workshop Bio-Rad "*New alternative methods for fast and reliable results in food testing*", y Workshop Bruker Biosciencias Española S.A. "*Microorganism Identification and Classification*".

En esta edición se han añadido por primera vez, tres nuevos premios para apoyar la investigación en microbiología de los alimentos: "**Premio CASCAJARES al mejor microbiólogo de los alimentos**", "**Premio OXOID a la mejor Tesis doctoral en Microbiología de los Alimentos**"



Entrega del Premio MICROBIAL a la mejor comunicación sobre métodos moleculares, a María Isabel Luque.



Entrega del premio a la mejor comunicación oral del Congreso para Katarina Kovač.

y “Premio MICROBIAL a la mejor comunicación sobre métodos moleculares aplicados a la microbiología de los alimentos”. El primero de ellos patrocinado por la Empresa Industria Gastronómica Cascajares y el grupo de alimentos que distingue al investigador en Microbiología de los alimentos menor de 40 años con una trayectoria e impacto destacados ha sido otorgado al Dr. José Miguel Soriano de la Universidad de Valencia que impartió la conferencia de clausura del congreso “*La proteómica aplicada al análisis de toxinas estafilocócicas alimentarias: hoja de ruta hacia el futuro*”. El segundo de ellos patrocinado por la Empresa OXOID premia a la mejor tesis doctoral en Microbiología de los Alimentos defendida en España en los dos últimos años, que ha recaído en el Dr. Avelino Álvarez Ordóñez de la Universidad de León por la tesis “*Estudio de los factores que determinan la respuesta de adaptación ácida y de protección cruzada frente al calor de Salmonella Typhimurium y Salmonella Senftenberg: mecanismos implicados*”. El tercer premio fue patrocinado por la Empresa MICROBIAL y distinguió la mejor comunicación presentada a esta edición del Congreso sobre métodos moleculares aplicados a la microbiología de los alimentos, que recayó sobre María Isabel Luque de la Universidad de Extremadura por el póster titulado “*Desarrollo de métodos de PCR convencional y en tiempo real para detectar mohos productores de aflatoxinas en alimentos madurados*”.

Se han presentado un total de 105 comunicaciones en las temáticas siguientes: seguridad alimentaria, conservación de los alimentos, desinfección de los alimentos, metodología, probióticos, productos fermentados, microorganismos alterantes, alimentos funcionales, genómica microbiana, virología, enología y otras. De las 105 comunicaciones, el Comité Científico seleccionó 23 que fueron expuestas de forma oral en las cuatro sesiones previstas abriéndose al final de cada sesión un debate sobre los resultados y conclusiones de las comunicaciones presentadas. Como en anteriores ediciones se hizo entrega del

premio a la **mejor comunicación oral**, que en esta edición recayó para Katarina Kovač de la Universidad de León e ITACyL por la comunicación “*Inactivation of noroviruses in strawberry puree using high hydrostatic pressure*”. Las 82 comunicaciones restantes se expusieron en dos Sesiones de posters.

Además, durante el Congreso tuvo lugar la Asamblea del Grupo Especializado de Microbiología de los Alimentos en la que se eligió como nuevo vicepresidente al Dr. Gonzalo Doroteo García de Fernando Minguillón de la Universidad Complutense de Madrid que sustituye a la Dra. Margarita Medina, como secretaria a la Dra. Antonia María Picón Gálvez del INIA que sustituye al Dr. Juan Miguel Rodríguez Gómez, y como vocales a José Fernández Salguero Carretero, David Rodríguez Lázaro y Santiago Condón Usón. También se designó a la Dra. Elena González Fandos de la Universidad de la Rioja para la organización del próximo XVIII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos en Logroño-2012.

El acto de clausura fue presidido por el Ilmo. Sr. Jorge Llorente Cachorro, Director de la Agencia de Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria de la Junta de Castilla y León, el Excmo Sr. D. Ricardo J. Rigual Bonastre Decano de la Facultad de Medicina de Valladolid, el Excmo. Sr. Luis Alberto Calvo Sáez, el Excmo. Sr. Francisco Javier Carballo García, Presidente del grupo de alimentos de la Sociedad Española de Microbiología y el Dr. David Rodríguez Lázaro, Presidente del Comité Organizador del Congreso. En este acto se leyeron las conclusiones y también se presentó la XVIII edición del Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos a celebrar en Logroño en el 2012.

Si desean más documentos gráficos del congreso pueden encontrarlos en Picasa a través de la web:

[http://picasaweb.google.si/114674157454867039888/XVII CONGRESONACIONALDEMICROBIOLOGIADELOSALIMENTOS?authkey=Gv1sRgCLqC7en1zOm4pAE&feat=email#](http://picasaweb.google.si/114674157454867039888/XVII%20CONGRESONACIONALDEMICROBIOLOGIADELOSALIMENTOS?authkey=Gv1sRgCLqC7en1zOm4pAE&feat=email#)

VIII Reunión del grupo de Microbiología Molecular

10 al 12 de noviembre de 2010, Barcelona

María Molina

Presidenta del Grupo de Microbiología Molecular



Panorámica de la sesión inaugural de la VIII Reunión del grupo de Microbiología Molecular. Presidida por el Prof. Antonio Juárez, celebrada en el Aula Magna "Enric Cassassas" de la Facultad de Ciencias Físicas en la Universidad de Barcelona.

La VIII Reunión del grupo de Microbiología Molecular se celebró en Barcelona del 10 al 12 de noviembre de 2010, en el Campus de Pedralbes de la Universidad de Barcelona. El Comité organizador formado por los profesores Antonio Juárez, Cristina Madrid, Carlos Balsalobre y Eduard Torrent realizó una excelente labor para que todos los participantes pudieran presentar sus trabajos y asistir a todas las sesiones en un ambiente animado de camaradería y discusión científica.



Entrega del Premio BIOMEDAL. De izquierda a derecha, María Molina, Presidenta del Grupo, Elena Rivas, Directora Comercial de Biomedal SL, Laura Selva y David Viana Martín galardonados con el premio BIOMEDAL, Bruno González Zorn, Vicepresidente del grupo.

La conferencia inaugural versó sobre un tema de gran actualidad: “Generación de compuestos bioactivos en microorganismos mediante biosíntesis combinatoria”, siendo impartida por el profesor José Antonio Salas de la Universidad de Oviedo. La reunión contó con la participación de 150 asistentes, que presentaron 57 pósters y 38 comunicaciones orales en 7 sesiones científicas diferentes que se celebraron en el Aula Magna “Enric Casassas” de la Facultad de Ciencias Físicas, en las que se abordaron variados aspectos de la Microbiología Molecular. Estas sesiones y sus moderadores fueron las siguientes: *Envueltas celulares y comportamiento poblacional* (Íñigo Lasa y José R. Penadés), *Antimicrobianos y mecanismos de resistencia* (Jesús Blázquez y Bruno González Zorn), *Virulencia bacteriana I* (Junkal Garmendia y Josep Casadesus), *Virulencia bacteriana II* (José A. Bengoechea y Juan M. García Lobo), *Estructura de macromoléculas microbianas* (Rafael Giraldo), *Regulación, metabolismo y estrés* (Montserrat Llagostera y Carlos Balsalobre) y *Vacunas* (Eduard Torrents). Como en reuniones precedentes, es destacable el elevado nivel científico de los trabajos presentados, en su mayoría por jóvenes investigadores, así como la labor de los moderadores en conducir la discusión.

En el acto de clausura se entregaron ocho premios a los mejores trabajos presentados en la Reunión y se dio a conocer el resultado del I Premio de Investigación BIOMEDAL concedido al trabajo publicado en 2009 en *Proce-*



Investigadores galardonados con los premios a los mejores trabajos (comunicaciones orales y pósters) presentados en la Reunión.

dings of the National Academy of Sciences of the United States of America (vol. 106 (4): 1234–1238) titulado: “Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction” realizado por los investigadores Laura Selva, David Viana, Gili Regev-Yochay, Krzysztof Trzcinski, Juan Manuel Corpa, Íñigo Lasa, Richard P. Novick, y José R. Penadés. El premio consistente en un diploma acreditativo para cada uno de los autores y una dotación económica de 1500 euros fue entregado por la Directora Comercial de Biomedal SL, Elena Rivas, y por la Presidenta del grupo de Microbiología Molecular, María Molina. El trabajo premiado, en el que se describe una novedosa estrategia de competitividad bacteriana, fue presentado como Conferencia de Clausura por la primera firmante del artículo, Laura Selva (Universidad Cardenal Herrera-CEU).

Durante la reunión se celebró una asamblea ordinaria del grupo, en la que se encargó la organización de la próxima reunión del grupo especializado dentro de dos años a José Antonio Bengoechea en Palma de Mallorca. Además, se propuso encargar a Juan Ayala la organización del Simposio del Grupo sobre “*Metagenómica, Metabólica y Marcadores Moleculares para el Microbioma Humano*” para el próximo Congreso Nacional de la SEM en Salamanca (más información en el informe del grupo).

Además de los actos científicos, los participantes en la Reunión gozaron del enorme privilegio de realizar una visita guiada al Museo Picasso y disfrutar allí mismo de una magnífica cena.

La era «ómica» ya es una realidad en la microbiología de plantas

Ramón Penyalver

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)



Figura 1. Miembros de la Junta Directiva del Grupo de Microbiología de Plantas. De izquierda a derecha, Alejandro Pérez García, Pablo Rodríguez Palenzuela, Antonio de Vicente, Emilia López Solanilla, Jesús Murillo (Presidente saliente) y Ramón Penyalver.

Del 16 al 20 del pasado mes de febrero se celebró en Tánger (Marruecos) la IV reunión del grupo especializado “Microbiología de Plantas” (MiP), durante la cual se produjo un relevo parcial en la Junta Directiva, que ha quedado constituida por: **Antonio de Vicente** (IHSM-UMA-CSIC) como Presidente, **Pablo Rodríguez Palenzuela** (CBGP-UPM-INIA) como Vicepresidente, **Alejandro Pérez García** (IHSM-UMA-CSIC) como Secretario, **Emilia López Solanilla** (CBGP-UPM-INIA) como Tesorera, **Ramón Penyalver Navarro** (IVIA) y **Nuria Gaju Ricart** (UAB) como vocales (**Fig. 1**).



Figura 2. Asistentes a la IV reunión del grupo especializado “Microbiología de Plantas” (MiP), Tánger (Marruecos).

Queremos nuevamente agradecer en nombre de todos, a los miembros salientes de la Junta Directiva, **Anna Bonatterra** (UdG) y, en particular, a nuestro primer, y para siempre, Presidente, **Jesús Murillo** (UPN); por su tarea y dedicación durante los primeros años del Grupo, desde que formaban parte de la Junta Gestora, encargándose de transformar una idea que surgió hace unos años, en la magnífica realidad que es hoy, como hemos podido comprobar en esta última reunión celebrada en Tánger.

En la reunión se dieron cita algo más de 50 participantes, provenientes principalmente de universidades, INIA, CSIC y algún otro centro de investigaciones regional (Fig.2).

El formato de la misma fue, el ya clásico en esta reunión bienal, dar preferencia a la exposición oral de los trabajos por parte de los estudiantes predoctorales o postdoctorales, en las distintas áreas de la microbiología de plantas: etiología, patogénesis, ecología e interacción microbio-planta. Como novedad y muy apropiado por las fechas, se organizó un debate bajo el título “**Ya he secuenciado... ¿y ahora qué?**”, conmemorando el X aniversario de la publicación del genoma humano (2001) y de los primeros genomas completos de bacterias asociadas a plantas, como por ejemplo *Xylella fastidiosa* (2000) y *Agrobacterium tumefaciens* (2001), entre otras. El debate generó un gran interés y sacó a relucir aspectos cruciales a tener en cuenta en esta nueva era “ómica” de la microbiología. En cuanto a aspectos estrictamente de genómica, son varios los grupos que ya han participado en la secuenciación y/o análisis de algún genoma completo de algún microbio asociado a plantas. A este respecto en esta reunión, entre otros trabajos, se presentó la identificación a nivel genómico de genes de *Pseudomonas savastanoi* necesarios para multiplicarse y mantenerse en plantas de olivo; o el estudio de las proteínas quimiorreceptoras (MCPs) de dos genomas completos, como son los de *Dickeya dadantii* y *P. syringae* pv. *tomato*. Además, también se presentó el análisis en detalle del genoma de *P. fluorescens* F113, revelando inesperadas adaptaciones al ambiente rizosférico. Entre los proyectos de investigación de gran envergadura en el área de genómica,

en los que participan equipos pertenecientes a este grupo especializado, se encuentra el proyecto titulado “Estrategias genómicas dirigidas al control biológico de enfermedades fúngicas de cultivos relevantes en Andalucía”, financiado por el PAIDI de la Junta de Andalucía, donde se aborda la secuenciación del genoma, y el análisis comparativo de los mismos, de cinco cepas de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. con actividad de biocontrol contra hongos fitopatógenos. Está liderado por el Dr. **Cayo Ramos** (IHSM-UMA-CSIC), y en el mismo participan más de 20 investigadores no sólo de la UMA y el CSIC, sino también de otros centros españoles como el CBGP o el IVIA, donde además se está realizando el análisis en profundidad del genoma completo del agente de biocontrol *Agrobacterium* sp. cepa K84, y por último, también participan algunas instituciones extranjeras como la Universidades de Michigan y Harvard en USA, Reading de UK y Groningen de Holanda.

Como también se apuntó en dicho debate, entre las cosas que se pueden abordar, aparte de conocer *in silico* un genoma, sería determinar el conjunto de genes de todo el repertorio posible de un organismo, que se están expresando en un determinado nicho, como por ejemplo, durante la interacción con el huésped o la adaptación a un ambiente específico, como la superficie foliar, el apoplasto o la rizosfera, mediante aproximaciones transcriptómicas (hibridación de *microarrays* o secuenciación masiva del mRNA). A este respecto ya se han realizado trabajos con *A. tumefaciens*, *P. putida*, *P. syringae* pv. *tomato* o *Rhizobium leguminosarum*, entre otras bacterias. En esta reunión ya se presentó, no sólo un estudio transcriptómico, si no también metabolómico, de la interacción de *Trichoderma* con plantas de tomate.

Como conclusión, durante esta IV reunión del grupo especializado “Microbiología de Plantas” (MiP), se ha puesto de manifiesto que la era “ómica” ya es una realidad también en la microbiología de plantas. Sin embargo, también mostró, que a día de hoy, existe una gran diferencia en cuanto al “*state of the art*” entre las bacterias de plantas y otros organismos, como por ejemplo los hongos biotrofos, donde esta “ciencia” está empezando a despegar.

Biología de los Microorganismos Patógenos

Ángel Domínguez

Estimados compañeros: El mes pasado he sido elegido presidente de este grupo especializado. Sirva esta primera comunicación para agradecer a los miembros del grupo su confianza en mi persona, especialmente a aquellos que amablemente avalaron mi candidatura. Me pongo enteramente a vuestra disposición para lo que creáis conveniente y espero vuestras sugerencias para avanzar en nuestra tarea. Espero que sea capaz de trabajar por el grupo y nuestra Sociedad para potenciarlos en la medida de lo posible. Probablemente, alguna de mis primeras medidas será reactivar la información sobre el grupo en la página web e incorporar algún miembro más a nuestra Junta directiva.

A modo de presentación para aquellos que no me conozcan, soy Catedrático de Microbiología y, en la actualidad, director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca. Mis líneas de investigación son *Modelos experimentales en enfermedades infecciosas y Levaduras no-conventionales*, participando en diversos proyectos europeos. Así mismo, he sido evaluador en Bruselas, por lo que pongo mi experiencia a vuestra disposición.

Biodeterioro, biodegradación y biorremediación

Asunción de los Ríos Murillo

El Grupo de Biodeterioro y Biodegradación fue creado en 1989, con el fin de reunir a los investigadores interesados en temas de Biodeterioro y Biodegradación. En respuesta a la evolución de estas temáticas y al desarrollo en estrecha interrelación del campo de la Biorremediación, se ha decidido en la Junta del Grupo y posteriormente informado en la Junta de la SEM, un cambio para incluir esta temática en el nombre del Grupo, que ha pasado a llamarse Grupo de Biodeterioro, Biodegradación y Biorremediación. El Grupo organiza en el XXIII Congreso Nacional de Microbiología un simposio

de título "Nuevos avances en la degradación medioambiental" organizado por la Dra. C. Abrusci (UAM), que contará con financiación de la empresa Thor Especialidades, S.A. y que tiene los siguientes ponentes.

- José Palomar (UAM). Los líquidos iónicos como alternativa a los disolventes industriales: Posible impacto ambiental y tratamientos de eliminación.
- Fernando Rojo (CNB, CSIC). Las bacterias hidrocarbonoclasticas en la degradación de vertidos de petróleo en el mar.
- Fernando Catalina. (ICTP, CSIC). Biodegradación de polímeros oxo-biodegradables. Empleo de aditivos prodegradantes.
- Clementina Pozo (UG). Tratamiento biológico de residuos generados en el proceso de obtención del aceite de oliva.

Durante el XXIII Congreso Nacional de Microbiología el Grupo entregará el premio THOR al mejor póster sobre Biodeterioro, Biodegradación y Biorremediación.

Microbiología de los Alimentos

Francisco Javier Carballo

Simposio en el XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología

El próximo 12 de julio, de 9 a 11 horas, en el marco del XXIII Congreso Nacional de Microbiología a celebrar en Salamanca, y moderado por la Dra. Elena González Fandos, Catedrática de Tecnología de Alimentos de la Universidad de la Rioja, tendrá lugar el Simposio titulado "Estrategias en seguridad Alimentaria", con las siguientes ponencias y ponentes:

- **Alimentación y Salud: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.**
Ana Canals Caballero, Vocal Asesora, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).
- **Nuevos retos en seguridad alimentaria.**
Gonzalo Zurera Cosano, Catedrático de Nutrición y Bromatología, Universidad de Córdoba.
- **Estándares de certificación y seguridad alimentaria.**
Pilar Bordetas, Directora General

AYCSL Agroalimentación y Calidad.

- **Seguridad alimentaria: Caso práctico de la industria alimentaria.**

Raquel Bernácer, Directora Técnica Unilever España.

Homenaje al Profesor Reguera Useros

A la finalización del simposio descrito con anterioridad tendrá lugar un pequeño acto de homenaje al Dr. D. Juan Ignacio Reguera Useros, profesor de Microbiología de la Universidad de Burgos y antiguo miembro de la Junta Directiva de la SEM, recientemente fallecido.

Docencia y difusión de la Microbiología

Montserrat Llagostera

En nuestro primer cumpleaños, desde la creación del Grupo D+D SEM en abril de 2010, podemos decir que nuestro grupo ha dado ya sus primeros pasos. En este año, los miembros de la Comisión Gestora hemos centrado nuestra actividad en dar a conocer este nuevo grupo y en promover la afiliación de los miembros de nuestra sociedad a D+D SEM. Junto a ello, los grupos de trabajo que se crearon hace un año han dado ya algunos resultados concretos. El más destacado es tal vez nuestra página web (www.semicro.es/docencia), nuestro escaparate, donde podéis acceder a toda la información disponible sobre el grupo y sus actividades, así como participar en un foro de discusión y acceder a información (blogs, material y herramientas docentes) generada por nuestros miembros.

Nuestro grupo ha participado en la organización de tres Jornadas de Calidad e Innovación Docente en Microbiología, celebradas en Sevilla, Granada y Alicante, y estamos preparando una cuarta para el 10 de junio en Madrid, al tiempo que trabajamos para el Simposio que tendrá lugar en el próximo Congreso Nacional de la SEM en Salamanca. El grupo también apadrina ahora el tradicional Curso de Iniciación a la Investigación en Microbiología de la SEM que se celebrará en junio en Oviedo.

En este momento el grupo D+D SEM cuenta ya con más de 150 socios, por tanto estamos ya en condiciones de proseguir las tareas que inició la Comisión Gestora y de emprender nuevas metas. Para ello, nos proponemos convocar en breve elecciones a la Junta

directiva del grupo, la cual estará compuesta por los siguientes cargos: Presidente, Vicepresidente, Secretario, 7 vocales y webmaster.

Desde *Actualidad SEM* queremos agradecer vuestro apoyo a todos los que ya sois miembros de este grupo transversal y pediros que aprovechéis el marco que nos ofrece el XXIII Congreso Nacional de Microbiología para presentar vuestra innovación docente y actividad en difusión. Asimismo, también os pedimos que asistáis a la primera reunión de nuestro grupo que se celebrará en Salamanca ya que es una oportunidad de conocernos, organizarnos y proponer nuevas metas referidas a innovación y difusión de la Microbiología.

Microbiología Molecular

María Molina Martín

En la asamblea ordinaria del grupo, celebrada en Barcelona el 10 de noviembre durante la VIII Reunión del grupo de Microbiología Molecular, se propuso el tema “Metagenómica, Metabolómica y Marcadores Moleculares

para el Microbioma Humano” para el Simposio del Grupo en el próximo Congreso Nacional de la SEM en Salamanca, y se encargó su organización al Dr. Juan Ayala. El simposio, que tendrá lugar el martes 12 de Julio, contará con los siguientes ponentes: Carles Ubeda Morant (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York, USA*), Giuseppe d’Auria (Centro Superior de Investigación en Salud Pública CSISP/UVEG, Valencia), Dusko Ehrlich (*INRA Centre of Jouy-en-Josas, Francia*) y Catherine Stanton (*Teagasc, Alimentary Pharmacobiotic Centre Cork, Irlanda*). La actividad científica del grupo quedará además reflejada en las sesiones de pósters y comunicaciones orales que se desarrollarán en él.

Hongos Filamentosos y Levaduras

Amparo Querol

El grupo ha organizado en este periodo el simposio “Nuevas perspectivas en Micología” que tendrá lugar en el XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Este simposio

trata de agrupar los últimos avances en el campo de la Micología, tanto en el ámbito de los hongos filamentosos como de las levaduras y será moderado por María Jesús Martínez (CIB-CSIC, Madrid). Las ponencias propuestas son:

- Josep Cano. Universidad Rovira y Virgili. Tarragona. “Taxonomía de hongos filamentosos de interés clínico.”
- Elena Hidalgo. Universidad Pompeu Fabra. Barcelona. “Papel dual del estrés oxidativo en toxicidad y en señalización celular en la levadura de fisión.”
- Sergi Puig. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Valencia. “Mecanismos de respuesta de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a la deficiencia de hierro y cobre.”
- Carlos Rodríguez-Vázquez de Aldana. Instituto de Biología Funcional y Genómica. CSIC. Salamanca. “Gluconasas y endocitos en *Schizosaccharomyces pombe*.”

El grupo participará con la SEM, como en años anteriores, subvencionando becas y/o premios para incentivar la participación de jóvenes científicos en este congreso.

Nuevos socios de la SEM

Altas del 28/7/2010 al 13/4/2011

- Acebo País, Paloma
- Albarral, Vicenta
- Alonso Viana, Raúl
- Álvarez Lanzarote, Ignacio
- Álvarez Pérez, Sergio
- Álvarez Suárez, María Elena
- Ariza Miguel, Jaime
- Blánquez, Alba
- Bosch Roig, Pilar
- Caballero Gómez, Natacha
- Carrión Fonseca, Ornella
- Castañeda Ojeda, María del Pilar
- Cendra, Mar
- Clemente Ramos, José Ángel
- Cobas Pupu, Guillermo
- Colomer Winter, Cristina
- Curto Borrego, M^a Ángeles
- De Francisco Martínez, Patricia
- De León Marcos, Nagore
- Díaz del Toro, Silvia
- Díaz Portuondo, Emiliano Enrique
- Diéguez Casal, Ernesto
- Díez Martínez, Roberto
- Díez Valcarce, Marta
- Domínguez Clavería, Lidia
- Estravis Sastre, Miguel
- Fernández Fuentes, Miguel Ángel
- Fernández Martínez, Lorena
- Freixeiro Díaz, Paula
- Gallegos Fernández, Mari Trini
- García Esteban, María Teresa
- García Fernández, Esther
- García Rodas, Rocío
- Gutiérrez Soriano, Belén
- Hernansanz Ruiz Gálvez, M^a Ángeles
- Hidalgo del Río, Laura
- Hoya Gallego, Marta
- Kovac, Katarina
- Marín Muñoz, Elvira
- Matrat, Stéphanie
- Menéndez Gutiérrez, Esther
- Mezquita Regueiro, Susana
- Molina García, Laura
- Moya Simarro, Andrés
- Muñoz Félix, Sofía
- Orruño Beltrán, Maite
- Palomino del Castillo, Carmen
- Palomino Ramiro, Juan Manuel
- Penacho Martín, Ana Vanessa
- Pérez Cobas, Ana Elena
- Pérez Martín, José
- Plaza Llorente, Benjamín
- Remuzgo Martínez, Sara
- Rodríguez Cerrato, Violeta
- Rodríguez Llorente, Ignacio David
- Romero Fernández, Patricia
- Sacristán Pérez-Minayo, Gonzalo
- Sánchez Hidalgo, Marina
- Sánchez Valenzuela, Antonio Jesús
- Sanglas Baulenas, Ariadna
- Simón Soro, Aurea
- Soler Cortadellas, Xavier
- Soto Misffut, María José
- Tejedor Gil, María del Carmen
- van Dillewijn, Pieter
- Velázquez Molinero, Rocío
- Vicente Muñoz, Miguel
- Vieytes Arcomano, Lisandro Pablo
- Zafra Domene, María José

Selección de bacterias lácticas, aisladas de un queso de cabra artesanal, en función de su aptitud tecnológica y elaboración de un cultivo iniciador destinado a la industrialización de quesos artesanales

M^a Adoración Herreros Elías

Directores: **José M^a Fresno Baro**

y **M^a Eugenia Tornadijo Rodríguez**

Departamento de Higiene y

Tecnología de los Alimentos,

Facultad de Veterinaria, Universidad de León

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue seleccionar desde un punto de vista tecnológico cepas de bacterias lácticas autóctonas, con vistas a la obtención de variedades de queso tradicionales conservando sus características originales.

Para este estudio se seleccionaron 31 cepas de la colección de bacterias lácticas aisladas de un queso de cabra artesanal, el queso de Armada, variedad Sobado. Dichas cepas identificadas a nivel de especie fueron caracterizadas genéticamente y sometidas a pruebas de compatibilidad y a ensayos de resistencia a antibióticos.

Sobre los cultivos celulares de dichas cepas se realizaron estudios cuantitativos de velocidad de acidificación, actividad proteolítica por el test OPA y actividad enzimática mediante galerías API-ZYM. Sobre los extractos libres de células se determinaron las actividades aminopeptidasa, carboxipeptidasa, dipeptidasa, caseinólítica y esterolítica. Los resultados obtenidos nos permitieron seleccionar hasta un total de 13 cepas adecuadas para su uso como cultivo iniciador.

A continuación se elaboraron seis lotes de queso de Armada: uno de ellos con leche cruda, sin la adición de cultivos, otro con leche pasteurizada empleando un cultivo iniciador comercial mesófilo y los otros cuatro lotes con leche pasteurizada empleando diferentes combinaciones de las siguientes cepas autóctonas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Enterococcus raffinosus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum*.

En cada uno de los lotes se recogieron muestras de leche, cuajada y queso con 7, 15, 30, 60 y 120 días de maduración con objeto de estudiar la evolución de los recuentos microbiológicos, la de los parámetros físico-químicos y bioquímicos y realizar un análisis sensorial.

Los quesos producidos a partir de leche pasteurizada inoculada con los cultivos iniciadores experimentaron durante las primeras etapas de la maduración un descenso del pH mayor que los elaborados con leche cruda. El incremento en la acidez titulable también fue más pronunciado en las cuajadas elaboradas con leche pasteurizada inoculada con los cultivos iniciadores pero con la maduración los quesos experimentaron un incremento de acidez inferior al de los elaborados con leche cruda.

La evolución del contenido en lactosa también dirigió de unos lotes a otros, siendo indetectable en el lote elaborado con leche cruda a partir de la primera semana de maduración.

La extensión de la proteólisis, determinada por el Nitrógeno Soluble a pH 4,4 (%NS-pH 4,4/NT) fue muy escasa en todos los lotes de queso. Por el contrario, la profundidad de la proteólisis (%NS-TCA12%/NT) fue más intensa, si bien existieron diferencias entre lotes. El contenido en Nitrógeno Soluble en PTA5% (%NS-PTA5%/NT) mostró un incremento más o menos acusado en todos los lotes. La relación más baja entre los péptidos hidrofóbicos y los hidrofílicos al final de la maduración se obtuvo en los quesos que mejores puntuaciones globales obtuvieron en el análisis sensorial.

El análisis sensorial se realizó por un panel de ocho catadores evaluando el aspecto de la pasta, olor, textura en boca, sabor y aroma, persistencia y gusto residual. Los cultivos empleados establecieron diferencias sensoriales entre los distintos lotes de queso.

Beta-Lactamasas de Espectro Extendido en Enterobacteriaceae: bases genéticas y epidemiológicas de su diseminación en diferentes compartimentos

Aránzazu Valverde de Francisco

Directores: **Rafael Cantón**

y **Teresa Coque**

Servicio de Microbiología. Hospital

Universitario Ramón y Cajal. Madrid.

Facultad de Farmacia. Universidad

Complutense de Madrid

Las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que hidrolizan cefalosporinas incluidas las de amplio espectro y los monobactamas pero no las cefamicinas o los carbapenemas y son inhibidas por el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Desde su primera descripción en la década de 1980 han supuesto un importante problema de salud pública a nivel nosocomial y en los últimos años en la comunidad. En esta Tesis se analizó la epidemiología, la estructura poblacional y se profundizó en el estudio de los elementos genéticos implicados en la diseminación de las enterobacterias productoras de BLEE tanto en el ámbito hospitalario (Hospital Universitario Ramón y Cajal) como en el extrahospitalario (Área sanitaria 4 de Madrid) mediante la aplicación de diferentes técnicas de microbiología molecular. Se realizaron estudios epidemiológicos de portadores fecales que mostraron un aumento en la prevalencia de pacientes hospitalizados y de individuos de la comunidad colonizados con enterobacterias con BLEE. Se constató una gran variabilidad de tipos de BLEE, con un predominio de las enzimas CTX-M-14 y SHV-12, principalmente en aislados de la comunidad y del medio ambiente. Asimismo, se observó un notable cambio epidemiológico por la introducción en los últimos años de enzimas del grupo CTX-M-1. También se analizó especifi-

camente la epidemiología de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productor de BLEE dónde se mostró igualmente un aumento de los aislados de pacientes de la comunidad, una elevada diversidad clonal con escasos brotes, la emergencia y persistencia de distintas BLEE y la presencia de plásmidos altamente transmisibles asociados a distintos tipos de enzimas. En esta Tesis se describió un nuevo integrón (In117) donde se localiza el gen *bla*_{CTX-M-2} y que constituye uno de los pocos ejemplos de integrones de clase 1 caracterizados en detalle y que remarca el papel de Tn21 en la diseminación de estas plataformas. También se analizaron los aspectos específicos relacionados con la diseminación de *bla*_{CTX-M-14} que está asociada esencialmente a la dispersión de plásmidos IncK entre cepas uropatógenas de *E. coli* de los grupos A, D y B1 con una sobrerepresentación de determinados clones. La presencia de distintos alelos de *bla*_{CTX-M-14} localizados en diferentes plataformas genéticas (asociados a ISCR1 o ISEcp1) indicaría la existencia de distintos eventos de movilización y la posible influencia del entorno genético en su diseminación. En el caso de *bla*_{SHV-12} su diseminación está asociada a la dispersión de plásmidos altamente transmisibles del grupo IncI con un alto poder de recombinación como refleja la presencia de cointegrados IncI-IncN. Estos hallazgos, esenciales para explicar la actual epidemiología de las BLEE, han partido de los estudios de vigilancia epidemiológica realizados en los distintos compartimentos, y son necesarios para diseñar medidas para el control de su diseminación. El escenario descrito es altamente complejo, donde las epidemias por clones específicos, la diseminación y mantenimiento de plásmidos y la captura de genes por determinadas plataformas genéticas han contribuido en la evolución y endemia local de microorganismos productores de BLEE.

Type III-secreted effectors: determining their contribution to bacterial virulence and plant resistance using mixed infections

Alberto Pablo Macho Escribano

Directores: **Carmen R. Beuzón López**

y **Javier Ruiz Albert**

Dept. Biología celular, genética y fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

Pseudomonas syringae es una bacteria fitopatógena Gram-negativa ampliamente extendida en la naturaleza, capaz de colonizar una gran variedad de hospedadores. *P. syringae* es responsable de la inducción, en plantas resistentes, de una respuesta localizada de muerte celular programada, que determina el fallo de la infección (HR), así como de la patogénesis en plantas susceptibles. En estos procesos participan diversos factores de virulencia entre los que se incluye el sistema de secreción tipo III (T3SS), consistente en un complejo proteico transmembrana encargado de translocar pequeñas proteínas, llamadas efectores, al interior de la célula vegetal. Estos efectores modulan diversos procesos celu-

lares en beneficio de la bacteria, como la supresión de mecanismos de defensa. El análisis molecular de la contribución de cada factor en el proceso de virulencia, así como de las relaciones funcionales que existen entre ellos, es esencial para comprender la patogénesis de *P. syringae*.

En esta tesis se analiza el papel de los efectores secretados por el sistema de secreción tipo III en *Pseudomonas syringae*. Para ello, se ha puesto a punto un método de análisis de virulencia consistente en el uso de infecciones mixtas para incrementar la sensibilidad y precisión de los mecanismos de virulencia tradicionales. Mediante el uso de este método de análisis, se ha podido detectar cuantitativamente la contribución de un gran número de efectores a la virulencia bacteriana de *Pseudomonas syringae*. También se ha aplicado este método para la identificación de nuevos efectores y, combinado con técnicas de análisis molecular, para la caracterización del efector HopZ1a y de los mecanismos de defensa disparados por dicho efector.

Identificación, caracterización molecular y diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos en patógenos animales y humanos de la familia Pasteurellaceae

Álvaro San Millán Cruz

Director: **Bruno González-Zorn**
Departamento de sanidad Animal,
Facultad de Veterinaria, Universidad
Complutense de Madrid

Los antibióticos son una de las principales herramientas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Desde la introducción de los antibióticos en la práctica clínica, el desarrollo y la progresiva dispersión de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos entre las bacterias han ido en aumento. La adquisición de estos mecanismos por parte de los microorganismos de relevancia clínica es un fenómeno alarmante tanto desde el punto de vista de la sanidad animal como del de la salud pública. En este trabajo se caracterizan los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias de la familia Pasteurellaceae.

En primer lugar, se analizan los mecanismos moleculares de resistencia a β -lactámicos en el patógeno de origen porcino [*Haemophilus parasuis*] describiendo la diseminación clonal de una cepa portadora del nuevo plásmido movilizable de la Superfamilia ColE1, pB1000. Este replicón tiene 4613 pb, codifica la β -lactamasa ROB-1 y es el responsable del fenotipo de resistencia en [*H. parasuis*]. A continuación, se caracteriza la resistencia a antibióticos en aislados de origen porcino de la especie *Pasteurella multocida*. La resistencia a β -lactámicos en *P. multocida* se debe a la presencia de pB1000, o del nuevo plásmido pB1002, idéntico al anterior, pero con la inserción del elemento transponible ISAp1 corriente abajo de *bla*_{ROB-1}. Adicionalmente a la resistencia a β -lactámicos, estas cepas de *P. multocida* presentan resistencia a tetraciclinas y/o estreptomicina.

Los mecanismos de resistencia a estos antibióticos están mediados por los genes *tet(H)*, *tet(B)* y *tet(O)*, en el caso de la resistencia a tetraciclinas, y por *strA*, en el caso de la resistencia a estreptomicina. Todos los genes descritos se encuentran localizados en plásmidos pequeños, y cada cepa porta entre dos y tres de estos replicones. Se ha determinado la secuencia nucleotídica completa de todos los replicones de estas cepas, describiendo en total siete plásmidos, que codifican un máximo de dos determinantes de resistencia cada uno. En la inmensa mayoría de las bacterias, la multiresistencia mediada por plásmidos se debe grandes plásmidos que acumulan numerosos genes de resistencia. En este caso, sin embargo, la multiresistencia se ha obtenido gracias a la convivencia de dos o tres plásmidos pequeños (de entre 4 y 6 kb) en la misma cepa. De este modo, esta es una nueva estrategia evolutiva de adquisición de resistencia múltiple en la familia Pasteurellaceae.

Finalmente, se descubre la presencia del plásmido pB1000 y de su derivado pB1000', en cepas del patógeno humano *Haemophilus influenzae* aisladas de pacientes en distintos hospitales en España. Se ha estudiado la dispersión de pB1000 en España y los mecanismos de transmisión de pB1000 entre patógenos animales y humanos de la familia Pasteurellaceae, comprobado que se puede movilizar por conjugación y transformación hacia *P. multocida* y *H. influenzae*. Aquí proponemos a *P. multocida* como el posible vehículo de transmisión de mecanismos de resistencia a antibióticos, como pB1000, entre los patógenos animales de la familia Pasteurellaceae y *H. influenzae*. Esta hipótesis se sustenta en los datos de nuestro estudio y en el hecho de que *P. multocida* es la única especie de esta familia que coloniza tanto a hombres como a animales.

En conclusión, en este trabajo se caracterizan los mecanismos moleculares de resistencia a los principales antibióticos de relevancia clínica en los patógenos porcinos [*H. parasuis*] y *P. multocida*, descubriendo una nueva estrategia de adquisición de multiresistencia a antibióticos. Además, se analiza la dispersión de estos determinantes de resistencia hacia el patógeno humano de mayor relevancia de la familia Pasteurellaceae, *H. influenzae*.

Study of the production and release of aromas during winemaking carried out by different Saccharomyces species and hybrids

Amparo Gamero Lluna

Directoras: **Amparo Querol Simón,**
Carmela Belloch Trinidad
Instituto de Agroquímica y Tecnología
de los Alimentos (IATA-CSIC).
Universidad Politécnica de Valencia
(UPV)

Aroma is one of the most important attributes involved in wine quality. Current trend in winemaking consists of producing wines with different aroma nuances to offer variety of wines

to a developing market. Several studies have demonstrated that low temperature fermentations favours aroma synthesis and retention. In this background, new wine yeasts able to perform fermentation at low temperatures improving wine aroma while maintaining good fermentation rates are necessary. This doctoral thesis explores the oenological traits of different *Saccharomyces* species and hybrids relevant for present-day wine industry, especially regarding aroma production, as well as the molecular bases underneath. This exploration has been possible using different biochemical, analytical chemistry and molecular techniques to perform enzymatic activity detection, aroma profile determination and transcriptome analysis in wine fermentations. Through this doctoral thesis the abilities of different *Saccharomyces* species and hybrids regarding primary aroma release and secondary aroma production, especially at low temperatures, has been elucidated in order to know the different possibilities that these yeasts offer to create new wines with different aromatic nuances. One of the general conclusions of this doctoral thesis is that production and release of aromas in winemaking depends on the strain carrying out the fermentation process. Nevertheless, sometimes there was a species tendency. On the other hand, the fact that fermentation temperature affects aroma synthesis but not always in the direction to aroma increase has been demonstrated.

Estudio ecológico molecular de enterococos en alimentos

Antonio Jesús Sánchez Valenzuela

Directores: **Antonio Gálvez del Postigo Ruiz,**
Magdalena Martínez Cañamero y Nabil Benomar
Área de Microbiología, Departamento
de Ciencias de la Salud, Facultad de
Ciencias Experimentales,
Universidad de Jaén

En la presente tesis doctoral se ha realizado un estudio ecológico molecular de enterococos en alimentos. En primer lugar se estudiaron los factores de riesgo en enterococos procedentes de alimentos de Marruecos. Los resultados encontrados mostraron que *E. faecalis* presentó mayor resistencia a los antibióticos de interés clínico que *E. faecium*. La incidencia de factores de virulencia también fue mucho mayor en *E. faecalis*, especialmente para los genes que codifican para feromonas sexuales, adhesina del colágeno, antígeno de endocarditis enterocócico y proteína de superficie enterocócica. Los resultados obtenidos sugieren que la calidad sanitaria de los alimentos debería mejorarse para disminuir la incidencia de enterococos.

Se realizó así mismo un estudio sobre resistencia a antibióticos, virulencia y bacteriocinas en enterococos aislados de alimentos de origen animal procedentes de Serbia y Azerbaiyán. Como en el caso anterior, la incidencia de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos fue mucho mayor en *E. faecalis*. Respecto a la produc-

ción de aminos biógenas, *E. faecalis* mostró mayor actividad descarboxilasa para la tirosina, mientras que *E. faecium* mostró una capacidad descarboxilasa más amplia, implicando a la tirosina, ornitina, lisina e histidina. Se detectaron cepas productoras de sustancias antimicrobianas, y mediante PCR se detectaron genes que codifican para las enterocinas A, B, P, L50 y 1071. Los resultados obtenidos aumentan la preocupación por el posible papel de los enterococos como reservorios para la diseminación de resistencia a antibióticos y rasgos de virulencia en alimentos.

Respecto a la valoración de la seguridad y a la producción de bacteriocina de *E. faecium* aislado de pescado y marisco, los resultados mediante ERIC-PCR mostraron que todos los aislados se agrupaban en grupos genómicos bien definidos de acuerdo a su origen. Se observaron actividades antibacterianas frente a *Listeria*, *S. aureus* y otros enterococos. Con este trabajo se demuestra que los enterococos productores de bacteriocina carentes de caracteres inadecuados, podrían ser grandes candidatos para contribuir a la conservación de pescado o mariscos.

En esta tesis doctoral se desarrolló un sistema de clasificación para plásmidos aislados de enterococos y otras Gram-positivas, basándose en las regiones conservadas de los genes de iniciación de la replicación (rep). Se definieron 19 familias de replicones (familias rep). La prevalencia de estas familias fue probada en una colección de enterococos de origen animal y humano. Se detectaron diferencias en la prevalencia de estas familias, siendo rep9 la familia más frecuente encontrada en *E. faecalis* y rep2 la más frecuente en *E. faecium*.

Por último, se ha llevado a cabo una caracterización de los mecanismos de resistencia a glicopéptidos en cepas de origen alimentario, mediante el sistema de familias rep. Todas las cepas de *E. faecalis* contenían plásmidos de la familia rep9 (del tipo pAD1). Dichos plásmidos están involucrados en la transmisión del Tn1546. La cepa *E. faecium* contenía un replicón perteneciente a la familia rep2 (del tipo pRE25), asociada a la presencia del Tn1546. Con este trabajo se demuestra que la presencia de resistencia a glicopéptidos en plásmidos de respuesta a feromonas podría aumentar la transferencia de resistencia entre diferentes nichos ecológicos.

Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya expresión se induce in planta en la interacción *B. cinerea* – tomate

David Benito Pescador

Directores: **Ernesto Pérez Benito y Arturo Pérez Eslava**

Universidad de Salamanca

(Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Biología) y CIALE (Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias)

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno causante de la podredumbre gris y conside-

rado como uno de los principales patógenos responsable del deterioro de frutas y hortalizas, y por tanto, responsable de grandes pérdidas económicas. *B. cinerea* es un hongo necrotrófo que requiere la muerte de las células vegetales para poder alimentarse y desarrollar la infección. Sin embargo, los mecanismos que participan en estos procesos aún no han sido esclarecidos en su totalidad.

En este sentido, se procedió al estudio de expresión génica diferencial durante la interacción *B. cinerea* - tomate para entender los procesos que desencadenan los factores y mecanismos de patogenicidad durante el establecimiento y progreso de esta interacción. Este trabajo pretende continuar el estudio de dos productos génicos, ddB47 y ddB2, cuya expresión es inducida específicamente durante la interacción *B. cinerea* - tomate, lo que hace suponer que están implicados en el proceso de infección.

El fragmento de cDNA ddB47 se hibridaba con dos RNA mensajeros de distinto tamaño molecular que resultaron ser de dos genes distintos; ddB47A, más tarde renombrado *Bcmimp1*, que codifica el RNA mensajero de mayor tamaño y ddB47B, que codifica el RNA mensajero de menor tamaño. El segundo fragmento de cDNA, ddB2, permitió localizar al tercer gen que se describe en este trabajo, *Bde2*, denominado posteriormente *Btct1*.

El gen *Bcmimp1* se expresa durante el crecimiento saprofito, siendo máxima durante la fase de germinación y durante las fases de penetración, expansión de las lesiones dispersivas y de colonización y maceración del tejido de la planta huésped. La proteína que codifica el gen *Bcmimp1* fue determinada por medios bioinformáticos y parece ser una proteína estructural localizada en la membrana interna de la mitocondria. El intento de marcar la proteína con GFP para estudiar su localización celular permitió constatar que la proteína se encuentra localizada en la membrana de la mitocondria y que su extremo carboxi-terminal tiene una función importante. De este modo podemos concluir que la proteína BCMIMP1 sea parte estructural de un complejo proteico anclado en la membrana mitocondrial interna. Los mutantes $\Delta Bcmimp1$ obtenidos no presentan diferencias fenotípicas durante el crecimiento saprofito de *B. cinerea*, pero si muestran un aumento de su capacidad infectiva sobre tomate si se comparan con el tipo silvestre. Es posible argumentar que la proteína BCMIMP1 esté relacionada con el metabolismo mitocondrial y que su eliminación conduce a una desorganización de la membrana mitocondrial que produce un fenotipo más virulento in planta.

El intento de identificación y aislado del gen *Bde47B* fue infructuoso, pero las distintas aproximaciones experimentales condujeron a la detección de genes transcritos en las mismas condiciones experimentales de este trabajo.

El estudio de la proteína BCTC1 permitió identificarla como una ciclina relacionada con transcripción. Todos los mutantes $\Delta Bct1$ presentan un fenotipo letal, por lo que fue imposible la caracterización del gen durante el proceso de infección.

Los resultados obtenidos durante este estudio nos hacen creer que durante la interacción de *B. cinerea* - tomate tanto la actividad mitocondrial como la transcripción de genes están modulando el metabolismo del hongo.

Estudio de la capacidad inmunoestimuladora de *Mycobacterium vaccae* y otros antígenos micobacterianos en el ratón y en el enfermo tuberculoso

Elisabeth Rodríguez Güell

Directoras: **Marina Luquin Fernández y Esther Julián Gómez**
Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona

La tuberculosis (TB) representa uno de los problemas sanitarios más importantes en el mundo ya que, aunque existe un tratamiento, mueren anualmente entre dos y tres millones de personas a causa de esta enfermedad. En algunos casos, el largo período de tratamiento quimioterapéutico de la TB hace que algunos pacientes no lo cumplan correctamente y que aparezcan cepas resistentes a los antimicrobianos tradicionales. Por esta razón, urge encontrar métodos de tratamiento alternativos y, en este sentido, la inmunoterapia merece una consideración particular.

La inmunoterapia asociada a la quimioterapia permite inducir una respuesta inmune favorable para poder combatir el bacilo de la TB y, al mismo tiempo, reducir el período de tratamiento evitando los problemas de incumplimiento. Uno de los agentes inmunomoduladores más estudiados para el tratamiento de la TB es el saprofito *Mycobacterium vaccae*. Durante dos décadas se han realizado diversos estudios clínicos utilizando *M. vaccae* en diferentes partes del mundo y la conclusión principal a la que se ha llegado es que la eficacia varía entre individuos. En estos estudios se han usado soluciones de *M. vaccae* y composiciones derivadas de éste provenientes de dos cepas que presentan diferente morfología colonial, la ATCC 15483T lisa y la NCTC 11659 rugosa. Además, se usaron suspensiones de *M. vaccae* que contienen mezclas complejas de antígenos que pueden tener diferentes efectos en las células del sistema inmune. Por otro lado, los antígenos específicos de *M. tuberculosis* que son capaces de estimular una respuesta inmune protectora todavía permanecen por identificar. Cabe destacar que más del 40% del peso seco del bacilo de la TB está formado por ácidos grasos de cadena larga, glicolípidos y otros compuestos que forman parte de la tan particular pared celular del bacilo de Koch.

La primera parte de este trabajo se ha centrado en dos aspectos. En primer lugar, estudiar si las propiedades inmunomoduladoras de colonias lisas y rugosas de la misma cepa de *M. vaccae* eran las mismas o presentaban diferencias. Así, se estudió la respuesta inmunológica in vitro de esplenocitos de ratones inmunizados con una u otra variante morfológica de *M. vaccae* y de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de enfermos TB y controles sanos. En segundo lugar, saber qué componentes de *M. vaccae* tienen la actividad inmunoestimuladora favorable para combatir la TB, ya que el uso de componentes activos más puros evitaría la presencia de moléculas inmunosupresoras y/o tóxicas, o desde un punto de vista farmacéutico, mejoraría la estandarización de las dosis. Así, se

estudió la respuesta inmunológica desencadenada por diferentes fracciones de *M. vaccae* rugoso en esplenocitos de ratones inmunizados y tuberculosos y en CMSP de enfermos tuberculosos y controles sanos.

En la segunda parte de este trabajo se estudió la respuesta inmunológica frente a los ácidos micólicos purificados de la pared celular de *M. tuberculosis* en linfocitos de enfermos tuberculosos y controles sanos.

Bioconversión microbiana de residuos agroindustriales procedentes de Nicaragua con fines biotecnológicos

Aura Lyli Orozco Solórzano

Directoras: M^a Enriqueta Arias Fernández, M^a Isabel Pérez Leblic, Juana Rodríguez Bullido

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá

Se han utilizado, distintas mezclas de residuos agroindustriales como sustrato de fermentación de cepas de *Streptomyces* seleccionadas, con objeto de conocer su viabilidad tecnológica. Asimismo, mezclas de estos residuos se utilizaron para el cultivo del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, con objeto de evaluar la producción y la calidad de los cuerpos fructíferos obtenidos sobre las mismas. Los residuos fermentados por las cepas de *Streptomyces* seleccionadas y los procedentes del cultivo de *P.ostreatus*, fueron ensayados, como enmiendas orgánicas en suelos degradados

El análisis de la pulpa de café transformada por las distintas cepas mediante la técnica de pirólisis asociada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (Py-GC/MS), puso de manifiesto la acción selectiva de las cepas de *Streptomyces* sobre este residuo, así como la capacidad de las mismas para disminuir su contenido en polifenoles. También se demostró que las cepas de *Streptomyces* fueron capaces de producir un incremento significativo del nitrógeno proteico de la pulpa de café, tras 10 días de incubación en condiciones SSF. La capacidad de las cepas ensayadas para producir enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de hemicelulosas, lignina, almidón y lípidos, sobre pulpa de café, demuestra la idoneidad del residuo para la producción de enzimas de interés biotecnológico.

Para la producción de setas comestibles, se utilizaron distintas mezclas de residuos procedentes de Nicaragua, tales como, pulpa de café y cascarilla de arroz y otros abundantes en nuestro país, como es la paja de trigo, para evaluar el crecimiento y producción de setas en *Pleurotus ostreatus* CBS-411.71 bajo condiciones ambientales y nutricionales controladas. De las mezclas ensayadas, fue en la constituida por pulpa de café y cascarilla de arroz, donde se alcanzó el porcentaje de eficiencia biológica más alto. Las setas obtenidas en las diferentes mezclas de residuos ensayadas presentaron un alto valor nutricional, en cuanto al contenido de proteínas y carbohidratos. Asimismo, la calidad de la proteína contenida en las setas obtenidas, estimada como

la relación entre los aminoácidos totales y la proteína bruta, resultó superior en todos los casos a la correspondiente a la seta comercial utilizada como control. Cabe destacar que los valores más elevados de este parámetro correspondieron a las setas obtenidas en la mezcla constituida por pulpa de café y paja de trigo.

De las mezclas ensayadas como enmiendas orgánicas, fueron las constituidas por los residuos agotados del cultivo de *P. ostreatus*, es decir, las mezclas EII (cascarilla de arroz, pulpa de café y aserrín de pino) y EIII (cascarilla de arroz, pulpa de café, aserrín de pino y soja), las que produjeron los mejores resultados. La adición de las enmiendas orgánicas al suelo, produjo importantes efectos sobre algunas de las propiedades físicas, químicas, microbiológicas y bioquímicas del mismo, así como en el rendimiento del cultivo de *Phaeoelus vulgaris*.

Degradación de discos compactos por un anamorfo de *Bjerkandera adusta*: caracterización bioquímica y molecular de una aril-alcohol oxidasa con nuevas propiedades catalíticas

Elvira Romero Guzmán

Directora: María Jesús Martínez Hernández

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Facultad de Ciencias Biológicas (UCM), Julio 2010

Los hongos son eucariotas heterótrofos que participan en la descomposición de la materia orgánica en los ecosistemas terrestres mediante oxidoreductasas e hidrolasas extracelulares. Estas enzimas confieren a las especies fúngicas una gran versatilidad para utilizar diferentes fuentes de energía y esto explica que estos organismos sean capaces de desarrollarse en sitios, a priori inverosímiles, como los discos compactos (CD).

Este estudio comenzó tras el hallazgo en Belice de un CD biodeteriorado y el aislamiento de una especie fúngica que se desarrollaba entre las diferentes capas de este CD. En primer lugar, se identificó el hongo aislado como un anamorfo de *Bjerkandera adusta*, en base a su morfología, la secuencia de su región ITS y su patrón de enzimas extracelulares. Tras comprobar que este hongo degradaba *in vitro* los principales componentes de los CD (policarbonato, metales y colorantes), se analizaron las actividades enzimáticas que el hongo secretaba en presencia de fragmentos de CD y podrían estar implicadas en los procesos de degradación (esterasas y oxidoreductasas) y el estudio se orientó hacia la caracterización de las oxidoreductasas, por ser enzimas implicadas en la degradación de compuestos aromáticos recalcitrantes.

Una de las oxidoreductasas, detectada en los cultivos del anamorfo de *B. adusta*, se ha caracterizado detalladamente. Esta flavoenzima es una oxidasa que comparte propiedades catalíticas con la aril-alcohol oxidasa (AAO), ampliamente estudiada en *Pleurotus eryngii*, y también

con la vainillil-alcohol oxidasa de *Penicillium simplicissimum*. Diversos estudios fisicoquímicos y cinéticos de la nueva oxidasa, así como su secuencia aminoacídica y su modelo molecular, indican que esta enzima es una nueva AAO en la familia glucosa-metanol-colina de oxidoreductasas con una especificidad de sustrato excepcional. Por otra parte, la purificación y caracterización bioquímica de las peroxidasas, que se inducen en el anamorfo de *B. adusta* en presencia de Mn²⁺, reveló que estas hemoproteínas se incluyen en el grupo de las manganosas peroxidasas (MnP), que requieren Mn²⁺ para completar su ciclo catalítico. Finalmente, cabe destacar que este estudio describe por primera vez la purificación y caracterización de MnP en una cepa del género *Bjerkandera*.

Efecto de la adición de dos probióticos (*Shewanella putrefaciens* y *S. baltica*) en el engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)

Inés García de la Banda García

Directores: Antonio J. Laborda Navia (Universidad de León), Salvador Arijo Andrade (Universidad de Málaga)

Instituto Español de Oceanografía (Santander). Universidad de León

En la actualidad las patologías representan el factor más limitante en el engorde del lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Los sistemas de producción intensiva suponen un estrés para los ejemplares, ocasionando una menor eficiencia digestiva, una mayor susceptibilidad frente a patógenos y pérdidas económicas para la industria. La utilización de probióticos en la dieta es ya una herramienta eficaz para la mejora del metabolismo y prevención de patologías en acuicultura. El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la adición en dieta de dos cepas probióticas del género *Shewanella* (Pdp11 y Pdp13), sobre el engorde de *S. senegalensis*.

La adición de los probióticos Pdp11 y Pdp13 en la dieta produjo una modulación de la microbiota intestinal de los juveniles de *S. senegalensis*, no necesariamente asociada a la colonización de las cepas en el intestino. Este efecto fue más intenso en los ejemplares alimentados con Pdp13, que sin embargo presentaron una menor riqueza específica. Así mismo la modulación fue mayor cuando Pdp11 se administró liofilizado en lugar de fresco. La incorporación de ambas cepas en la dieta protegió a los peces frente a infecciones con el patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. La protección disminuyó en relación inversa a la calidad del pienso utilizado, manifestándose ya a los 15 días del inicio de la administración probiótica. Sin embargo, la adición del probiótico no pareció afectar especialmente a la respuesta inmunitaria estudiada, detectándose únicamente un aumento significativo de actividad antiproteasa en los ejemplares alimentados con Pdp13 fresca.

A pesar de que las cepas Pdp11 y Pdp13 están muy próximas taxonómicamente, presentan diferencias en sus actividades metabólicas, en el nivel de lípidos totales y perfil de ácidos grasos, así como en las actividades de inhibición "in vitro" de los patógenos *P. damsela* subsp. *piscicida* y *Vibrio harveyi*. Además Pdp11 y Pdp13 promovieron diferencias en el crecimiento, la composición corporal, la histología de digestivo e hígado, la modulación de la microbiota digestiva y la respuesta inmunitaria en juveniles de *S. senegalensis* en el engorde.

La implementación de Pdp11 en una dieta comercial de alto contenido lipídico promovió una mejor condición del digestivo e hígado en ejemplares de *S. senegalensis*. Asimismo su adición mejoró los niveles de metabolitos en el plasma, hígado y músculo de los peces, siendo mayor la intensidad cuando Pdp11 fue administrado en fresco. Destaca el mayor nivel de glucógeno detectado en el hígado de los ejemplares, relacionado con una mayor reserva energética, lo que mejoraría la respuesta frente a un posible estrés.

El hecho de que el probiótico liofilizado, a pesar de su casi nula viabilidad, tenga un efecto sobre el pez, denota que éste no necesariamente se corresponde con un proceso de colonización del intestino. Parece más bien condicionado por enzimas o nutrientes que complementan la dieta del pez, sustancias inmunoestimulantes que actúan localmente o bien la presencia de sustancias antimicrobianas.

Se necesitan futuros trabajos para comprender el mecanismo de relación entre Pdp11 y su huésped, lo que ayudará a determinar los factores específicos relacionados con las mejoras observadas.

Food-borne pathogen Campylobacter. Rapid detection methods for virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni*, and study of pathogenicity- associated factors in *Arcobacter* spp.

Irati Martínez Malax-etxebarria

Directores: **Aurora Fernández
Astorga y Rodrigo Alonso Monsalve**
Facultad de Farmacia de la UPV-EHU.

Dpto. Inmunología, Microbiología y
parasitología

The term "campylobacter" has been used to refer to the genera *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter*, *Lawsonia* and *Anaerobiospirillum*.

The genus *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Sulfospirillum* constitute the family *Campylobacteraceae*, which along with the families *Helicobacteraceae*, *Nautilaceae* and *Hydrogenimonaceae* constitutes the order *Campylobacteriales* within *Epsilonproteobacteria*

Whereas *Campylobacter jejuni* has emerged as the most common bacterial cause of food-borne disease in many industrialized countries, *Arcobacter* spp. are not currently considered microorganisms of major public health concern.

Nevertheless, arcobacters are classified as emerging pathogens (ICMSF, 2002). The genera *Campylobacter* and *Arcobacter* share morphologic features, but can be distinguished from each other by their lower optimal growth temperatures (30-42°C for campylobacters and 25-30°C for arcobacters) and by their aero tolerance.

In spite of the well known importance of *C. jejuni* as human pathogen, knowledge on *Campylobacter* pathogenicity-associated bacterial factors and on their role in mediating disease, remains limited. The pathogenic mechanisms and/or potential virulence factors of *Arcobacter* spp. are still more limited. Therefore, the aims of this PhD dissertation were (i) to study the prevalence of virulence-associated genes among *C. jejuni* strains obtained from different sources, (ii) to determine the antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* spp. from the North of Spain, and (iii) to elucidate whether ECF sigma factors pay any role in the pathogenicity of *A. butzleri*.

Análisis de la función de SlrP, un efector de los sistemas de secreción de tipo III de *Salmonella enterica*, en la interacción con la célula hospedadora

Joaquín Bernal Bayard

Director: **Francisco Ramos Morales**
Departamento de Genética. Facultad
de Biología. Universidad de Sevilla

Salmonella enterica en una especie de bacterias patógenas que pueden producir gastroenteritis o enfermedades sistémicas. *Salmonella* posee dos sistemas de secreción de tipo III (SST3) relacionados con la virulencia, que son elementos claves en la interacción con la célula hospedadora. Estos sistemas median la translocación de proteínas efectoras al citosol de la célula hospedadora donde pueden alterar las rutas de señalización y manipular las funciones celulares. Sin embargo, se desconoce el papel específico de muchos de estos efectores. SlrP es un efector de *S. enterica* que puede ser translocado por los dos SST3 de esta bacteria y del que no se conocía su función en el momento de iniciar este estudio. Por tanto, nos planteamos como objetivo realizar un análisis funcional de SlrP en la interacción con la célula hospedadora.

A través de un escrutinio genético se identificaron dos proteínas humanas que interactuaban con SlrP: la tioredoxina citosólica (Trx) y ERdj3. La primera es una proteína que protege a la célula del daño oxidativo, mientras que la segunda es una chaperona localizada en el retículo endoplásmico. Ambas interacciones se confirmaron por diversos métodos independientes.

Experimentos *in vitro*, demostraron que SlrP tenía actividad ligasa de ubiquitina y era capaz de usar Trx como sustrato. En cultivos celulares que expresaban SlrP de forma constitutiva se observó un descenso en la actividad reductora de Trx y un aumento en la muerte celular. Ambos efectos se observaron también en cultivos de células epiteliales humanas infectadas con *Salmonella*.

Por otro lado, se demostró que el dominio II de ERdj3 era imprescindible para la interacción con SlrP y que la presencia de SlrP impedía la unión de la chaperona a un sustrato desnaturalizado. Además, mediante microscopía confocal y fraccionamiento celular, se demostró que SlrP se localiza parcialmente en el retículo endoplásmico de células HeLa transfectadas.

Todos estos datos sugieren que SlrP podría favorecer la muerte de la célula hospedadora a través de la modulación de la función de dos proteínas dianas, de forma independiente: Trx en el citosol y ERdj3 en el retículo endoplásmico.

La última parte de la Tesis consistió en un análisis estructural, mediante cristalografía de rayos X de SlrP en complejo con Trx. Se obtuvieron cristales del complejo que difractaron a 3,5 Å de resolución con objeto de resolver la estructura del complejo. El análisis se basó, parcialmente, en las estructuras conocidas de efectores de la misma familia de SlrP y de la Trx humana.

Genómica funcional de la interacción *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* - Olivo

Isabel M. Matas Casado

Director: **Cayo Ramos Rodríguez**
Instituto de Hortofruticultura
Subtropical y Mediterránea (IHSM),
Área de Genética, Facultad de
Ciencias, Universidad de Málaga

Los procesos moleculares responsables de la interacción entre la bacteria causante de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), y su planta huésped, *Olea europaea* L., son prácticamente desconocidos. En este trabajo se planteó como objetivo principal la identificación de genes implicados en la virulencia y supervivencia de Psv en olivo.

El análisis bioinformático de la secuencia del genoma de la cepa de referencia Psv NCPPB 3335 reveló una elevada conservación con los genomas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A y *P. syringae* pv. *tabaci* 11528. El análisis comparativo de la secuencia del genoma de Psv con el de los siete genomas secuenciados del complejo *P. syringae* ha permitido caracterizar tanto los factores de virulencia conservados, como aquellos presentes únicamente en algunos patovares. Psv NCPPB 3335 contiene doce regiones genómicas variables que están ausentes en las cepas del complejo *P. syringae* secuenciadas, así como 71 genes específicos de esta cepa. La búsqueda bioinformática de efectores del sistema de secreción tipo III (T3Es) en Psv reveló la existencia de 34 genes candidatos a T3Es. Con el fin de determinar la validez de la predicción bioinformática llevada a cabo, se seleccionaron 6 T3Es candidatos a los que se probó su translocación a través del sistema de secreción tipo III (T3SS). Los resultados obtenidos indican que 5 de estos 6 T3Es se translocan a través del T3SS de este patógeno. De entre ellos, PsvA-1, PsvA-2 y HP-1017 se revelan como nuevos T3Es dentro de complejo *P. syringae*.

En este trabajo se ha utilizado una estrategia *Signature Tagged Mutagenesis* (STM) para la iden-

tificación de genes de Psv necesarios para su multiplicación e invasión del hospedador. Se construyó una colección de 4778 mutantes etiquetados STM de la cepa de referencia Psv NCPPB 3335. El análisis en masa de los mutantes se realizó en plantas de olivo cultivadas *in vitro*. Se han seleccionado 73 mutantes cuyas etiquetas no fueron detectadas mediante hibridación *Southern* y cuya competitividad se encuentra significativamente reducida únicamente *in planta*. La identificación del punto de inserción del transposón ha revelado la identidad del gen interrumpido en todos estos mutantes. Tras determinar el papel en virulencia de la mayoría de los genes identificados realizando inoculaciones individuales en plantas de olivo leñosas, se analizó la estructura tumoral y la localización de células bacterianas, marcadas con GFP, en tumores de olivo *in vitro*. De este trabajo se concluyó que la multiplicación y persistencia de Psv en los tejidos de olivo es dependiente de la biosíntesis de al menos 9 de los 20 aminoácidos comunes que constituyen las proteínas, así como de la biosíntesis de 3 vitaminas, y de 3 genes posiblemente implicados en el transporte de citrato, glutamato y sulfato. Además, la virulencia de Psv en olivo es dependiente, entre otros factores, de la biosíntesis de ácido indol-3-acético, de la integridad de los sistemas de secreción tipo II, III y IV, así como de la de genes posiblemente implicados en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, en la fluidez de membrana y en la biosíntesis de peptidoglicano y exopolisacáridos.

Caracterización y desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de bacterias asociadas a episodios de mortalidad en peces planos

Jose R. López Fernández

Directores: **Roberto de la Herrán Moreno (Universidad de Granada), Salvador Arijó Andrade (Universidad de Málaga), José I. Navas Triano (IFAPA Centro Agua del Pino)**

IFAPA Centro Agua del Pino, Universidad de Granada (Dpto. de Genética), Universidad de Málaga (Dpto. de Microbiología), Universidad de Granada

La acuicultura es una industria emergente que, habiendo experimentado un gran crecimiento en los últimos años, presenta retos para su desarrollo como la introducción de nuevas especies de cultivo y el control de una de las principales causas de pérdidas económicas, las enfermedades de origen bacteriano. Este trabajo se centró en el estudio de los episodios de mortalidad ocurridos en distintas fases del cultivo de tres especies de peces planos de alto valor comercial y potenciales candidatos para la diversificación de la acuicultura marina en España, la acedia (*Dicologlossa cuneata*), el lenguado

senegalés (*Solea senegalensis*) y el rombo (*Scophthalmus rhombus*). Los objetivos perseguidos fueron la identificación de las especies bacterianas implicadas en dicha mortalidad, la evaluación de su grado de virulencia y el desarrollo de métodos basados en la PCR que permitiesen su rápida identificación. Los cultivos de acedia y lenguado senegalés presentaron un alto número de episodios de mortalidad, constituyendo las patologías un serio factor limitante para el cultivo. Por el contrario, en rombo los episodios de mortalidades significativas fueron escasos. Los aislados obtenidos a partir de estos brotes abarcaron ocho géneros distintos, siendo *Vibrio* el dominante tanto en número como en diversidad. En total se detectaron cinco especies patógenas, cuatro de las cuales fueron identificadas como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi*, mientras que la quinta constituye una nueva especie de *Pseudomonas*, para la que se ha propuesto el nombre de *Pseudomonas baetica* sp. nov. La detección de estas especies patógenas permitió explicar la mayor parte de los brotes estudiados, excepto los ocurridos en larvas. El grado de virulencia observado fue mayor en las tres primeras especies mencionadas, mientras que las más prevalentes fueron *T. soleae* y *V. harveyi*, apareciendo en un mayor número de brotes y de especies hospedadoras. Por último, se desarrolló un método de diagnóstico de *T. soleae* mediante PCR con cebadores específicos, y un método que permite la identificación simultánea de *P. damsela*, *P. baetica*, *T. maritimum*, *T. soleae* y *V. harveyi* a partir de cultivos puros, mediante hibridación RLB con sondas de ADN específicas.

Ptc1, una serín/treonín fosfatasa que regula la señalización mediada por MAPKs y procesos morfogénicos en *Saccharomyces cerevisiae*, a través de su proteína adaptadora Nbp2.

Lorena Palacios Domingo

Directores: **Humberto Martín Brieua y María Molina Martín**
Departamento de Microbiología II.
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo que sirve como modelo de células eucarióticas para el estudio de múltiples aspectos de la fisiología celular, como son el ciclo celular, el crecimiento polarizado y la utilización de rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs para responder a estímulos externos. En estas rutas existen reguladores negativos, entre los que se encuentran las serín/treonín fosfatasas PP2C, gracias a los cuáles se modula la duración e intensidad de la señal transmitida. Ptc1 es una de las proteínas fosfatasas del tipo PP2C, que desempeña el papel de regulador negativo de la ruta

de MAPK mediada por Hog1, actuando Nbp2 como proteína adaptadora de Ptc1 en dicha vía de señalización.

En este trabajo hemos observado que la falta de Ptc1 o de Nbp2 provoca un fenotipo característico de alteración en la pared celular, y un aumento en la fosforilación de la MAPK Slt2 y del factor de transcripción Rlm1, tanto en condiciones basales como tras estimulación de la ruta CWI. Asimismo, la sobreexpresión de PTC1 reduce la cantidad de Slt2 fosforilado, lo que sugiere que esta fosfatasa se comporta como un regulador negativo de la ruta CWI. Ensayos de copurificación y de dos híbridos demuestran que el complejo Ptc1-Nbp2 interacciona con Bck1, la MAPKKK de la ruta CWI, a través del dominio SH₃ de Nbp2 y una región rica en prolinas de Bck1, preferentemente la que incluye las prolinas 809 y 812. Los ensayos de epistasis genética realizados indican que el sustrato de Ptc1 en esta ruta de señalización se sitúa por encima de la MAPK Slt2, siendo por tanto una de las pocas proteínas fosfatasas de levaduras que regula la señalización sobre un componente distinto de la MAPK.

Esta fosfatasa presenta también otras funciones celulares, relacionadas con procesos morfogénicos. Mutantes *ptc1Δ* o *nbp2Δ* muestran un fenotipo de células multigemadas cuando crecen a 37°C. Cada una de las yemas unidas a la misma célula presenta un solo núcleo, además del anillo de septinas en el cuello de gemación. Estos fenotipos son indicativos de un defecto en la separación celular que podría ser debido a un defecto en el desensamblaje de dicho anillo. Mediante un rastreo por el sistema de dos híbridos hemos observado que Ptc1 interacciona con Kcc4, una proteína quinasa que interacciona con el anillo de septinas y que tiene función redundante con Gin4 y Hsl1 como reguladores negativos de Swe1 en el checkpoint morfogénico. Además, PTC1 muestra interacción epistática con genes relacionados con estos procesos morfogénicos como *GIN4*, *HSL1*, *KCC4* o *SWE1*. Todo ello indica que esta fosfatasa, a través de Nbp2, participa en la regulación de la morfogénesis en esta levadura.

Análisis genético y bioquímico del catabolismo del colesterol en *Mycobacterium smegmatis* mc²155

Iria Uhía Castro

Directores: **José Luis García López y Beatriz Galán Sicilia**
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

El trabajo realizado en esta Tesis se ha centrado en el estudio de la ruta aeróbica de degradación del colesterol en la bacteria *Mycobacterium smegmatis* mc²155. Con el fin de identificar los genes responsables del catabolismo de este esteroide, se analizó primeramente el genoma de esta cepa mediante análisis *in silico*, utilizando para ello como sondas genes de otros microor-

ganismos que están implicados en la degradación de esteroides. Los resultados indicaron que en el genoma de *M. smegmatis* mc²155 aparecían genes ortólogos a la mayoría de las sondas utilizadas. Posteriormente mediante la técnica de retrotranscripción-PCR se confirmó la expresión diferencial de esos genes cuando la bacteria se cultiva en un medio con colesterol como fuente de carbono y energía. Seguidamente se procedió al estudio global de la expresión génica diferencial en colesterol de *M. smegmatis* mc²155 mediante *microarrays*. Los datos obtenidos han servido para delimitar las zonas del genoma de *M. smegmatis* mc²155 implicadas en el metabolismo de colesterol y para localizar nuevos genes desconocidos hasta la fecha posiblemente implicados en esta ruta. Varios de ellos fueron inactivados mediante mutagénesis insercional y se comprobó que su ausencia afectaba al crecimiento de esta cepa en colesterol. Tal es el caso por ejemplo del gen *MSMEG_5995*, que codifica un citocromo P450 que se cree que puede estar implicado en el primer paso de la degradación de la cadena lateral del colesterol, o del gen *MSMEG_1366*, que codifica una ATPasa implicada en el transporte de esteroides al interior celular. Por otra parte, se ha llevado a cabo la búsqueda de la enzima encargada de catalizar el primer paso de esta ruta de degradación, que es el paso de colesterol a 4-colesten-3-ona. Tras identificar 3 genes que podrían codificar este tipo de enzimas (*MSMEG_1604*, *MSMEG_5228* y *MSMEG_5233*) se procedió a su análisis mediante distintas técnicas, como retrotranscripción-PCR cuantitativa y ensayos enzimáticos de transformación de colesterol mediante cromatografía en capa fina y cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS). Se comprobó que los genes *MSMEG_5228* y *MSMEG_5233* se expresaban diferencialmente en colesterol, pero no así *MSMEG_1604*. Además se confirmó que las proteínas codificadas por los genes *MSMEG_5228* y *MSMEG_5233* catalizan la transformación del colesterol en 4-colesten-3-ona. Sin embargo, la inactivación de estos genes mediante mutagénesis insercional no afectó a la capacidad de utilización de colesterol de *M. smegmatis* mc²155, lo que sugiere que muy probablemente existen más proteínas en esta bacteria capaces de catalizar este paso enzimático. Por último también se realizaron estudios con los dos reguladores de la ruta de degradación del colesterol identificados en *M. smegmatis* mc²155, los represores de la familia TetR llamados KstR y KstR2. Dado que el gen *MSMEG_5228* tiene una secuencia en su región promotora (*P*₅₂₂₈) que coincide con el motivo de unión de KstR, y que un mutante en este represor expresa constitutivamente la proteína codificada por el gen *MSMEG_5228*, nos propusimos estudiar la unión de KstR al promotor *P*₅₂₂₈. Para ello se hicieron ensayos de retardo en gel y se comprobó que efectivamente KstR se unía de forma específica y dependiente de concentración a una sonda que contenía el promotor *P*₅₂₂₈ (*P*₅₂₂₈). Por otra parte se llevó a cabo un ensayo de protección de la sonda *P*₅₂₂₈ a la digestión con DNasaI. El resultado reveló que KstR protege una región que contiene el motivo de unión consenso previamente postulado como el operador de este regulador. Finalmente, se llevaron a cabo análisis mediante *microarrays* de un mutante de *M. smegmatis* mc²155 en el regulador KstR2, y se comprobó que esta proteína reprime la expresión de 15 genes relacionados con el catabolismo del colesterol.

Fungi and mycotoxins in Capsicum powder: occurrence, ecophysiology and control

Liliana Tavares dos Santos

Directores: Antonio J. Ramos

y Sonia Marín

Dpto. de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico, que suelen contaminar los alimentos y productos agrícolas. Su estudio en productos alimentarios es complejo, ya que no siempre se utilizan las mejores técnicas de muestreo, y todavía no se conocen todos los mohos micotoxigénicos ni las micotoxinas que producen.

La presencia simultánea de diferentes micotoxinas es un factor clave para la comprensión de la interacción y del sinergismo que se puede dar entre diferentes micotoxinas. Hasta la fecha, solamente han sido efectuados algunos estudios sobre la coexistencia de micotoxinas en alimentos. El principal objetivo de esta tesis ha sido profundizar en el conocimiento de la contaminación por micotoxinas del pimentón, prestando una particular atención a la coexistencia de los principales mohos productores de micotoxinas, así como a las micotoxinas más importantes. Con este fin, para la identificación de los mohos se han aplicado métodos tradicionales combinados con técnicas de biología molecular, y para la detección de las micotoxinas se han empleado métodos cromatográficos, habiendo recurrido a la micología predictiva para estudiar las estrategias de control de las micotoxinas.

Un número representativo de muestras de pimentón, recogidas conforme a la legislación europea para venta a granel o al por menor, han sido analizadas para determinar la carga fúngica y la contaminación por micotoxinas. Se ha detectado la presencia de levaduras en todas las muestras, mientras que no siempre se ha detectado la presencia de hongos filamentosos. Los géneros más frecuentemente aislados han sido *Aspergillus* y *Eurotium*. Se ha encontrado la presencia de mohos potencialmente micotoxigénicos, principalmente pertenecientes al género *Aspergillus* (secciones Flavi, Circumdati y Nigri), habiéndose encontrado también algunos aislados del género *Fusarium*.

En relación a la presencia de micotoxinas, se han analizado aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol, toxinas T-2 y HT-2. Se ha observado la coexistencia de más de una micotoxina en una misma muestra, siendo la ocratoxina A la micotoxina más frecuente.

Las estrategias analizadas para el control de las micotoxinas han permitido confirmar que tanto el crecimiento como la producción de micotoxinas por *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. tubingenis* y *A. westerdijkiae* pueden ser controlados si se mantiene baja la temperatura de almacenamiento ($T < 15^\circ\text{C}$). Además, el uso simultáneo de los controles físicos y químicos puede contribuir a una mejora en el control de la producción de micotoxinas.

El uso de una mezcla natural de carotenoides procedentes de pimentón (denominada capsan-

tal) ha tenido un efecto no concluyente sobre la producción de aflatoxinas y ocratoxina A. Sin embargo, el capsantal ha sido capaz de reducir las tasas de crecimiento de *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. tubingenis* y *A. westerdijkiae* a 25°C .

A través de esta investigación, ha sido posible observar que algunos fungicidas, como el mancozeb, son capaces de controlar simultáneamente el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas en *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. tubingenis* y *A. westerdijkiae*. De esta forma, el uso de fungicidas podría constituir una estrategia primordial en el control de micotoxinas en productos alimentarios.

Modulación de la microbiota intestinal por bifidobacterias productoras de exopolisacáridos y caracterización preliminar de sus polímeros

Nuria Salazar Garzo

Directoras: Clara González de los Reyes-Gavilán y Patricia Ruas Madiedo

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Departamento de Microbiología y Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de carbohidratos exocelulares presentes en la superficie de muchas bacterias, incluyendo bacterias del ácido láctico (BAL) y bifidobacterias. La incorporación de cepas productoras de EPS a algunos alimentos, especialmente productos lácteos, proporciona viscosidad, estabilidad y una mayor capacidad de retención de agua a los mismos, lo que mejora su textura. Además, a los EPS se les han atribuido varios efectos beneficiosos para la salud.

Se realizó una búsqueda de cepas con posible fenotipo productor de EPS entre aislados de bifidobacterias y lactobacilos intestinales de origen humano. De las 362 analizadas, se encontraron 60 de naturaleza mucoide o "ropy" de las cuales se seleccionaron 11 cepas de *Bifidobacterium* y 10 cepas de *Lactobacillus*. Se estudió la aptitud tecnológica de las cepas productoras de EPS en leches fermentadas determinando su capacidad de crecimiento en leche, así como las propiedades sensoriales del producto fermentado. Además, se realizó una caracterización físico-química de los polímeros producidos por estas 21 cepas de origen intestinal humano.

Se evaluó la capacidad de utilizar EPS producidos por bifidobacterias como substratos fermentables por la microbiota intestinal. Para ello se realizaron cultivos *in vitro* de heces de individuos adultos sanos a pH no controlado y a pH controlado, simulando en este último caso las condiciones del colon distal humano. Finalmente, se determinó la influencia de 2 cepas productoras de EPS en la dinámica poblacional intestinal de ratas Wistar.

Todas las cepas productoras de EPS presentaron características tecnológicas adecuadas para su inclusión en productos lácteos ya que son capaces de crecer y/o acidificar la leche sin alterar sus propiedades sensoriales.

El análisis de la actividad metabólica de la microbiota intestinal mediante la determinación por GC de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y por HPLC de ácidos orgánicos, así como la aplicación de diversas técnicas dependientes e independientes de cultivo (qPCR, PCR-DGGE y FISH) al estudio de las poblaciones microbianas, mostraron que los EPS producidos por bifidobacterias son fermentados por la microbiota intestinal. Tanto la adición de EPS a los modelos estudiados como la ingesta de cepas de *Bifidobacterium* productoras de estos polímeros causaron cambios en el perfil de AGCC considerados *a priori* como beneficiosos. Se evidenciaron también cambios importantes en diferentes grupos microbianos que están en concordancia con los cambios detectados en la actividad metabólica de la microbiota intestinal.

Intercepción de señales de comunicación bacteriana tipo N-acilhomoserín lactonas (AHLs) en bacterias aisladas del medio marino

Manuel Romero Bernárdez

Directora: **Ana María Otero Casal**
Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela

Muchas especies bacterianas responden a los cambios del medio mediante un sistema de comunicación basado en la producción y liberación de pequeñas moléculas señal denominadas “autoinductores” que controlan la expresión de diferentes genes, incluidos factores de virulencia. Este mecanismo es conocido como “Quorum Sensing” (QS). La principal familia de autoinductores descrita es la de las N-Acilhomoserín lactonas (AHLs) basadas en un anillo lactona al que se une por un enlace amida un ácido graso a modo de cadena lateral, empleadas por bacterias Gramnegativas. Debido a la importancia de los procesos de QS los competidores han desarrollado sistemas, conocidos como “Quorum Quenching” (QQ), para desarmar estos mecanismos. El QQ se ha convertido de esta forma en una interesante alternativa a los problemas de resistencia a antibióticos en salud humana y en la acuicultura. Con el objetivo de estudiar la frecuencia de cepas bacterianas con actividad QQ sobre AHLs en el medio marino y obtener aislados con posibles aplicaciones biotecnológicas, se procedió al aislamiento de bacterias procedentes de: sedimento de tanque de cultivo de peces, biopelícula de tanque reservorio de agua de mar filtrada, el alga *Fucus vesiculosus* en la zona intermareal, muestra agua de mar de estuario y de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad.

Los resultados de aislamiento de bacterias marinas de este trabajo indicaron que el QQ es una actividad de elevada prevalencia en el medio marino entre las bacterias cultivables, como demuestra la elevada frecuencia de aislados con

capacidad de degradación enzimática de señales de quorum sensing (QS) tipo AHL, obtenidos tanto de comunidades bacterianas costeras como de muestras de agua de mar. De un total de 630 bacterias aisladas, 109 presentaban actividad enzimática degradadora al menos sobre una de las AHLs probadas, lo que representa un 17,3% del total de los aislados analizados, porcentaje casi un orden de magnitud más elevado que el descrito para aislados de suelo. El origen de la muestra afectó fuertemente a la actividad, siendo mayor en el alga *Fucus vesiculosus* (39,4% de especies activas) y en muestras de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad (27,7 y 21,7% respectivamente).

Se han identificado 19 aislados capaces de degradar un amplio espectro de AHLs, en su mayoría pertenecientes a géneros estrictamente marinos. Los aislados con actividad QQ de amplio pertenecieron a 13 géneros encuadrados en los phyla α -; γ -*Proteobacteria* (7, incluyendo una nueva especie próxima a *Phaeobacter*); *Actinobacteria* (1); *Firmicutes* (2) y *Bacteroidetes* (3).

Existe una fuerte discrepancia entre el número de aislados con actividad QQ en aguas marinas y la frecuencia de las secuencias homólogas a enzimas de QQ conocidos en metagenomas del medio marino. Esta discrepancia puede ser atribuida a la baja homología existente entre secuencias de enzimas de QQ o a la existencia de actividades enzimáticas todavía no descritas.

La caracterización de la actividad QQ del aislado 20J, identificado como *Tenacibaculum discolor* (99% ID), revela que esta cepa presenta dos tipos de actividad de tipo enzimático, siendo una de ellas una lactonasa que se secreta al medio de cultivo. Esta actividad QQ de amplio espectro sobre AHLs está conservada en las especies del género *Tenacibaculum*, con la excepción de *T. maritimum* NCIMB 2154^T que únicamente degrada AHLs largas. Miembros del género *Tenacibaculum*, pertenecientes al phylum *Bacteroidetes*, producen C4-HSL. Esta AHL podría controlar el modo de crecimiento en biopelícula de *T. maritimum* NCIMB 2154^T y puede ser detectada *in vivo* en el patógeno *T. discolor* DSM 18842.

Caracterización de las hidrolasas producidas por la bacteria halófila extrema *Salicola marasensis*

M^a de Lourdes Moreno Amador

Directoras: **Encarnación Mellado Durán** y **M^a Teresa García Gutiérrez**
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

Solar marine salterns constitute excellent models for studying the ecology of hypersaline environments where molar concentrations of salts are present. Extremely halophilic microorganisms, able to grow optimally in media containing 15-30% (w/v) NaCl, are evolved two different strategies for the osmoadaptation to saline habitats: “salt-in” (accumulation of inorganic cations) and “salt-out” (synthesis and/or accumulation of compatible solutes). Extreme halophiles have potential biotechnological appli-

cations including the production of compatible solutes, enzymes, β -carotene and the degradation of toxic chemicals or enhanced oil recovery. To our knowledge, no proteases and lipases from extremely halophilic bacteria have been characterized. Therefore, the detection, isolation and characterization of hydrolytic enzymes produced by extreme halophiles with optimal activity over a wide range of salt concentrations, constitute an interesting research topic.

In this study we explored the presence of extremely halophilic Bacteria or Archaea producing hydrolytic enzymes (lipases, proteases, amylases and DNAses) in marine salterns of Huelva (South Spain). Based on its ability to produce proteolytic and lipolytic activity we selected and characterized the extremely halophilic bacterium *Salicola marasensis* IC10. Moreover, we determined the osmoadaptation mechanism of *S. marasensis* IC10 to balance the osmotic stress.

For the achievement of these objectives, a screening program was performed in marine salterns of Huelva using saline media containing 20% (w/v) NaCl and the specific substrates for the hydrolytic enzymes. Under the restrictive conditions used, a total of 150 fresh cultures showing hydrolytic activities were isolated and from them, only 82 strains presented the typical growth salt requirement profile exhibited by the extreme halophiles. 43 strains were selected and characterized. Most hydrolase producers isolated were assigned to the family *Halobacteriaceae*, comprising species of the genera *Halorubrum*, *Haloarcula* and *Halobacterium*. Three strains were not phylogenetically assigned to the family *Halobacteriaceae* and were closely related to *Salicola marasensis*, *Pseudomonas halophila* and *Salinibacter ruber*. The most frequent hydrolytic activity detected was amylase (70%), followed by protease (17%) and lipase (13%). The majority of the amylase producers formed a clear branch with high affinity to the genus *Halorubrum*, the protease producers were closely related to the genus *Halobacterium* and the lipolytic producers had the major genera diversity.

The strain IC10 showing proteolytic and lipolytic activity was selected for further studies. According to phylogenetic, phenotypic and genotypic data, this strain was assigned as *S. marasensis* IC10 and the optimum conditions for growth were 15% NaCl, pH 8.0 and 40°C. Lipolytic activity was detected in the intracellular fraction corresponding to cytoplasmic proteins and the activity was stable in the temperature range from 37°C to 45°C, in presence of organic solvents such as 1-butanol, 2-butanol and acetone as well as the chelator EDTA and the salts of Ni²⁺, Ca²⁺ and Zn²⁺. The lipolytic fraction showed a high tolerance to saline conditions, up to even 4 M NaCl with an optimum at 1 M NaCl. The proteolytic activity was also detected in the intracellular fraction, showing optimal activity with egg albumin and gelatine as substrates. The gene coding the protease Salipro, designated *protS*, has been cloned by inverse PCR and encodes an 817 residues protein, showing high sequence similarity to serine proteases of the Lon family.

The osmoadaptation mechanism to balance the osmotic stress of *S. marasensis* IC10 consists on the accumulation of betaine as the sole compatible solute. The accumulation of betaine is not affected by the salinity of the culture medium and this bacterium is able to synthesize betaine *de novo*.

Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora en administración oral

María Luján Jiménez Pranteda

Directores: **Mercedes Monteoliva Sánchez, Alberto Ramos Cormenzana, Margarita Aguilera Gómez**

Departamento de Microbiología,
Facultad de Farmacia, Universidad
de Granada

En la actualidad el empleo de bacterias del ácido láctico probióticas, principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se ha generalizado mediante su incorporación en productos lácteos, como el yogur, debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud humana. Esto implica que tanto la seguridad como la estabilidad de estos microorganismos a lo largo del proceso de producción sean un punto de especial atención. Es en este punto donde juegan un papel importante técnicas como la microencapsulación, que ofrecen una protección física frente a condiciones desfavorables a las que estos microorganismos se pueden enfrentar durante los procesos de producción, almacenamiento y durante su paso a través del tracto gastrointestinal. Los exopolisacáridos microbianos, ampliamente utilizados en industria alimentaria, pueden constituir un buen material de encapsulación ya que entre sus funciones biológicas se encuentra la de proteger a las células microbianas frente a efectos adversos.

En este trabajo de tesis se ha abordado un estudio sobre el potencial de empleo de polímeros microbianos como agentes para la microencapsulación de microorganismos probióticos. Para ello se ha investigado la viabilidad de los microorganismos encapsulados al exponerse frente a diversas condiciones desfavorables *in vitro* así como también su capacidad de colonización a nivel intestinal, el impacto sobre comunidades representativas de la microbiota fecal y su capacidad para modular la respuesta del sistema inmune en modelos murinos.

Gelano, xantano, pululano y jambilano, este último obtenido a nivel de laboratorio a partir de *Paenibacillus jamilae*, fueron los polímeros microbianos inicialmente escogidos como material de encapsulación. Sin embargo, sólo las mezclas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) resultaron válidas para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* CRL 1815, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, empleando para ello un generador electrostático de goteo. Dicha encapsulación no mejoraba la viabilidad microbiana durante el almacenamiento ni tampoco tras una exposición *in vitro* a pH muy ácido. Sin embargo, tras la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas, sí se detectó un efecto protector cuando la matriz de encapsulación fue Xantano:Gelano (1%:0,75%). Propiedades probióticas como auto-agregación y producción de peróxido de hidrógeno fueron analizadas

tras la exposición a dichas condiciones gastrointestinales, no observándose ninguna modificación asociada a ella.

Los resultados de los estudios *in vivo* se obtuvieron tras la administración de *L. plantarum* CRL 1815 encapsulado en las 2 mezclas de polímeros validadas. Según los resultados obtenidos tras el análisis mediante Hibridación *in situ* fluorescente, la administración de las cápsulas sin contenido bacteriano estimuló el crecimiento de los grupos microbianos estudiados. Esto significaría una degradación de la pared de las cápsulas por microorganismos fecales permitiendo la liberación de los microorganismos encapsulados a nivel intestinal. Se detectó además un leve incremento del número en el grupo microbiano correspondiente a la cepa administrada cuando ésta fue encapsulada con Jambilano:Gelano (1%:1%), modulándose además los grupos microbianos *C. coccoides-E. rectale* y Clostridial cluster IX. El análisis con electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura permitió aislar el microorganismo administrado asociado a epitelio intestinal cuando se administró encapsulado en Jambilano:Gelano (1%:1%), verificando la hipótesis de una posible colonización por nuestra cepa. Finalmente, no se observó toxicidad ni inmunomodulación en los ensayos de linfoproliferación frente a mitógenos realizados.

Filogenia de la familia Halomonadaceae basada en el análisis por secuenciación multilócica (MLSA)

Rafael Ruiz de la Haba

Directores: **Antonio Ventosa Ucero y M^a Carmen Márquez Marcos**
Departamento de Microbiología
y Parasitología, Facultad de
Farmacia, Universidad de Sevilla

La familia *Halomonadaceae* constituye una rama filogenética independiente dentro de la clase *Gamma proteobacteria* en función del análisis de la secuencia del gen ARNr 16S y aunque agrupa microorganismos muy heterogéneos, está formada fundamentalmente por bacterias halófilas. Desde su creación en 1988, la clasificación de esta familia ha sido modificada en múltiples ocasiones. En abril de 2010, la familia *Halomonadaceae* comprendía 10 géneros: *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Zymobacter*, *Carnimonas*, *Cobetia*, *Halotalea*, *Modicisalibacter*, *Salinicola*, *Kushneria* y *Aidingimonas*.

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar en detalle las relaciones filogenéticas de las cepas tipo de las especies de esta familia y clarificar su clasificación actual mediante una aproximación por MLSA basado en la secuencia de los genes "housekeeping" ARNr 16S, ARNr 23S, *atpA*, *gyrB*, *rpoD* y *secA*. Siguiendo las recomendaciones de los estándares mínimos definidos para la familia *Halomonadaceae*, se ha secuenciado nuevamente el ARNr 16S de siete cepas tipo que poseían muchas posiciones indeterminadas y, por tanto, no alcanzaban los estándares de calidad. Además, se ha llevado a cabo un estudio taxonómico polifásico de algunas

cepas que nos ha permitido proponer la descripción de nuevos taxones.

El análisis por secuenciación multilócica ha confirmado que la familia *Halomonadaceae* forma un grupo monofilético dentro del orden *Oceanospirillales*. Con los resultados obtenidos, todos los géneros incluidos en esta familia son coherentes desde el punto de vista filogenético, a excepción de *Modicisalibacter*, cuya posición taxonómica como género independiente no está clara, y *Halomonas*, que es polifilético. El género *Halomonas* comprende dos grupos claramente diferenciados: el grupo 1 (denominado *Halomonas sensu stricto*), con 12 especies, incluyendo *Halomonas elongata* –especie tipo del género– y el grupo 2, que incluye a 16 especies. Más de 20 especies de este género no se incluyen en ninguno de estos grupos y, puesto que su posición en los diferentes árboles filogenéticos no es estable, tampoco pueden reconocerse como un grupo o género adicional.

Por otro lado, los árboles filogenéticos obtenidos mediante el estudio MLSA, junto a otros estudios fenotípicos, genotípicos y quimiotaxonomicos realizados nos han permitido: i) describir la cepa A10⁻ –aislada de la superficie de las hojas del manglar negro *Avicennia germinans*– como una nueva especie y género dentro de la familia *Halomonadaceae*, bajo el nombre *Kushneria aurantia*. ii) reclasificar las especies *Halomonas marisflavi*, *H. indalinina* y *H. avicenniae* dentro de este nuevo género, como *Kushneria marisflavi*, *Kushneria indalinina* y *Kushneria avicenniae*, respectivamente. iii) modificar la descripción del género *Salinicola* y la de la especie *Salinicola socius*. iv) transferir las especies *Halomonas salaria* y *Chromohalobacter salarius* al género *Salinicola*, como *Salinicola salarius* y *Salinicola halophilus*, respectivamente.

Además, en esta investigación hemos evaluado la capacidad de resolución de los genes *housekeeping* estudiados. La secuencia del gen *secA* es la que presentó una mayor tasa de evolución, seguida por la de los genes *rpoD*, *gyrB*, *atpA*, ARNr 23S y ARNr 16S. Cinco de los seis genes estudiados (ARNr 16S, ARNr 23S, *gyrB*, *rpoD* y *secA*) mostraron una historia evolutiva similar y, por tanto, las filogenias inferidas a partir de ellos fueron bastante semejantes. Los diferentes géneros y grupos intragenéricos definidos para la familia *Halomonadaceae* se conservan al utilizar estos cinco genes, aunque las posiciones relativas entre los grupos e incluso las relaciones dentro de un mismo grupo pueden variar dependiendo del gen estudiado. Con estos resultados concluimos que la transferencia génica horizontal (HGT) juega un papel importante en la evolución de los miembros de la familia *Halomonadaceae*. Por otro lado, el gen *atpA* mostró una historia evolutiva diferente con respecto a los otros genes estudiados, por lo que no es útil como marcador filogenético en esta familia. El análisis de la secuencia concatenada de los seis genes minimizó el impacto de posibles eventos de recombinación al calcular relaciones filogenéticas con fines taxonómicos y dio como resultado una filogenia acorde a la actual situación taxonómica de la familia *Halomonadaceae*. Finalmente, aunque serían necesarios otros estudios mediante MLSA en los que se incluyeran varias cepas de la misma especie, proponemos el uso de los genes ARNr 16S, *gyrB* y *rpoD* como los más adecuados para realizar estudios por MLSA en la familia *Halomonadaceae*.

Control por fosfato en la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos especies del género *Streptomyces*

Miriam Martínez Castro

Directores: Juan Francisco Martín y Carlos Barreiro

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León

El tacrolimus, inmunosupresor ampliamente usado en clínica para evitar el rechazo en los trasplantes de órganos, es producido por diferentes especies de *Streptomyces* como "*Streptomyces tsukubaensis*" y *Streptomyces* sp. ATCC 55098.

La biosíntesis de diversos metabolitos secundarios en *Streptomyces* sólo se da en condiciones limitantes de fosfato. La respuesta a la escasez de fosfato está mediada por el sistema de dos componentes PhoR-PhoP. La unión de PhoP a la zona promotora de ciertos genes (regulón *pho*) provoca una serie de cambios en la célula encaminados a la supervivencia a la limitación por fosfato. La inactivación de este sistema en *Streptomyces lividans* y *Streptomyces natalensis* favorece la superproducción de metabolitos secundarios. Un mecanismo similar puede participar en la regulación de la biosíntesis de tacrolimus en las especies "*S. tsukubaensis*" y ATCC 55098.

Un primer abordaje al trabajo con las especies productoras de tacrolimus consistió en el análisis de la producción de dicho inmunosupresor. En el caso de ATCC 55098 se obtuvieron valores muy bajos y poco reproducibles, mientras que "*S. tsukubaensis*" presenta unos valores medios de producción de 20 mg/l; producción que sufre una disminución ante un aumento del fosfato y un incremento en presencia de lisina o agentes estresantes como el DMSO. Además, los posteriores estudios de Biología Molecular precisaron la construcción de una genoteca en SuperCos 1 para ambas especies. Dichas genotecas fueron organizadas en placas de microtitulación con el objetivo de facilitar los rastreos de las mismas (Martínez-Castro et al., 2009).

Para completar los estudios preliminares se determinó la posición taxonómica de la especie de interés mediante un análisis filogenético basado en la secuencia del ARN ribosomal 16S, englobado en un estudio taxonómico según los parámetros de la Taxonomía Polifásica. Dicho análisis ha permitido definir a *Streptomyces* sp. ATCC 55098 [renombrada como *Streptomyces tacrolimicus* (Martínez-Castro et al., 2010)] y "*S. tsukubaensis*" como especies únicas del género *Streptomyces*.

El estudio del control por fosfato en *S. tacrolimicus* y "*S. tsukubaensis*" precisó, en primer lugar, la secuenciación del sistema de dos componentes *phoRP* en ambas especies. Estos genes presentan una alta identidad con sus ortólogos y la misma organización que en otras especies de *Streptomyces*. La unión de PhoP a la región promotora de *phoRP* en ambas especies, y por tanto su autorregulación, ha sido confirmada mediante experimentos de EMSA.

En *S. tacrolimicus* la inactivación del sistema PhoRP provoca cambios en el patrón de esporulación en medio TBO. Así, se ha observado que

los mutantes *DphoP* y *DphoRP* presentan un crecimiento anómalo no llegando a diferenciarse a bajas concentraciones de fosfato. Esto puede ser debido a ineficiente transporte de fosfato al interior celular. En cambio, si el medio es suplementado con sales de fosfato las cepas mutadas desarrollan una esporulación adelantada con respecto a la cepa silvestre. Al igual que ocurre en *Bacillus subtilis*, parece probable que en *Streptomyces* exista un regulador que tras una situación continua de escasez de fosfato frene la respuesta a esta situación límite y a su vez active la diferenciación morfológica.

En "*S. tsukubaensis*" la delección de *phoP* y *phoRP* mediante REDIRECT no fue posible. Sin embargo, la disposición de la secuencia completa del genoma permitió el estudio de los genes bajo el control de PhoP mediante experimentos de EMSA. Así, se ha detectado que el regulón *pho* no está totalmente conservado entre *S. coelicolor* y "*S. tsukubaensis*". La respuesta a la escasez de fosfato mediada por PhoRP es un mecanismo muy conservado en *Streptomyces*, pero no así los cambios que tienen lugar en la célula, los cuales están mediados por la expresión de los diferentes genes del regulón *pho*.

Importancia del plásmido pSymB para la tolerancia de *Sinorhizobium meliloti* a estrés abiótico

Rebeca Pérez Arnedo

Director: Juan Sanjuán Pinilla
Estación Experimental del Zaidín-
CSIC. Universidad de Granada

Trabajos previos habían evidenciado que la capacidad de adaptación de la bacteria a estrés salino y osmótico influye sobre el desarrollo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. En este trabajo se determinó el papel del plásmido simbiótico pSymB de *Sinorhizobium meliloti* 1021 en la osmoadaptación de esta bacteria, y se identificaron genes localizados en dicho plásmido que son importantes para este proceso. Se sabe que el plásmido pSymB (1,68 Mb) de *S. meliloti* es esencial para esta bacteria y que no puede ser curada del mismo. Los estudios sobre la capacidad de crecimiento de cepas portadoras de distintas versiones delecionadas de pSymB, en medios de elevada osmolaridad, junto con estudios transcriptómicos y análisis *in silico* permitieron la identificación de un región de 200 Kb en este plásmido que es necesaria para la osmoadaptación de la bacteria y que contiene 2,3 veces mayor densidad de genes osmorregulados que el promedio del genoma. Estudios genéticos llevaron a identificar el operón formado por los genes SMB21091 y SMB21092 como importante para la osmotolerancia de *S. meliloti* 1021. El análisis y la caracterización genética a través de la obtención de mutantes individuales en los genes SMB21091 y SMB21092, permitió observar que SMB21092 por sí sólo no es necesario para la osmoadaptación de *S. meliloti*. Por el contrario, la inactivación del gen SMB21091 conllevaba una significativa reducción de la capacidad de crecimiento de la bacteria en medios con altas concentraciones de NaCl, así como a una notable

deficiencia de crecimiento a pH moderadamente ácido y a temperaturas infra y supraóptimas de crecimiento. La complementación con un gen SMB21091 silvestre in trans permitía recuperar los niveles silvestres de crecimiento en tales condiciones. Dada la importancia de SMB21091 para la tolerancia de *S. meliloti* a varios estreses abióticos, este gen ha sido renombrado como *satM* (*salt, acidity and temperatura tolerance*). Al contrario de lo que cabría esperar, la expresión de *satM* parece ser constitutiva. Análisis *in silico* junto con ensayos de determinación de la localización subcelular de la proteína SatM, sugirieron que el gen *satM* de *S. meliloti* 1021 codifica para una proteína periplásmica con probable actividad muramidasa, que podría ser necesaria para garantizar la óptima plasticidad de las envueltas celulares, particularmente el peptidoglucano y la membrana externa, en condiciones ambientales desfavorables. Finalmente, se observó que *satM* no parece estar implicado en el establecimiento de simbiosis con *Medicago sativa*, ya que mutantes en este gen mostraron una capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno similar a la de la cepa silvestre.

Estudio de la producción de magnetita por bacterias y de su aplicación como marcador de actividad biogénica

Teresa Pérez González

Directoras: Concepción Jiménez López y María Teresa González Muñoz

Departamento Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

Los biomarcadores minerales sirven para evidenciar la presencia de vida en muestras de origen desconocido, tanto terrestres como extraterrestres. La magnetita es un óxido de hierro magnético que se utiliza como biomarcador, en concreto el mineral producido por bacterias magnetotácticas. Esto es debido a que estas magnetitas poseen unas características únicas que no están presentes en otros tipos de magnetita, tanto en las producidas de manera inorgánica como en las producidas por otras bacterias. Magnetitas con estas características se han encontrado en un meteorito de origen marciano, lo que se ha utilizado como prueba de una antigua vida microbiana en Marte, esto ha generado un gran debate en torno a las características utilizadas para reconocer la biogenicidad de una muestra. Una de estas características es la pureza química, en este trabajo de investigación se han realizado todo tipo de experimentos de síntesis de magnetita, de formas inorgánica y biogénica, para comprobar si esta característica de la pureza química es válida o no. Gracias a los resultados obtenidos se ha visto que no es válido, ya que hemos sido capaces de incorporar cationes en las magnetitas producidas por bacterias magnetotácticas.

Por otro lado, en la tierra, aparte de las bacterias magnetotácticas otros microorganismos,

las bacterias desasimiladoras reductoras del hierro, precipitan magnetita. Estas magnetitas no son utilizadas como biomarcador porque se las supone indiferenciables de las magnetitas inorgánicas. En esta tesis se ha investigado este tipo de magnetitas en profundidad y se han visto diferencias con las magnetitas inorgánicas pudiendo utilizarse a partir de ahora como biomarcador.

Por último, en esta tesis hemos perseguido un objetivo biotecnológico. Las magnetitas tienen gracias a sus propiedades magnéticas multitud de usos como nanomaterial. Estas propiedades son debidas al tamaño y morfología de la partícula. Las magnetitas producidas por bacterias magnetotácticas son las más apropiadas por su homogeneidad y facilidad de producción. Sin embargo, su aplicación se ve limitada debido a esta homogeneidad. Se ha conseguido variar las propiedades magnéticas de las partículas producidas por bacterias magnetotácticas incorporando cationes en los cristales. Gracias a esto se abre el abanico de aplicaciones en las que se pueden utilizar.

Caracterización de la proteína efectora SteC de *Salmonella* en el modelo eucariótico de levadura

Pablo Fernández Piñar

Directores: **María Molina Martín y Humberto Martín Brieva**
Departamento de Microbiología II.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

Numerosos factores de virulencia de *Salmonella* son proteínas efectoras secretadas por sistemas de secreción tipo III (T3SS) al interior de la célula hospedadora, que favorecen la entrada de la bacteria en el interior de la misma y su replicación y supervivencia intracelular. Para ello, actúan sobre distintos procesos y estructuras celulares (tales como las rutas de transducción de señales mediadas por MAP quinasas y el citoesqueleto) que están altamente conservados en todos los organismos eucarióticos. Este hecho permite utilizar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de célula hospedadora para el estudio de dichas proteínas efectoras.

En este trabajo hemos caracterizado la función de la proteína efectora SteC de *Salmonella* Typhimurium utilizando este modelo. La sobreexpresión de SteC en levadura es capaz de inhibir su crecimiento alterando sustancialmente su morfología y estructuras del citoesqueleto. Además, SteC produce la inhibición de la ruta de apareamiento mediada por las MAP quinasas Fus3 y Kss1 y de la ruta de alta osmolaridad mediada por la MAP quinasa Hog1. Hemos demostrado que dicha inhibición tiene lugar a nivel de la Rho GTPasa Cdc42 mediante la interacción con su GEF Cdc24, a través de la región amino-terminal de SteC. Esta región presenta similitud estructural a proteínas reguladoras de la señalización por proteínas G (RGS), y de hecho también interacciona con la subunidad α de la proteína G heterotrimérica de la ruta de apareamiento (Gpa1). Esta región amino-terminal de SteC es así mismo

responsable de los efectos fenotípicos y de inhibición del crecimiento observados al sobreexpresar de SteC en levadura, así como de su localización membranal. Por consiguiente, utilizando el modelo de levadura, hemos caracterizado una nueva región funcional en la proteína SteC, estableciendo un punto de partida para nuevos estudios de esta proteína en células eucarióticas superiores.

Estudio de la expresión de enzimas del metabolismo de aminoácidos en *Lactococcus lactis*

Tomás García Cayuela

Directoras: **Teresa Requena Rolanía y Carmen Peláez Martínez**
Dept. de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM. Dept. de Química-Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid

La presente Tesis Doctoral describe la influencia de diversos mecanismos de regulación en la expresión de enzimas del metabolismo de aminoácidos y su relación en el control de la formación de compuestos volátiles en *Lactococcus lactis*. Para la consecución de este trabajo, se llevó a cabo el estudio de la expresión de determinadas enzimas que participan en las rutas de síntesis y degradación de aminoácidos. El estudio se realizó integrando observaciones fenotípicas con análisis genómicos y transcriptómicos en estirpes de *L. lactis* sometidas a condiciones de crecimiento con diferencias en la disponibilidad de aminoácidos, especialmente los de cadena ramificada (BCAAs), dado su marcado carácter regulador.

En primer lugar, se estudió en *L. lactis* IFPL730 el efecto del contenido en BCAAs en el medio de crecimiento sobre la expresión de genes que están relacionados con el catabolismo de aminoácidos y la formación de compuestos representativos del aroma en queso (*araT*, *bcaT*, *kivD*, *ytjE* y *paneE*). La carencia o ausencia de BCAAs en el medio de crecimiento determinó cambios en la expresión de estos genes, probablemente controlados bajo el mecanismo de regulación global del metabolismo del nitrógeno ejercida por CodY. Los cambios genéticos observados en estas condiciones de crecimiento repercutieron en el perfil de compuestos volátiles producidos por *L. lactis* IFPL730.

En segundo lugar, se caracterizó la respuesta en el metabolismo de aminoácidos de *L. lactis* a la carencia de isoleucina en el medio de crecimiento mediante un estudio genómico-transcriptómico. El análisis genómico se realizó para investigar la organización del genoma de *L. lactis* IFPL730 mediante hibridación genómica comparativa (CGH), utilizando un microchip con los genomas de *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* SK11. El análisis por CGH mostró la variabilidad genética existente entre las tres cepas de *L. lactis*, revelando la existencia de diversidad tanto de genes como de regiones inter-

génicas. La respuesta a la carencia de isoleucina fue evaluada mediante un estudio transcriptómico sobre *L. lactis* IL1403 e IFPL730 en diferentes etapas del crecimiento. Se mostró una variabilidad en la expresión de genes implicados en la hidrólisis de péptidos y el transporte de péptidos y aminoácidos en respuesta a la ausencia de isoleucina. También se estudió la expresión variable de genes involucrados en la biosíntesis de isoleucina en las dos estirpes y en diferentes estados celulares. Además, se observó la existencia de un complejo mecanismo que regulaba la respuesta génica a la carencia de isoleucina en *L. lactis*, implicando a varios reguladores y conectando el metabolismo del nitrógeno y del carbono.

Por último, se caracterizaron los mecanismos genéticos relacionados con la regulación de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730. Esta región posee dos presuntas secuencias consenso de promotores con polaridad divergente, una en dirección al gen *kivD* y la otra en la dirección opuesta delante de un operón compuesto por los genes reguladores *rmaF* y *rlrC*. Además, en esta región se encuentran una presunta secuencia de reconocimiento para la unión con el regulador CodY (caja CodY) entre las regiones -10 y -35 del promotor P_{kivD} y una secuencia repetida inversa (RI) cerca de la región -35 del promotor $P_{RmaF-RlrC}$. Se procedió a la fusión transcripcional de esta región promotora en un vector de expresión en *L. lactis*, que se construyó para la realización de este estudio con los genes que codifican las proteínas autofluorescentes roja (mRFP) y verde (GFP), organizados en sentido divergente. Los resultados obtenidos permiten concluir que los reguladores *RmaF* y *RlrC* reprimen la expresión de la región promotora del gen *kivD*. Además, se comprobó que la expresión de la región promotora del gen *kivD* dependía de la secuencia correspondiente a la caja CodY y de la secuencia RI y que la influencia ejercida por estas regiones dependía del contenido en BCAAs en el medio de crecimiento.

Epidemiología molecular de virus causantes de gastroenteritis y hepatitis en Cataluña

Unai Pérez Sautu

Directores: **Albert Bosch Navarro y Rosa María Pintó Solé**
Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona

Los virus entéricos humanos se convierten en contaminantes del medio acuático debido a que son excretados en grandes cantidades por los individuos infectados y a que los mecanismos de depuración de aguas residuales actuales no aseguran una completa eliminación de los mismos. Un importante número de los brotes de gastroenteritis de origen hídrico documentados están relacionados con norovirus (NoV) y sapovirus (SaV) humanos. Se realizó un estudio de la cuenca del río Llobregat basado en un muestreo mensual de diferentes puntos a lo largo del mismo, con el objetivo de estudiar el papel de estos virus como contaminantes biológicos de nuestros ríos. Además, se estudiaron también

muestras procedentes de una estación depuradora de aguas residuales (E.D.A.R.) y de una planta de tratamiento que emplea el mencionado río como fuente para la producción de agua potable. Todas las muestras se concentraron y se sometieron a técnicas de Real-Time RT-PCR específicas para detectar ambos virus. Se detectaron elevadas concentraciones de NoV y SaV tanto en muestras de aguas residuales como de agua de río. Todas las muestras de agua de consumo resultaron negativas para ambos virus. Tanto NoV como SaV fueron detectados a lo largo de casi todo el periodo de estudio (Noviembre 2007 - Abril 2009) con una mayor concentración general durante la estación fría. Se observó un claro descenso en la concentración de ambos virus en los meses de verano (Julio y Agosto) en todas las clases de muestras positivas. Ambos virus se mostraron parcialmente resistentes al efecto depurador de los procesos de la E.D.A.R. estudiada. El genotipo de SaV más prevalente fue el G1.2. En el caso de NoV el genotipo más prevalente fue el G1.4. Se detectaron además por primera vez en el medioambiente diferentes variantes de la cepa pandémica de NoV de genotipo H.4, corroborando su circulación en la población en el periodo estudiado. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de de NoV y SaV como contaminantes biológicos del río Llobregat, y señalan a ambos como unos patógenos humanos con una elevada prevalencia medioambiental.

Entre los diferentes orígenes de la infección por el virus de la hepatitis A (HAV), destaca la introducción del virus desde áreas endémicas mediante el consumo de alimentos contaminados, los viajes a dichos destinos y los flujos de inmigración desde los mismos. Otro de los grupos de riesgo son los hombres homosexuales activos (MSM), entre los cuales han tenido lugar en los últimos años importantes brotes en diferentes países de Europa. En este contexto se realizó un estudio de muestras de pacientes IgM+ para el HAV provenientes de casos esporádicos y brotes ocurridos en la comunidad autónoma de Cataluña en el período 2005-2009. Por otro lado, se quisieron estudiar también las características antigénicas de las cepas circulantes del virus con el objetivo de conocer su potencial para actuar como reservorio de nuevas variantes antigénicas que pudieran escapar a la protección ofrecida por las vacunas actuales. Para ello, las cepas aisladas en el estudio epidemiológico se caracterizaron molecularmente y sus secuencias de aminoácidos se compararon con las de las cepas HM-175 y GBM, constituyentes de dos de las vacunas comerciales. En el estudio epidemiológico, la mayoría de cepas aisladas se pudieron caracterizar como relacionadas con viajes, inmigración e importaciones de alimentos desde áreas endémicas, además de cepas endémicas circulantes entre la población MSM. El 48% de las cepas pertenecían al genotipo IA, el 40% al genotipo IB y el 2% al genotipo IIIA. El 10%

restante pertenecía a un subtipo indeterminado equidistante del los genotipos IA y IB que nosotros proponemos como un posible nuevo genotipo (IC). Entre todas estas cepas se aislaron seis variantes antigénicas potencialmente capaces de escapar a la protección ofrecida por dos vacunas actuales, la mayoría de ellas en el grupo MSM. Estos datos indican que las cepas del HAV circulantes en la población de Cataluña tienen el potencial de actuar como reservorio de nuevas variantes antigénicas, especialmente en aquellos grupos de riesgo donde se puede dar la coincidencia de factores tales como una vacunación inadecuada y una situación de inmunosupresión. Algunas de estas variantes antigénicas pueden tener capacidad de resistencia frente a ciertos preparados vacunales actuales así como una capacidad de proliferar en presencia de anticuerpos superando a la cepa salvaje HM-175, lo que indica que una vez seleccionadas en un individuo inadecuadamente vacunado y con un cierto grado de inmunosupresión, tales como los pacientes HIV+, podrían propagarse a otros individuos. Es conveniente por tanto dirigir hacia los distintos grupos de riesgo programas de vacunación específicos, y en el caso del grupo MSM, información sobre prácticas sexuales de riesgo. Además, y muy particularmente entre los individuos MSM HIV+, se deben hacer esfuerzos para completar los calendarios de vacunación debido a su menor nivel de respuesta inmune.

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.**
- **Asociación Grupo Bioindicación**

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 Benítez, Ana
- López Ponce, Francisco José
- Yáñez Ruiz, David Rafael
- Jorge Blanco, José Carmelo
- Rubio Vallejo, Manuel Francisco
- Vázquez Domínguez, Evaristo
- Lafarga Capuz, Bernardo
- Sesma Bea, Begoña

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.semicro.es).

El Grupo Especializado de Protistología

Ana Martín González¹ y Aurelio Serrano Delgado²

¹Dpto. Microbiología III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. anamarti@bio.ucm.es

²Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Universidad de Sevilla. aurelio@ibvf.csic.es

En primer lugar, quisiéramos agradecer al editor de *Actualidad SEM*, Federico Navarro, su apoyo a este Grupo Especializado de Protistología y la deferencia que ha tenido con nosotros al invitarnos a este número especial, que permitirá presentar y dar a conocer al resto de los socios de la SEM quiénes somos y cuál es el objeto y la temática de algunas de nuestras investigaciones. También quisiéramos agradecer al actual presidente de la SEM, Ricardo Guerrero, el apoyo que siempre ha brindado a este Grupo Especializado, ya desde su etapa de editor de nuestra revista *International Microbiology*, donde nos dio la oportunidad de publicar un número monográfico de Protistología en el año 2001 (volumen 4).

NUESTROS COMIENZOS

El Grupo Especializado de Protistología de la SEM comienza su andadura en 1993, a propuesta de su Presidente, el Profesor Francisco Ruiz Berraquero, que atiende la petición del socio de la SEM, el Dr. Juan Carlos Gutiérrez Fernández. Poco después se formó una Comisión Gestora, constituida por los Dres. Juan C. Gutiérrez, Aurelio Serrano, Antonio Torres, Luis Miguel Ruiz, Jesús Martín y Francisco Gamarro, que en reuniones posteriores establece los objetivos y principales líneas directrices del Grupo Especializado. En 1994, se elige al primer Presidente del Grupo Especializado de Protistología al Prof. Antonio Torres de la Universidad de Sevilla.

UN POCO MÁS DE HISTORIA

Desde su constitución hasta la actualidad, este Grupo Especializado ha participado activamente en todos los Congresos de la SEM y también, en muy diversos congresos internacionales de la especialidad. Durante este tiempo, se han sucedido diversas Juntas Directivas, que nos han representado en muy diversos foros. Actualmente este Grupo Especializado, representa a nuestro país en la *Federation of European Protistological Societies* (FEPS), institución internacional de la que es miembro fundador.

¿ES NECESARIO UN GRUPO ESPECIALIZADO EN PROTISTOLOGÍA?

Llegados a este punto habría que preguntarse, ¿Por qué es necesario un grupo especializado de Protistología? O lo que es lo mismo, qué tienen de interés esos microorganismos, desafortunadamente relegados hasta ahora en los libros de Microbiología, cuando no perdidos en los textos de Botánica y Zoología, como una falsa moneda. ¡Está claro que son microorganismos! Pero además, son microorganismos muy interesantes, por muy diversas razones. No vamos a extendernos, tan sólo algunas líneas para refrescar la memoria.

Muchos protistas, tanto de vida libre (*Chlamydomonas*, *Euplotes*, *Tetrahymena*, *Ostreococcus*, *Paramecium*,...) como parásitos (*Giardia*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*,...), se pueden cultivar en el laboratorio y la secuenciación de su genoma ha permitido disponer de herramientas imprescindibles para los estudios moleculares. Por su posición filogenética privilegiada representan seres vivos unicelulares en los que la evolución ha ensayado diversas estrategias, algunas de las cuales han perdurado en los vegetales y otras, exclusivamente en el reino animal. Los microbiólogos especializados en protistas no nos sorprendemos cuando nos hablan de la existencia de múltiples isoformas, duplicaciones y basura génica, así como genes de resistencia al herbicida paraquat en microorganismos no fotosintéticos. Tampoco nos causa sorpresa, porque nos es conocido, que las secuencias génicas de ciertos protistas son más semejantes a sus ortólogas en humanos que aquellas presentes en la levadura. Y seguro que el microbiólogo lector, sabe con este “la” a quien nos estamos refiriendo..... Nadie duda que los protistas desempeñan un papel importante en todos los ecosistemas terrestres y acuáticos actuales, incluido en aquellos con condiciones extremas, determinando así los límites de tolerancia de los eucariotas como conjunto. También los hay anaerobios, con y sin mitocondrias. En estos ambientes naturales ocupan nichos ecológicos importantes y pueden utilizarse como bioindicadores de contaminación ambiental, tanto orgánica

como inorgánica, y en su biorremediación. En los protistas se puede comprobar claramente el concepto de filo especie, es decir, los ecotipos bacterianos, para que nos entendamos. Los microbiólogos especializados en sanidad seguro que comprenden la incidencia clínica de los protistas, si mencionamos los términos, malaria, enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, etc. Sin embargo, probablemente desconocen que los protistas son reservorios microbianos de importantes bacterias patógenas humanas (*Legionella*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Chlamydia*... ¡y la lista continúa creciendo!) (Molremet et al. 2005; Gourabathini et al. 2008; Harriff y Bermudez, 2009). Estos reservorios incrementan la virulencia bacteriana, así como la permanencia de estos patógenos en los ecosistemas y serían la razón por la cual dichos patógenos no se podrían detectar por métodos convencionales de cultivo. No hablaremos de transferencia génica procariota-eucariota y viceversa, pero estos fenómenos serían los únicos capaces de explicar la presencia de genes codificantes de proteorrodopsinas en algunos dinoflagelados marinos, por ejemplo *Oxyrrhis marina*, como se acaba de publicar recientemente (Slamovits et al. 2011). Hay que destacar la revolución que ha significado el reciente descubrimiento de los piceoeucariotas, protistas del tamaño de bacterias (1-3 µm) y los eucariotas más pequeños descritos (Derelle et al. 2006); por su gran diversidad se adscriben a todos los grandes grupos filogenéticos (alveolados, estramenópilos, microalgas prasinofíceas), pero también definen linajes evolutivos totalmente nuevos (p.e., ficobilifitas) cuyas particularidades metabólicas y relevancia ecológica están por esclarecer. Por último, debemos hacer referencia a las aplicaciones biotecnológicas de los protistas en el ámbito de la depuración de aguas residuales, degradación de contaminantes ambientales diversos (PAHs, colesterol,...) y la eliminación de algunos inorgánicos, como el arsénico. Ya sabemos que la biotransformación metálica no es un fenómeno restringido a bacterias; de hecho, algunos protistas, como *Tetrahymena thermophila*, pueden llevarla a cabo. Hablando de arsénico, vaya revuelo mediático que existe con la cepa de *Halomonas*, aislada del lago Mono que puede crecer *in vitro*, utilizando arsénico en vez de fósforo (Wolfe-Simon et al. 2010). Sin embargo, en ciertas diatomeas marinas, el Cd, otro metal no esencial y tan citotóxico como el arsénico, forma parte de algunas enzimas (Park et al. 2007). Más conocidos son los biocombustibles, obtenidos a partir de microalgas, pero podríamos poner más ejemplos. Como las ciencias adelantan que es una barbaridad, ya disponemos de biosensores, “nanomáquinas” y otros artilugios moleculares, basados en protistas (Werlin et al. 2011; Amaro et al. 2011). Todo esto no habría sido posible sin los estudios básicos en protistas modelo, que han realizado muchos microbiólogos y que tan buenos frutos, como es la obtención del premio Nobel, le ha supuesto a dos de ellos, Thomas Cech (Cech, 2007) y Elisabeth Blackburn (Blackburn, 2010). Como diría esta última investigadora en una entrevista cuando le dieron este galardón, “es estupendo trabajar con un organismo tan “freaky” como *Tetrahymena*”; ¡ No sabes lo bien que te comprendemos, Liz !

¿QUIÉNES SOMOS?

Desde su constitución hasta la actualidad, nuestros queridos consocios del Grupo han desarrollado una activa labor, tanto gestora, como dedicada a promocionar la investigación de diversos aspectos de la Protistología. Pensamos que este grupo tiene que aportar cosas importantes a la Sociedad Española de Microbiología, siendo una de las principales, aumentar y difundir los conocimientos sobre los protistas entre los socios. Somos un Grupo poco numeroso pero, al igual que los protistas, muy diverso como se puede ver por los contenidos de los textos que han elaborado algunos de los equipos investigadores a los que hemos solicitado su colaboración. Desde aquí, quisiéramos disculparnos con los grupos ausentes, pero estamos seguros que sabrán comprender que disponemos de un espacio limitado.

Por esta limitación de espacio y también porque parece un poco presuntuoso, no hacemos aquí una relación de los contactos con empresas y organismos que este Grupo Especializado ha establecido directa o indirectamente, a través de distintos grupos de investigación. Muchas de estas relaciones quedan perfectamente reflejadas en los textos aportados por dichos grupos.

El Grupo de Protistología de la SEM ha establecido y mantiene fluidas relaciones con otros grupos de Protistología europeos y americanos, como el *Groupement des Protistologues de Langue Francaise* y la *International Society of Protozoologists*, y está integrado, junto con otras doce Sociedades nacionales del mismo ámbito, en la FEPS (*Federation of European Protistological Societies*), organismo internacional del que este Grupo es miembro fundador. En estos foros desarrollamos un papel activo y como prueba de ello, cabe decir que el Dr. Aurelio Serrano, ha sido recientemente invitado a organizar en la bonita ciudad de Sevilla el *VII European Congress of Protistology* (VII ECOP), que tendrá lugar en el año 2015.

REFERENCIAS

- Amaro F, Turkewitz A, Martín-González A, Gutiérrez JC. (2011). Whole biosensors for detection of heavy metals ions in environmental samples based of metallothioneins promoters from *Tetrahymena thermophila*. *Microbial Biotech* (en prensa) doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00252.x.
- Balckburn EH. (2010). Telomeres and telomerase: the means to the ends (Nobel lecture). *Anger Chem Int Rd Engl* 49: 7405-7421.
- Cech TR. (2007). On the occasion of the 25th anniversary of the discovery of the catalytic RNA. *Biol Chem* 388: 661-662.
- Derelle E et al. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11647-52.
- Gourabathini P, Blandl MT, Redding KS, Gunderson JH, Berk SG. (2008). Interaction between foodborne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Env Microbiol* 74: 2518-2525.
- Harriff M, Bermudez LE. (2009). Environmental amoebae and mycobacterial pathogenesis. *Methods Mol Biol* 465: 433-442.
- Molremet M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu-Kwaik (2005). Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Env Microbiol* 71: 20-28.

- Park H, Song B, Morel FM. (2007). Diversity of Cd-containing carbonic anhidrase in marine diatoms and natural waters. *Env Microbiol* 9: 403-413.
- Slamovits CH, Okamoto N, Burri L, James ER, Keeling PJ. (2011). A bacterial protorhodopsin proton pump in marine eukaryotes. *Nat Commun* 2: 183.
- Werlin R, Priester JH, Midke RE et al. (2011). Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain. *Nat Nanotech* 6: 65-71.
- Wolfe-Simon F, Switzer Blum J, Kulp RR et al (2010). A bacterium that can grow by using arsenic instead phosphorous. Doi: 10.1126/science.1197258.

PRESIDENTES

Antonio Torres (Universidad de Sevilla, 1994-1998), Luis Miguel Ruiz (Instituto López Neira, Granada, CSIC, 1998-2001), Juan Carlos Gutiérrez (Universidad Complutense de Madrid, 2001-2004), Aurelio Serrano (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Universidad de Sevilla, 2004-2010), Ana Martín (Universidad Complutense de Madrid, 2010-actualidad).

MESAS REDONDAS Y SIMPOSIOS

- XV Congreso en Madrid, 1995: Protistología. Moderador: Juan C. Gutiérrez. Ponentes: Bland J. Finlay, A. Torres, Luis M. Ruíz y Dimas Fernández-Galiano.
- XVI Congreso en Barcelona, 1997. Protistología. Moderador: Antonio Torres. Ponentes: Manuel C. López, Jesús Martín, Aurelio Serrano, A. Baroin-Tourancheau
- XVII Congreso en Granada, 1999: Avances en Protozoología. Moderador: Luis Miguel Ruiz, Ponentes: Mariano

Esteban, Dieter Ammermann, Dolores González-Pacanoska y Ana Martín.

- XVIII Congreso en Alicante, 2001: Relevancia de los Protistas en la Microbiología Eucariota. Moderadores: Juan C. Gutiérrez y Aurelio Serrano, Ponentes: Jose Miguel Rubio, Michael Sleight, Juan C. Gutiérrez, Aurelio Serrano.
- XIX Congreso en Santiago de Compostela, 2003: Protistas como Modelos Microbianos. Moderadores: J.C. Gutiérrez y Luis M. Ruíz, Ponentes: Aurelio Serrano, Luis M. Ruíz, Ricardo Escalante, J.C. Gutiérrez.
- XX Congreso en Cáceres, 2005: Protistas. Microorganismos modelo en Biotecnología y Biomedicina. Moderador: Aurelio Serrano, Ponentes. Eduardo Villalobos, Federico Valverde, Jaume Puigagut, Carmen Thomas.
- XXI Congreso en Sevilla, 2007: Avances en el Conocimiento de Protistas en la Era Post-Genómica. Moderador: Aurelio Serrano, Ponentes: Francisco Gamarro, Emilio Fernández, Gilbert Greub, Juan C. Gutiérrez.
- XII Congreso en Almería, 2009: Protistas como Biofactorías y Biosensores Microbianos. Moderadores: Juan C. Gutiérrez y Aurelio Serrano. Ponentes. Miguel García-Guerrero, Emilio Molina, Francisco Amaro, Eduardo Costas.

Se han realizado siete reuniones científicas en Córdoba (1996), Granada (1998 y 2004), Madrid (2000 y 2006) y Sevilla (2002, 2008). Cabe destacar que la reunión de 2008 tuvo por vez primera carácter internacional, al realizarse conjuntamente con el *Groupement des Protistologues de Langue Française* bajo la denominación de "First Spanish-French Congress on Protistology".

Biodiversidad Críptica

Genoveva F. Esteban, Bland J. Finlay, Francisco Guerrero, Francisco Jiménez-Gómez, Gema Parra, Andréa Galotti y José Luis Olmo

El Grupo "Biodiversidad Críptica" lo constituye un consorcio de investigadores del Reino Unido y España. Actualmente el Grupo incluye a los doctores Genoveva Esteban, Bland Finlay y Andréa Galotti (The River Laboratory, Queen Mary University of London, Reino Unido); a los profesores de universidad Dra. Gema Parra, Dr. Francisco Guerrero y Dr. Francisco Jiménez-Gómez (Dpto. de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Jaén; y al Dr. José Luis Olmo (Dpto. de Producción Vegetal y Tecnología Agraria, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Castilla-La Mancha).

El principal objetivo del Grupo es el de fomentar la Biodiversidad Críptica como una herramienta de conservación, para la evaluación de ecosistemas acuáticos y para enlazar la investigación científica con la gestión ambiental. La parcela investigadora está centrada en el descubrimiento de especies raras de protistas que residen en hábitats poco comunes y que actúan como especies indicadoras de dichos ambientes. Una parte significativa de la investigación se centra en el estudio y descripción de nuevas asociaciones simbióticas en organismos unicelulares eucariontes.

¿QUÉ ES BIODIVERSIDAD CRÍPTICA?

No existe una definición oficial de lo que constituye la “Biodiversidad críptica”, también llamada “escondida” u “oculta”. Para biólogos moleculares se entiende como la diversidad genética dentro de, por ejemplo, un único taxón. Pero el concepto de biodiversidad críptica abarca mucho más. En el caso que aquí concierne, esta diversidad oculta presenta dos vertientes, y el uso de una u otra está determinado por la naturaleza de la investigación en sí. Las dos vertientes son:

1. Desde un punto de vista de conservación del ambiente acuático, la biodiversidad críptica es sinónimo de biodiversidad escondida, es decir, la biodiversidad invisible, que son todos aquellos organismos que debido a su pequeño tamaño (menores de 2 mm) son invisibles al ojo humano y, debido a ello, no se incluyen en inspecciones biológicas de conservación de los ecosistemas o a la hora de determinar las condiciones biológicas para la conservación de un determinado hábitat (Esteban & Finlay 2010). Y sin embargo, estos organismos microscópicos constituyen la base de las cadenas tróficas (bucle microbiano).
2. Especies microscópicas inactivas o enquistadas presentes en los ambientes acuáticos; también incluye especies con muy baja densidad poblacional y que no se detectan durante observaciones microscópicas rutinarias. Este tipo de diversidad críptica también se conoce como “banco de semillas” ya que los organismos enquistados o presentes en número bajo se encuentran “en espera” de que se restablezcan las condiciones ambientales adecuadas para su crecimiento. El papel ecológico de la biodiversidad críptica como “banco de semillas” es fundamental porque está encargada del continuo funcionamiento de los ecosistemas y es responsable de la respuesta inmediata a cambios en el ambiente. Este tipo de diversidad “oculta” se puede poner de manifiesto con métodos especiales de cultivo y otros experimentos en el laboratorio. Por ejemplo, en un estudio reciente de ciliados de las Salinas del Alto Guadalquivir realizado por el Grupo Biodiversidad Críptica se descubrió que un 85 a 100 % de la riqueza de especies de ciliados era críptica; dichas especies se detectaron en experimentos de manipulación y diluciones sucesivas de la concentración de sal (Galotti et al. 2010).

INVESTIGACIÓN EN EL GRUPO BIODIVERSIDAD CRÍPTICA

Bland J. Finlay y Genoveva F. Esteban son profesores en la *Queen Mary University of London*. Bland es miembro de la Real Academia de Ciencias del Reino Unido, y también de la Real Academia de Ciencias y Letras de Dinamarca. La investigación científica de los doctores Finlay y Esteban tiene lugar en el *River Laboratory* en Dorset, y se centra en la eco-



De izquierda a derecha: Drs. Genoveva F. Esteban, Andréa Galotti y Bland J. Finlay.

logía de los protozoos de vida libre y en la dinámica y dimensiones de la diversidad biológica a nivel microbiano.

Actualmente, la prioridad es relacionar la investigación científica de base con la gestión y la conservación ambiental mediante el estudio de la biodiversidad “críptica”. El objetivo fundamental es el de incorporar organismos acuáticos de tamaño diminuto en las inspecciones de conservación ambiental y desarrollar directrices de gestión de la biodiversidad y de los ecosistemas, de manera que cubran la totalidad de la cadena trófica y no solamente aquellos organismos que se puedan considerar como más carismáticos (como libélulas o tritones, las larvas de los cuales dependen de organismos microscópicos para su supervivencia).

Otras áreas de investigación tienen como objetivo el descubrimiento de un “oasis” de ciliados mixotróficos de agua dulce; algas endosimbiontes de *Loxodes rostrum*; la identificación de patrones fundamentales de la diversidad de eucariotes unicelulares en ambientes naturales con el fin de comprender y hacer predicciones del funcionamiento de los ecosistemas acuáticos; la caracterización de la diversidad microbiana a nivel local y regional, en ambientes extremos y en suelos; el diseño de técnicas rápidas de evaluación de hábitats acuáticos mediante el empleo de ciliados como indicadores de salud del ecosistema; la distribución acumulativa de riqueza de especies (activas y crípticas) de ciliados y curvas de rarefacción; y la taxonomía de ciliados.

Genoveva Esteban es una “*Science, Technology and Engineer Ambassador (STEM)*” y organiza eventos científicos populares dirigidos a colegios de educación primaria y secundaria, institutos y al público en general, para promover y



El Dr. Jiménez-Gómez en una de las salinas objeto de la investigación.

fomentar la investigación científica. Para ello, recibe financiación de la *Royal Society*, *Esmée Fairbairn Foundation*, *Percy Sladen Foundation Trust* y *Thomas Hardy School* (colegio UNESCO en Dorset, Inglaterra). En reconocimiento a su entusiasmo y dedicación a compartir su pasión científica con las “generaciones futuras”, Genoveva ha recibido un diploma del premio nacional al “*Most dedicated STEM Ambassador of 2010*” en la Cámara de los Lores.

La investigación desarrollada en los últimos cinco años por la Dra. Andréa Galotti ha estado centrada en el estudio de la estructura de tamaños de la comunidad microbiana de sistemas hipersalinos. Dicho estudio se ha desarrollado en la Universidad de Jaén (donde realizó su Tesis Doctoral) y en *The River Laboratory* (Reino Unido), donde ahora realiza sus investigaciones post-doctorales con Bland Finlay y Genoveva Esteban. La investigación de sistemas extremos de la Dra. Galotti no se ha reducido a los sistemas hipersalinos únicamente. Así, ha desarrollado un papel imprescindible en proyectos científicos llevados a cabo en lagunas de alta montaña con el Dr. Francisco Jiménez-Gómez de la Universidad de Jaén, y en estudios sobre la respuesta de macroalgas polares al cambio climático con el Dr. Francisco Gordillo (Universidad de Málaga); este último proyecto le ha permitido viajar por segunda vez al continente antártico y expandir conocimientos sobre ecología microbiana.

Las líneas de investigación de los profesores de la Universidad de Jaén –doctores Francisco Guerrero, Francisco Jiménez-Gómez y Gema Parra– también tiene como prioridad el análisis, gestión y valoración ambiental, con diseño de modelos de funcionamiento de comunidades pelágicas (pico-, nano- y microplancton) como herramienta para la conservación. En concreto se centran en los siguientes aspectos:

1. Tolerancia de distintas especies acuáticas a los productos xenobióticos utilizados principalmente en la



Loxodes rostrum (Martin Kreutz).

agricultura intensiva del olivar. Los productos xenobióticos más comunes de encontrar son residuos de pesticidas, degradados de los mismos, e hidrocarburos aromáticos que se incorporan a la cadena trófica. El objetivo principal es conocer el grado de tolerancia de distintas especies acuáticas, principalmente pertenecientes a la comunidad planctónica (protistas, copépodos, cladóceros, rotíferos, etc), mediante experiencias de toxicidad letal y subletal desarrolladas en laboratorio, así como de experiencias de mesocosmos. Se analizan los efectos sobre distintos “endpoints”, tanto fisiológicos (crecimiento, desarrollo, respiración), como bioquímicos (enzimas antioxidantes, nivel de peroxidación de lípidos) como de comportamiento. Otro objetivo importante dentro de este marco de investigación es desarrollar experiencias *in situ* que permitan determinar el grado de alteración de humedales rodeados de agricultura intensiva mediante la utilización de biomarcadores de contaminación, probados previamente en laboratorio.

2. Análisis de la dinámica de las comunidades planctónicas en sistemas tanto marinos como epicontinentales, haciendo especial énfasis en los estudios de biodiversidad de la comunidad heterotrófica de mayor tamaño (ciliados y zooplancton fundamentalmente) y en el análisis taxonómico/funcional de los componentes pico-nanoplanctónicos. En este último caso, la investigación se aborda desde una aproximación basada en la caracterización de la estructura de tamaños de los organismos a través de métodos automáticos de análisis de imagen y de citometría de flujo.

El Dr. José Luis Olmo es Profesor de Educación Secundaria en la especialidad de Biología y Geología en el IES “Guadiana” de Villarrubia de los Ojos y Profesor Asociado adscrito al Dpto. de Producción Vegetal y Tecnología Agraria de la Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola de la Universidad de Castilla-La Mancha en Ciudad Real. El Dr. Olmo realizó su Tesis Doctoral en el Departamento de Microbiología III de la Universidad Complutense de Madrid y llevó a cabo una estancia post-doctoral de dos años en el laborato-

rio de los doctores Finlay y Esteban. Actualmente participa en las siguientes actividades:

1. Estudios de las comunidades de los protozoos ciliados presentes en los suelos de Castilla-La Mancha, biodiversidad y sus posibles aplicaciones como bioindicadores o bioensayos.
2. Investigación de la biodiversidad de ciliados en hábitats poco estudiados como por ejemplo los ciliados coprolitos en el estiércol agrícola. Desde el punto taxonómico, investigación de la variabilidad morfológica de las especies, concretamente en los ciliados hipotricos.
3. Colaborador en el **kidsINNScience** (*Innovation in Science Education -Turning Kids on to Science-*), a través del Dpto. de Ciencias Experimentales de la Universidad de Santiago de Compostela, además de diseñar nuevas propuestas didácticas donde el elemento principal son los protozoos. **kidsINNScience** es una iniciativa de la Unión Europea dentro del 7º Programa Marco 2007-2013 que desarrollan ocho universidades europeas y dos latinoamericanas. En su vertiente divulgativa ha participado recientemente como ponente en las III Jornadas de Educación Medioambiental celebradas en el Parque Nacional de Cabañeros (Ciudad Real) así como en diversas charlas y conferencias promovidas por la Agenda 21 y Concejalía de Medio Ambiente de Manzanares (Ciudad Real).

PUBLICACIONES Y PROYECTOS RECIENTES DEL GRUPO BIODIVERSIDAD CRÍPTICA

Esteban GF, Fenchel T & Finlay BJ. (2010). Mixotrophy in ciliates. *Protist* 161: 621-641.

Esteban GF & Finlay BJ. (2010). Conservation work is incomplete without cryptic biodiversity. *Nature* 463: 293.

de Vicente I, Amores V, Guerrero F & Cruz-Pizarro L. (2010). Contrasting factors controlling microbial respiratory activity in the sediment of two adjacent Mediterranean wetlands. *Naturwissenschaften*, 97: 627-635

Bradley MW, Esteban GF, Finlay BJ. (2010). Chalk-stream ciliates congregate in biodiversity hot spots. *Res Microbiol* 161: 619-625.

García-Muñoz E, Guerrero F & Parra G. (2009). Effects of copper sulphate on growth, development and behaviour in *Epidalea calamita* embryos and larvae. *Arch Environ Contam Toxicol*, 56: 557-565.

Esteban GF, Finlay BJ & Clarke KJ. (2009). Sequestered organelles sustain aerobic microbial life in anoxic environments. *Environ Microbiol* 11: 544-550.

Finlay BJ & Esteban GF. (2009). Oxygen sensing drives predictable migrations in a microbial community. *Environ Microbiol*, 11: 81-85.

Reul A, Rodríguez J, Guerrero F, González N, Vargas JM, Echevarría F, Rodríguez V & Jiménez-Gómez F. (2008). Distribution and size biomass structure of nanophytoplankton in the Strait of Gibraltar. *Aquatic Microb Ecol* 52: 253-262

Esteban GF & Finlay BJ. (2007). Exceptional species richness of ciliated protozoa in pristine intertidal rock pools. *Mar Ecol Prog Ser* 335: 133-141.

Finlay BJ, Esteban GF. (2007). Body size and biogeography, In: *Body size: the structure and function of aquatic ecosystems*. Cambridge University Press, pp167-185.

Esteban GF, Clarke KJ, Olmo JL, Finlay BJ. (2006). Soil Protozoa – an intensive study of population dynamics and community structure in an upland grassland. *Appl Soil Ecol* 33: 137-151.

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- Modelos de funcionamiento de comunidades pelágicas en ecosistemas singulares (lagos de alta montaña del Parque Nacional de Sierra Nevada): una herramienta para la conservación. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Proyecto 129A/2003. 2005-2008. Investigador Principal: Dr. Francisco Jiménez Gómez.
- Patrones espaciales y temporales de acoplamiento entre hidrodinámica y plancton: impacto de perturbaciones exógenas en un embalse mesotrófico del Sur de la Península Ibérica (El Gergal, Sevilla). Ministerio de Ciencia y Tecnología. Proyecto CGL2005-04070/HID. 2005-2008. Investigador Principal: Dr. Luis Cruz Pizarro.
- Identificación de la dieta de cladóceros y copépodos de hábitat temporales y permanentes mediante análisis de ácidos grasos de lípidos de reserva. Ministerio de Educación y Ciencia. Acción Integrada Hispano-Portuguesa Proyecto HP2007-0001. 2008-2010. Investigador Principal: Dra. María Gema Parra.
- Desarrollo de técnicas de evaluación del grado de alteración de humedales: uso potencial de los anfibios como indicadores de degradación y propuesta de biomarcadores de contaminación en humedales. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Proyecto CGL2007-61482/BOS. 2008-2011. Investigador Principal: Dra. María Gema Parra.
- Rutas de distribución de nutrientes en embalses estratificados del Mediterráneo: Bases científicas para la gestión de la calidad del agua. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Proyecto CGL2008-06101/BOS. 2009-2012. Investigador Principal: Dr. Francisco José Rueda Valdivia.
- *Rationalising Biological Complexity*. Cambridge Templeton International Foundation. 2006-2008. Investigador Principal: Prof. Bland J. Finlay.
- *Ubiquitous dispersal of free-living microbial species*. Natural Environment Research Council. Marine and Freshwater Microbial Diversity Thematic Programme. Investigador Principal: Prof. Bland J. Finlay.
- *Fens as reservoirs of cryptic biodiversity*. Esmeé Fairbairn Foundation. 2009-2012. Investigador Principal: Prof Bland J. Finlay y Dra. Genoveva F. Esteban.
- *Ecology and systematics of an undescribed phototrophic symbiosis: Loxodes rostrum*. Systematics Association and BBSRC CoSyst. 2009-2011. Investigador Principal: Dra. Genoveva F. Esteban.
- *Biodiversity of Lake Tubilla (Spain) – past, present and future*. 2010. Percy Sladen Memorial Fund. Investigador Principal: Prof Bland J. Finlay y Dra. Genoveva F. Esteban.
- *Understanding the biological and ecological background of slow sand filters in order to establish effective chironomid control systems*. Bournemouth and West Hampshire Water. 2010-2011. Investigador Principal: Dra. Genoveva F. Esteban.

El pirofosfato inorgánico, metabolito clave de una bioenergética sostenible bajo condiciones crónicas de estrés en procariotas, protistas y vegetales

Aurelio Serrano

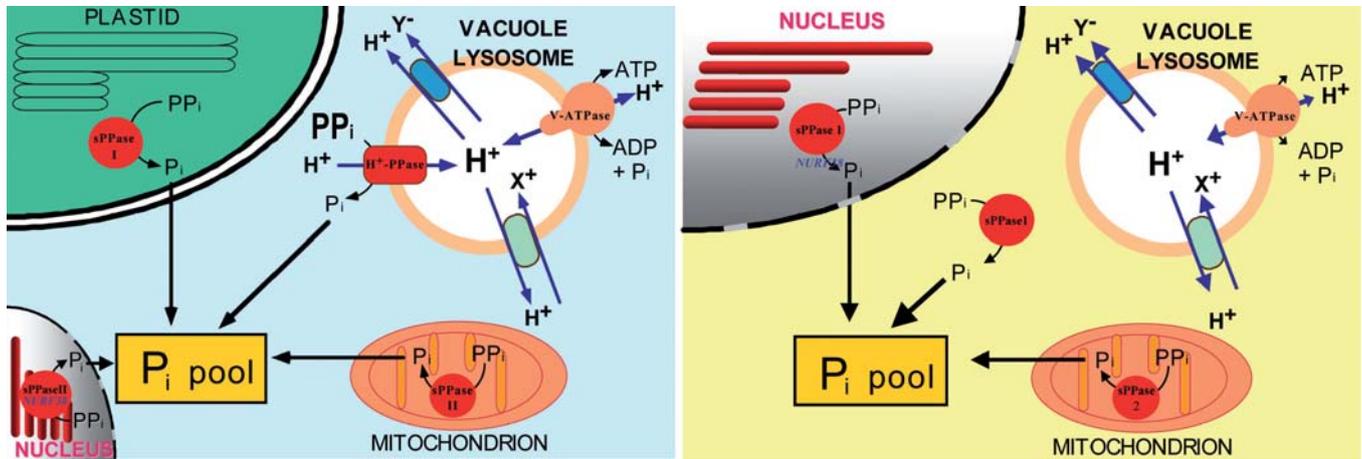
Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Avda. Américo Vespucio 49. 41092-Sevilla

El fósforo no sólo es un componente estructural esencial de diversas macromoléculas biológicas (ácidos nucleicos, fosfolípidos), sino que además juega un papel esencial en la bioenergética celular. Es asimilado por los organismos vivos en su forma más oxidada de ortofosfato (PO_4^{3-}), pero, a diferencia de los otros bioelementos primordiales, su asimilación no conlleva reducción sino energización a metafosfato ($\sim\text{PO}^3$), siendo el enlace pirofosfato (P-O-P) así generado la forma de energía química de enlace utilizada por todos los organismos vivos. Nuestro grupo estudia con un enfoque multidisciplinar (bioquímica, genética molecular y fisiología) los sistemas enzimáticos implicados en estos procesos, especialmente los basados en el pirofosfato inorgánico (PPI), una sencilla molécula rica en energía al igual que el ATP y considerado su precursor en la evolución bioenergética, y en los polifosfatos. El PPI es un componente celular que se genera en muchas reacciones anabólicas de biosíntesis de metabolitos y polímeros. Su hidrólisis es esencial para que esas reacciones discurren en la dirección correcta y se regenere el Pi necesario para las reacciones de fosforilación. Descubierta como componente celular por Severo Ochoa durante su estancia en el laboratorio de los Cori (San Louis, EE.UU.) en la década de 1940, el PPI constituye una encrucijada metabólica única al producirse en unas 250 reacciones bioquímicas, muchas de ellas esenciales para la vida. Por tanto, la hidrólisis del PPI es una reacción bioquímica universal que se ha mantenido a lo largo de la evolución, aunque las proteínas enzimáticas que la catalizan (pirofosfatasa inorgánica, PPasas, EC 3.6.1.1) pertenecen a distintos tipos que difieren en su secuencia de aminoácidos y estructura, así como en su mecanismo catalítico.

El PPI, como compuesto rico en energía intrínsecamente generado en el anabolismo, puede sustituir al ATP en la bioenergética celular. Evidencias recientes indican que un número creciente de organismos (muchos procariotas y protistas, y todo el linaje evolutivo fotosintético) serían capaces de desarrollar bajo condiciones crónicas de estrés una bioenergética sostenible en la que el PPI, un sustrato abundante y “barato” para la célula, y las sencillas PPasas de membrana jugarían un papel clave. Sin embargo, tras casi 30 años desde la identificación de la primera PPasa translocadora de H^+ en

el tonoplasto de plantas, su aparente redundancia funcional con la V-ATPasa en las endomembranas de eucariotas y, sobre todo, el reciente descubrimiento de PPasas translocadoras de sodio (Na^+ -PPasa) en ciertos procariotas indican que la bioenergética del PPI tiene todavía múltiples facetas por revelar. Los estudios llevados a cabo por nuestro grupo tratan de clarificar el papel fisiológico del PPI como “moneda energética” y su posible valor adaptativo frente a condiciones de estrés, así como las implicaciones biotecnológicas en relación con algunos de los graves problemas, como la salinización, que amenazan un desarrollo agrícola sostenible.

Las PPasas se clasifican en dos tipos principales: pirofosfatasa soluble (sPPasas), que hidrolizan PPI con generación de calor únicamente, y las pirofosfatasa de membrana translocadoras de iones (principalmente de protones, H^+ -PPasas) que generan gradientes electroquímicos transmembranales, y son las bombas primarias de iones más sencillas estructuralmente hasta ahora descritas. En 1997, nuestro grupo inició una línea de investigación sobre las PPasas de microorganismos fotosintéticos centrándose en aspectos estructurales, funcionales y evolutivos, la cual ha generado seis Tesis Doctorales (2001-2011), y una serie de publicaciones y presentaciones invitadas en reuniones científicas (1997-2011). Así, demostramos que la H^+ -PPasa, la proteína clave en la bioenergética del PPI, no sólo está presente en todos los linajes evolutivos de organismos fotosintéticos - desde las primitivas bacterias anoxigénicas hasta las plantas superiores, pasando por los diversos grupos de microalgas - sino también en procariotas y protistas heterótrofos muy diversos, tanto parásitos como de vida libre. Ello indicaría que la capacidad de usar el PPI como compuesto útil en la bioenergética celular está mucho más extendida de lo que se pensaba. Mediante una estrategia de genómica funcional comparada, nuestro grupo consiguió por vez primera la complementación funcional de la sPPasa citosólica de levadura por diversas H^+ -PPasas de bacterias, protistas y plantas, lográndose así reconstruir en un organismo heterótrofo el escenario metabólico relativo a la bioenergética del PPI propio de eucariotas fotosintéticos (véase esquema). Este estudio mereció ser publicado en los *Proceedings of the National Academic of Sciences de EE.UU.* Actualmente se



Escenarios metabólicos en relación con la hidrólisis del PP_i generado en el citosol de una célula vegetal fotosintética (p.e. microalga) (izquierda) y una célula fúngica/animal (derecha). Todos los compartimentos subcelulares donde se genera PP_i poseen PPasas. Obsérvese que la célula vegetal carece de sPPasa citosólica, cuya función la realizan (con aprovechamiento energético) la H^+ -PPasa de la membrana vacuo-lisosomal y ciertas enzimas glicolíticas (no representadas), pero posee en sus dos tipos de organelos energéticos, cloroplastos y mitocondrias, dos sPPasas Familia I específicas (Gómez García y col. 2006). Por el contrario, los hongos y animales poseen una sPPasa citosólica y otra isoforma mitocondrial muy similares, ambas de la Familia I. La localización nuclear de una sPPasa parece ser cierta en ambos escenarios y es objeto de estudio en la actualidad. Un escenario parecido al descrito para los eucariotas fotosintéticos se podría dar en diversos protistas heterótrofos, algunos de ellos parásitos y con plástidos residuales (apicomplejos).

está utilizando este sistema para estudios de genómica funcional con PPasas de diverso origen, tanto solubles como de membrana.

Las sPPasas Familia I de eucariotas fotosintéticos, tanto microalgas como plantas, se localizan sólo en orgánulos celulares. Nuestro grupo caracterizó bioquímicamente por vez primera una sPPasa monomérica plastídica y esclareció su filogenia molecular (estrechamente relacionada con sus ortólogos citosólicos de hongos/animales). Sobre esta base, planteamos una sustitución funcional muy temprana en la historia evolutiva de los plástidos, de la sPPasa cianobacteriana ancestral por su homóloga de la célula eucariótica hospedadora. Las sPPasas de eucariotas fotosintéticos son las únicas sPPasas monoméricas funcionales descritas. Asimismo, demostramos mediante la inactivación de genes (mutagénesis insercional, RNAi) que la sPPasa citosólica es una enzima esencial en levadura, células animales y diversos procariontes fotosintéticos, mientras que en microalgas su deficiencia sólo afecta la funcionalidad del orgánulo correspondiente. Por otra parte, identificamos en protistas patógenos (tripanosomátidos, etc.) nuevas sPPasas organelares con propiedades catalíticas inusuales (colaboración con el Instituto de Parasitología y Biomedicina del CSIC). La posible regulación coordinada de sPPasas y H^+ -PPasas en organismos que tienen ambos tipos de PPasas no homólogas (todas las plantas, y numerosos protistas y procariontes), es un tema de gran interés para nuestro grupo. Otro tema relevante es el significado fisiológico de la sPPasa nuclear y su posible interacción con complejos proteicos nucleares, ya que en

Drosophila se ha descrito como subunidad NURF-38 del complejo remodelador de la cromatina.

La H^+ -PPasa es un homodímero con subunidades de 70 kDa, por lo que su gran simplicidad estructural en comparación con las complejas ATPasas la puede hacer de gran utilidad para esclarecer el mecanismo básico de la transducción de energía por los sistemas bioquímicos. Nuestro grupo obtuvo, en colaboración con grupos de Dinamarca y Francia, la primera evidencia directa (obtenida por TEM y "Single-Particle Análisis") de que la H^+ -PPasa es un homodímero. Actualmente se están desarrollando colaboraciones con grupos de Dinamarca y Reino Unido para obtener información estructural precisa (tomografía molecular, cristales 2D y 3D) sobre diversas H^+ -PPasas microbianas y vegetales que conduzca a determinación de su estructura molecular. La amplia distribución de H^+ -PPasas en microorganismos fotosintéticos y heterótrofos diversos - bacterias fotosintéticas anoxigénicas, bacterias y arqueas extremófilas primitivas, protistas fotosintéticos con plástidos ancestrales (cianelas), o protistas parásitos de carácter arcaico (apicomplejos y tripanosomátidos)- es una cuestión sobre la que nuestro grupo ha trabajado activamente, habiéndola presentado como evidencia de una bioenergética ancestral mantenida en el presente por organismos sometidos frecuentemente a situaciones de estrés (nutricional, biótico, etc). En este sentido, diversos resultados obtenidos por nuestro grupo con bacterias púrpuras fotosintéticas apoyan claramente la existencia de una bioenergética de estrés basada en el PP_i en la que la H^+ -PPasa jugaría un papel clave.

Grupo de Investigación Bioenergética del Fosfato

El Grupo "Bioenergética del Fosfato" es desde 1997 un Grupo de Investigación consolidado (BIO-261) de los sucesivos Planes Andaluces de Investigación, Desarrollo e Innovación, así como una unidad estructural del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro Mixto del CSIC y la Universidad de Sevilla. Centra sus líneas de investigación en los mecanismos biológicos de transducción de energía usando como sistemas de estudio tanto proteínas enzimáticas solubles como proteínas integrales de membrana translocadoras de iones, así como complejos multiproteicos implicados en fotosíntesis. Promovido inicialmente por el Profesor Manuel Losada (Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica 1995; jubilado en 2006), ha sido dirigido desde sus comienzos por el Dr. Aurelio Serrano, Investigador Científico del CSIC. Está formado por personal perteneciente al CSIC y la Universidad de Sevilla: investigadores, profesores, becarios predoctorales y personal técnico. Desde su inicio, la labor investigadora del grupo ha sido financiada por los sucesivos Planes Nacionales de I+D+i y Programas de Proyectos de Investigación de la Junta de Andalucía, así como por diversos Proyectos de Cooperación Internacional europeos, nacionales y autonómicos. Las líneas de investigación se desarrollan con un enfoque multidisciplinar y están en gran medida relacionadas con el fosfato como compuesto clave en bioenergética. La labor investigadora del grupo en este área fue reconocida internacionalmente con la organización en 2001 del *2nd International Meeting on Inorganic Pyrophosphatases*, que tuvo lugar en el CIC-Cartuja de Sevilla, con la participación de los más destacados expertos sobre esta temática procedentes de Europa, Norteamérica y Japón, y de cuyo Comité Organizador fue Presidente el Dr. Serrano y Presidente Honorario el Profesor Losada. Desde entonces ha aumentado la visibilidad internacional del grupo, y se han establecido un número creciente de colaboraciones internacionales con grupos de trabajo relevantes en este campo.



Miembros del Grupo de Investigación Bioenergética del Fosfato en 2010. De izquierda a derecha: Isabel Jiménez (personal técnico), José R. Pérez-Castiñeira, Aurelio Serrano, Gloria Serrano-Bueno, Rosana Herrera, Ilham Mardad (becaria AECID) y Agustín Hernández.

Las líneas de trabajo que se desarrollan actualmente van dirigidas a esclarecer las relaciones estructura-función en H^+ -PPasas, la optimización de su expresión heteróloga en sistemas modelo mediante quimeras con diversos péptidos señal, y la realización de estudios de genómica funcional con sPPasas y H^+ -PPasas, con énfasis en su posible relación con la proliferación celular y tolerancia a estrés. El significado fisiológico de las Na^+ -PPasas, una nueva clase de PPasas de membrana, recientemente descubierta en procariotas de hábitats salinos, y su posible implicación en tolerancia a salinidad, es un tema de creciente interés para nuestro grupo. Ya que estas Na^+ -PPasas procarióticas tienen homólogos identificados por nuestro grupo en protistas fotosintéticos marinos de diversos grupos filogenéticos, la generación de una fuerza Na^+ -motriz a expensas del PPI podría ser un mecanismo de transducción de energía común a microorganismos pro- y eucarióticos. La validación funcional de estas nuevas Na^+ -PPasas eucarióticas, y su significado fisiológico y posible ori-

gen evolutivo por transferencia génica horizontal, son actualmente objeto de estudio por nuestro grupo.

Finalmente, hay que resaltar el creciente interés del metabolismo del PPI y las H^+ -PPasas en biomedicina: I) los bifosfonatos son análogos estructurales del PPI no hidrolizables por las PPasas que se emplean en el tratamiento del cáncer y diversas enfermedades óseas, y II) estudios recientes indican que las H^+ -PPasas se encuentran en diversos protistas parásitos, entre ellos los agentes causantes de enfermedades epidémicas muy graves como la malaria y la enfermedad del sueño. Los estudios sobre estas proteínas de membrana, en particular la determinación de sus estructuras tridimensionales, ayudarán de forma decisiva al diseño de fármacos eficaces contra estas enfermedades y, en este sentido, mantenemos colaboraciones con la Univ. de Copenhagen (DK) y el *Imperial College* (RU) por un lado, y con la Universidad de Athens (EE.UU.) y el Instituto de Parasitología y Biomedicina del CSIC por otro.

REFERENCIAS

- Perez-Castiñeira JR, López-Marqués RL, Losada M y Serrano A. (2001). A thermostable K⁺-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. FEBS Lett 496, 6-11.
- Perez-Castiñeira JR, Gómez-García R, López-Marqués RL, Losada M y Serrano A. (2001). Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones? Int Microbiol 4: 135-142.
- Perez-Castiñeira JR, Alvar J, Ruiz-Perez LM y Serrano A. (2002). Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa. Biochem Biophys Res Comm 294: 567-573.
- Sittenfeld A, Mora M, Ortega JM, Albertazzi F, Cordero A, Roncel M, Sánchez E, Vargas M, Fernández M, Weckesser J y Serrano A. (2002). Characterization of a photosynthetic *Euglena* strain isolated from an acidic hot mud pool of a volcanic area of Costa Rica. FEMS Microbiol Ecol 42: 151-161.
- Perez-Castiñeira JR, López-Marqués RL, Villalba JM, Losada M y Serrano A. (2002). Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H⁺-translocating pyrophosphatases. Proc Nat Acad Sci USA 99: 15914-15919.
- Serrano A, Pérez-Castiñeira JR, Baltscheffsky H y Baltscheffsky M. (2004). Proton-pumping inorganic pyrophosphatases in some Archaea and other extremophilic prokaryotes. J Bioenerg Biomemb 36: 127-133.
- Gómez García R, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanoska D y Serrano A. (2004). A novel calcium-dependent inorganic pyrophosphatase from the trypanosomatid *Leishmania major*. FEBS Lett 560: 158-166.
- López-Marqués RL, Perez-Castiñeira JR, Losada M y Serrano A. (2004). Differential regulation of soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* provides insights into a pyrophosphate-based stress bioenergetics. J Bact 186: 5418-5426.
- Gómez-García MR, Losada M y Serrano A. (2006). A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. Biochem J 395: 211-221.
- Fourat L, Iddar A, Valverde F, Serrano A y Soukri A. (2007). Effects of oxidative and nitrosative stress on *Tetrahymena pyriformis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J Euk Microbiol 54: 338-346.
- Serrano A, Perez-Castiñeira JR, Baltscheffsky M y Baltscheffsky H. (2007). Proton-pumping inorganic pyrophosphatases: past, present and future. IUBMB Life 59: 76-83.
- Drake R, Serrano A y Pérez-Castiñeira JR. (2010). N-terminal chimeras with signal sequences enhance the functional expression and alter the subcellular localization of heterologous membrane-bound inorganic pyrophosphatases in yeast. Biochem J 426: 147-157.

Ecología, aplicaciones biotecnológicas y sistemática de protistas

Lucía Arregui¹, Pilar Calvo¹, Almudena Guinea², Mercedes Martín-Cereceda¹, Blanca Pérez-Uz¹, Humbert Salvadó² y Susana Serrano¹

Dirección del Grupo: Almudena Guinea y Susana Serrano

¹Departamento de Microbiología III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, y ²Departamento Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

La investigación sobre la sistemática y biología celular, especialmente los elementos citoesqueléticos y procesos morfogénicos en protozoos ciliados fue introducida en España, entre otros, por el profesor Dimas Fernández-Galiano que formó un extenso grupo de profesionales en el campo de la protozoología/protistología. El grupo contaba con una amplia experiencia y numerosos trabajos nacionales e internacionales en sistemática de protozoos/protistas cuando se inició en 1990 la que ha constituido nuestra línea prioritaria: el estudio de las comunidades microbianas, especialmente de protistas, en los sistemas de depuración de aguas residuales. Nuestro interés se ha centrado, durante estos años en la caracterización

de las poblaciones de protozoos/protistas, su estructura y función en los reactores biológicos de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y la relación con los factores físico-químicos y operacionales de las plantas. La función de esta comunidad microbiana en el sistema y su utilidad bioindicadora pueden aplicarse al control de la eficiencia y el estado del proceso. Puesto que en la actualidad existen diversos tipos de depuradoras, diseñadas, entre otros factores, en función de la cantidad y la naturaleza de los vertidos, es importante determinar las diferencias existentes en los parámetros biológicos que pueden ser aplicados en cada caso. Estos estudios se han llevado a cabo con la financiación de

De izquierda a derecha: Pilar Calvo, Mercedes Martín-Cereceda, Lucía Arregui, Blanca Pérez-Uz, Susana Serrano, Almudena Guinea (arriba) y Humbert Salvadó (arriba).



los Ministerios de Educación y Ciencia e Innovación y Tecnología, así como proyectos de la Comunidad Autónoma de Madrid y la Universidad Complutense, colaborando con diversas empresas del sector del agua en distintas comunidades autónomas (Canal de Isabel II-Madrid, EMASESA-Sevilla, Aguas de Valencia-EGEVASA- Valencia y Aguas de Barcelona-Barcelona) y con otras Universidades como la Universidad de Barcelona y la Universidad Politécnica de Valencia. En el año 2004, nuestro grupo fue reconocido como Grupo Consolidado de Investigación Complutense 910672 - Ecología, aplicaciones biotecnológicas y sistemática de protistas.

Se ha colaborado también en un Proyecto Europeo IBAES en el periodo 2002-2005 (HP3) (Workpackage: *Microorganisms of activated sludge. Contract nº EVK2-CT-2002-80009, Proposal nº EVK2-2002-00503*) financiado por EC 5th Framework Programme: "Energy, Environment and Sustainable Development" coordinado por el Department of Hydrobiology, Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University (Cracow, Poland).

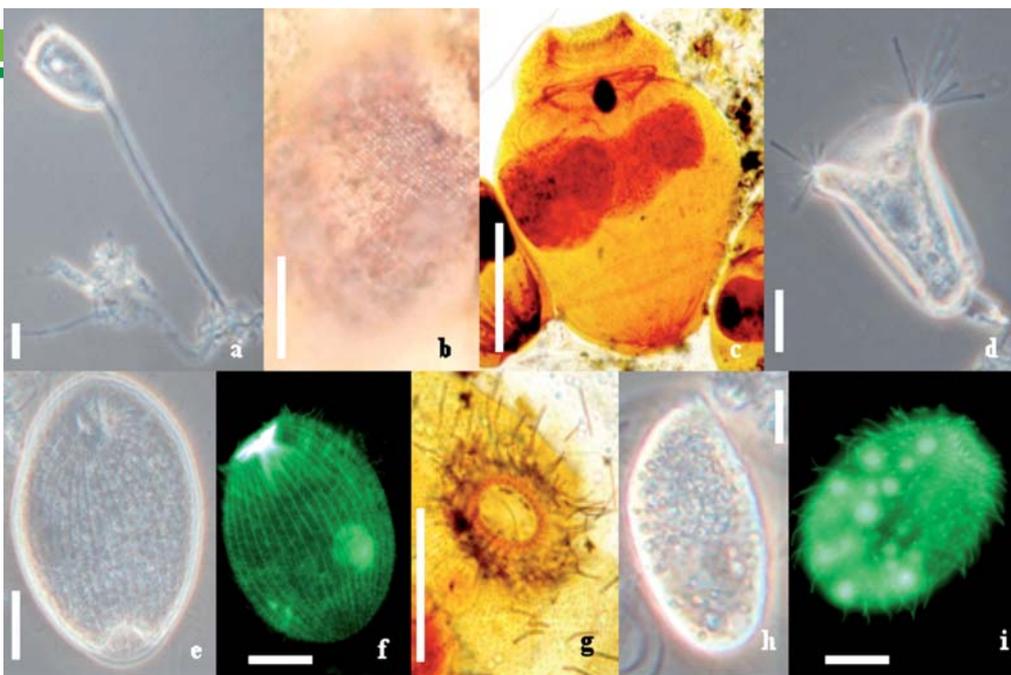
Las depuradoras de aguas residuales con sistemas de lodos activos se basan en el desarrollo de una comunidad microbiana estable que se mantiene en agregados o flóculos, formados fundamentalmente por bacterias, protistas y material polimérico extracelular, y que constituyen la unidad funcional del sistema. Nuestros primeros estudios se orientaron a la caracterización de la comunidad de protozoos en varias depuradoras convencionales de lodos activos de la Comunidad de Madrid. Para ello se realizaron seguimientos quincenales o mensuales del reactor, analizándose en el laboratorio las variaciones en los parámetros físico-químicos y biológicos de las depuradoras. El análisis comparativo de las muestras procedentes de EDAR con distintos vertidos y localización nos permitió determinar la composición de las comunidades de protistas características de este sistema y se plantearon los principales criterios para la identificación de las especies más frecuentes, proponiéndose algunos grupos o especies que podían relacionarse positiva o negativa-

mente con parámetros de control y eficacia de las plantas. Asimismo se publicó una guía de identificación de ciliados en plantas depuradoras.

Se estudiaron también otros tipos de EDAR de película fija como el sistema de contactores biológicos rotativos o biodiscos. Este sistema se basa en la actividad gradual de una comunidad microbiana que se desarrolla en forma de biopelículas sobre discos parcialmente sumergidos que rotan en contacto con el agua residual. Se analizó la variación de la estructura y distribución secuencial y espacial de las poblaciones de protistas en el sistema, lo cual permitió, además, la propuesta de bioindicadores relacionados con el funcionamiento de las plantas. Se realizaron también investigaciones sobre la estructura de la biopelícula y la distribución de células viables y no viables en la misma, resultados publicados en diferentes revistas internacionales.

Por otra parte, los ríos son los principales ecosistemas receptores de los efluentes de las estaciones depuradoras. Puesto que la calidad ecológica o sanitaria de los cauces receptores podría alterarse por la persistencia en los efluentes de bacterias o protistas y sólidos en suspensión, nuestro grupo investigó el impacto de los efluentes de las EDAR en el río Guadarrama. En general, salvo la descarga directa sobre el río de efluentes o vertidos incontrolados, el río presenta una capacidad de autodepuración adecuada para su recuperación tras el vertido. Los efluentes no ocasionan una alteración significativa de los parámetros físico-químicos. Sin embargo, sí se produce un incremento en la abundancia de ciertas especies características de depuradoras. Se detectaron además ciertos grupos bacterianos que se descargaban junto con el efluente y que potencialmente podrían dañar la calidad del agua.

Tradicionalmente, la presencia de protistas, especialmente ciliados, se consideraba esencial para la obtención de efluentes de calidad, principalmente por su actividad trófica sobre las poblaciones bacterianas y la eliminación de bacterias patógenas o potencialmente patógenas del licor mezcla.



Ciliados representativos de los reactores biológicos de EDAR. a-c Peritricos: a. *Vorticella convallaria*. Contraste de fases, b. estructura cortical de *Pseudovorticella* con tinción de Klein, c. tinción de carbonato de plata de *Epistylis*, d. *Acineta tuberosa* (sector), contraste de fases, e-i. Prostomátidos: e-f. *Holophryateres* "in vivo" y con tinción Flutax, g. Detalle de la zona oral con tinción de carbonato de plata de *Holophrya ovum*, h-i. *Plagiocampa rouxi* "in vivo" y con tinción de Flutax. Escala = 25 micrometros.

Según nuestros resultados, estos organismos participan además activamente en la formación de los flóculos mediante procesos de secreción activa y sus actividades biológicas. Así mismo, se determinó que la depredación de ciliados bacterívoros sobre bacterias depende tanto del tamaño como del contenido C:N. Se publicó además un libro en la International Water Association (IWA) titulado "Guidelines for the identification of ciliates in wastewater treatment plants" en el que se recoge la metodología de estudio e identificación de los ciliados en las EDAR.

El desarrollo de nuevas estrategias para la eliminación de nutrientes (P y N) en depuradoras con el sistema de lodos activos, supone la compartimentalización del reactor biológico en tres fases: aeróbica, anóxica y anaeróbica, que permiten no sólo la eliminación de materia orgánica, sino también de fósforo y nitrógeno del agua residual, lo cual evitaría problemas de eutrofización en las aguas que reciben los efluentes de las depuradoras. En colaboración con empresas del sector de las aguas (EMASESA y EGEVASA) y el grupo de bioindicación de Sevilla (GBS), se realizó un estudio sobre la estructura, composición y dinámica de los microorganismos implicados en estos procesos, en especial de las comunidades de protistas y bacterias nitrificantes. En este proyecto, desarrollado entre los años 2009 y 2011, se estudiaron plantas con capacidad de eliminar N y/o P en tres depuradoras con distinta localización geográfica, comparándose la estructura de la comunidad con las descritas para sistemas convencionales de lodos activos. Se han encontrado diferencias significativas en la estructura de ambas biocenosis siendo, en este caso, las poblaciones de flagelados y amebas un componente de la comunidad estable, con una relevancia tanto en abundancia como en frecuencia de aparición. Los ciliados, más abundantes en sistemas convencionales, representan en estos sistemas las poblaciones más diversas. Las relaciones entre los parámetros físico-químicos y biológicos permitieron la propuesta de parámetros biológicos de control. Se ha elaborado un capítulo de revisión sobre este tipo de

EDAR titulado "Progresses on the knowledge about the ecological function and structure of the protists community in activated sludge wastewater treatment plants" en el libro "Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology".

En el futuro se pretende estudiar un sistema más reciente de lodos activos, los reactores biológicos con sistemas de membrana (MBR), que permiten además de la eliminación biológica de contaminantes, la posible reutilización de aguas, ya que se obtienen efluentes de alta calidad. En este sentido hemos presentado recientemente un proyecto coordinado a la convocatoria del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011 del Ministerio de Ciencia e Innovación (Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental) titulado "Análisis integrado de biorreactores de membranas, identificación de las fuentes de contaminación, microbiología del proceso, medidas de prevención, reducción y control del ensuciamiento de las membranas" compuesto por cinco subproyectos de las Universidades Politécnica de Valencia (Subproyectos IP: 1. Alonso Molina, José Luis López, 2. María Fernanda Pérez, 3. María Antonia Ferrús Pérez) Universidad de Barcelona (Subproyecto IP 4. Humbert Salvadó Cabré) y Universidad Complutense de Madrid (Subproyecto IP 5. Susana Serrano Barrero). El coordinador del proyecto propuesto es Susana Serrano Barrero de la Universidad Complutense de Madrid.

Durante los últimos años hemos realizado también estudios sobre ecología y sistemática de protistas en otros medios acuáticos distintos a los sistemas de depuración de aguas residuales, en concreto en medios marinos. En estos medios, se han caracterizado en detalle especies poco conocidas o controvertidas, al tiempo que se han puesto de manifiesto las complejas e interesantes interacciones tróficas existentes entre los protistas del plancton marino. En este sentido se han mantenido relaciones de colaboración con el Natural History Museum (Londres) donde tanto la Dra. Martín-Cereceda como la Dra. Pérez-Uz trabajaron y desarrollaron investigaciones sobre ecología y procesos de depre-

dación desarrollados por protistas marinos. Recientemente, se ha iniciado una línea paralela en estequiometría ecológica de protistas de medios acuáticos en colaboración con entidades internacionales, en especial con la Universidad de Kansas, Lawrence, EEUU (Dr. Val Smith), en donde la Dra. Martín-Cereceda es investigadora asociada. Se ha iniciado además una colaboración con el Dr. Jordan Okie de la Universidad de Nuevo Mexico (EEUU). Esta investigación conjunta es altamente integradora y pretende estudiar la ecofisiología y estequiometría de orgánulos intracelulares y endosimbiontes en protistas con distintas líneas evolutivas.

ALGUNAS PUBLICACIONES REPRESENTATIVAS DEL GRUPO

- Arregui L, Muñoz-Fontela C, Serrano S, Barasoain I, y Guinea A. (2002). Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliated protozoa with a fluorescent taxoid. *J Euk Microbiol* 49: 312-318.
- Arregui L, Linares M, Pérez-Uz B, Serrano S y Guinea A. (2007). Contribution of ciliates to the floc formation: extracellular polymeric substances in axenic cultures of *Tetrahymena thermophila*. *Int Microbiol* 10: 91-96.
- Arregui L, Pérez-Uz B, Zornoza A, Serrano S. (2010). A new species of the genus *Metacystis* (Ciliophora, Prostomatida, Metacystida) from a Wastewater Treatment Plant. *J Euk Microbiol* 57: 362-368.
- Arregui L, Pérez-Uz B, Salvado H y Serrano S. (2010). Progresses on the knowledge about the ecological function and structure of the protists community in activated sludge wastewater treatment plants. *Curr Res, Technol Educ Top Appl Microbiol Microbial Biotech*; A. Mendez-Vilas (Ed.) Volume 2 ISBN: 978-84-614-6195-0.
- Fernández-Galiano D. (1994). The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa of sewage (and other) waters. *Water Res* 28: 495-496.
- Martín-Cereceda M, Serrano S y Guinea A. (1999). Description of *Opisthonecta matiensis*, sp.n. (Protozoa, Ciliophora) a new peritrich ciliate from wastewater. *J Euk Microbiol* 46: 283-289.
- Martín-Cereceda M, Serrano S y Guinea A. (1996). A comparative study of ciliated protozoa communities in activated sludge plants. *FEMS Microbiol Ecol* 21: 267-276.
- Martín-Cereceda M, Zamora J, Pérez-Uz B y Guinea A. (2002). Ciliate communities of rotating biological contactor biofilms: A multivariate approach. *Sys Appl Microbiol* 25: 301-313.
- Martín-Cereceda M, Pérez-Uz B y Guinea A. (2010). Marine phytoplanktonic protists in the nano-size range: taxonomy and trophic interactions. Chapter 6 pp. 189-211. *New Oceanography Research Developments: Marine Chemistry, Ocean Floor Analyses and Marine Phytoplankton*. ISBN: 978-1-60876-341-2 (Louis Martorino and Karl Puopolo (Eds.) Nova Science Publishers, Inc.
- Pérez-Uz B. (1996). Bacterial Preferences and Growth Kinetics Variation on *Uronema marinum* and *Uronema nigricans* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Microb Ecol* 31: 189-198.
- Pérez-Uz B, Arregui L, Calvo P, Salvado H, Fernández N, Rodríguez E, Zornoza A y Serrano S. (2010). Assessment of advanced wastewater treatments for nitrogen removal searching for plausible efficiency bioindicators. *Water Res* 44: 5059-5069.
- Serrano S, Arregui L, Perez-Uz B, Calvo P y Guinea A. (2008). Guidelines for the Identification of Ciliates in Wastewater Treatment Plants Ref. IWA Publishing Co. United Kingdom.

Identificación y caracterización de nuevas estrategias terapéuticas para el control de las enfermedades protozoarias

Dolores González Pacanowska y Luis M. Ruiz Pérez

Dpto. Bioquímica y Farmacología Molecular;
IPBLN-CSIC, Parque Tecnológico de la Salud, 18100-Armilla (Granada)

Nuestro Grupo de Investigación (BIO199) esta considerado por el Plan Andaluz de Investigación como grupo consolidado desde 1991. El principal objetivo de nuestras actividades es la búsqueda de nuevos tratamientos para las enfermedades protozoarias tropicales y los proyectos del laboratorio están centrados en procesos que presentan interés por su aplicabilidad al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas aunque abarcan aspectos básicos relacionados con la biología de parásitos protozoos. El grupo de investigación está integrado en consorcios internacionales destinados al descubrimiento de nuevos fármacos, actividad que

es necesariamente una iniciativa multidisciplinar y que implica a químicos, farmacólogos, biólogos estructurales y expertos en la bioquímica y biología celular del patógeno. Esta actividad colaborativa ha dado lugar al diseño de nuevos inhibidores basados en el conocimiento de la estructura de las proteínas diana que junto con la información de la relación estructura-actividad han permitido desarrollar un elevado número de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria. En la actualidad el grupo está compuesto por 11 personas que incluyen científicos de plantilla, becarios predoctorales, postdoctorales y técnicos.

Determinados procesos metabólicos y enzimas presentan características singulares en protozoos parásitos que son explotables en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades protozoarias de gran impacto. En particular existe una necesidad de nuevas moléculas capaces de inhibir el crecimiento de especies de los géneros *Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma*, agentes causales de enfermedades protozoarias como la malaria, la leishmaniasis o la tripanosomiasis africana y americana, que afectan a millones de personas y para las que no existe tratamiento eficaz.

La actividad del grupo se centra en tres rutas metabólicas de elevado potencial terapéutico:

- La biosíntesis de esteroides
- El metabolismo de pirimidinas
- La reparación del DNA por escisión de bases

BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES EN PARÁSITOS PROTOZOOS DE LA FAMILIA TRYPANOSOMATIDAE

Cabe destacar la especial susceptibilidad que presentan los tripanosomátidos a inhibidores de la biosíntesis de esteroides por lo que algunos de estos compuestos están en fase de ser aplicados en la clínica. Hemos establecido que la ruta de biosíntesis de esteroides exhibe en parásitos protozoos una serie de características singulares. Las propiedades cinéticas, la localización intracelular y la función biológica de enzimas como la HMGCoA reductasa (17), farnesil difosfato sintetasa (15), escualeno sintasa (20) y una enzima específica de la síntesis de ergosterol (un esteroide exclusivo de tripanosomátidos), la 24 esteroide metil transferasa (10) difieren significativamente de las del hospedador mamífero. Hemos determinado que la HMGCoA reductasa de *Leishmania* y *Trypanosoma* constituye el único ejemplo de enzima eucariótica soluble que se localiza de forma preponderante en la mitocondria. La HMGCoA sintasa también presenta en estos organismos una localización mitocondrial mientras que la mevalonato quinasa es glicosomal, lo que plantea la existencia de una compartimentalización intracelular singular (5). Los esfuerzos para desarrollar inhibidores específicos que puedan tener una utilidad en el tratamiento de la enfermedad se ha desarrollado en el marco de dos proyectos europeos de cooperación internacional coordinados por nuestro grupo. Estos estudios han permitido identificar nuevos cabezas de serie y un conjunto de compuestos con enorme potencial leishmanicida y antichagásico (4, 8, 14).

EL METABOLISMO DE PIRIMIDINAS

En relación con la síntesis de pirimidinas, nuestro objetivo era explorar la posibilidad de inhibir de forma específica distintas enzimas de *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* con respecto a los

ortólogos humanos. Estos organismos dependen de la síntesis de novo de pirimidinas para su supervivencia e inhibidores de esta ruta han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas y el cáncer, lo que constituye una muestra de su interés terapéutico. Concretamente, hemos realizado estudios destinados a identificar nuevos inhibidores de las enzimas dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (11, 19), timidilato quinasa (22) y timidina quinasa como potenciales agentes para el tratamiento de las enfermedades producidas por tripanosomátidos y *Plasmodium*.

Especial atención ha recibido en nuestro laboratorio la enzima desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa (3). Los inhibidores de esta familia de proteínas presentan interés como antitumorales o antivirales y dado que pueden actuar de forma sinérgica con antifolatos, el grupo abordó la identificación y caracterización de proteínas con capacidad para hidrolizar el dUTP en protozoos. Como resultado de estos estudios, hemos identificado una nueva familia de proteínas en tripanosomátidos que hidrolizan el dUTP y que se ha denominado **dUTPasas diméricas**, careciendo de homología de secuencia y estructura con dUTPasas típicas eucarióticas triméricas (2, 6). Sabemos que las enzimas diméricas son el resultado de un proceso de evolución convergente o transferencia génica, están presentes en determinados fagos, tripanosomátidos (como únicos representantes eucarióticos) y en diversas eubacterias (12). La resolución de la estructura de la dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* (9) constituyó el primer ejemplo de estructura tridimensional de esta clase de enzimas y reveló un nuevo modelo de plegamiento para proteínas que unen nucleótidos. Todo ello ha permitido la identificación de una nueva superfamilia de proteínas, las todo- α nucleótido hidrolasas, que está ampliamente distribuida en la naturaleza (12). Recientemente, hemos caracterizado la dUTPasa trimérica de *Plasmodium falciparum* y se han identificado inhibidores altamente selectivos con respecto a la enzima humana (1, 13). La resolución de la estructura de un complejo enzima-inhibidor ha dado lugar a información que ha sido esencial para el establecimiento de las bases moleculares de la inhibición y ha permitido el desarrollo racional de nuevos análogos de nucleósidos del uracilo con actividad antimalárica (23).

REPARACIÓN DEL DNA POR ESCISIÓN DE BASES

En relación con la presencia de uracilo en el DNA, estamos llevando a cabo múltiples estudios relacionados con mecanismo de reparación del DNA por escisión de bases (BER) en *Leishmania* y *Trypanosoma* (7, 16, 18, 21). Reviste especial interés el papel de BER en la protección a agentes alquilantes y oxidantes y la caracterización y determinación de la función de las enzimas AP endonucleasa y uracil glicosilasa en la respuesta a estrés oxidativo y la preservación de la integridad genómica.

En la actualidad nuestra actividad sigue centrada en el estudio de las características peculiares de enzimas implicadas en la interconversión y homeostasis de pirimidinas en

protozoos. Por otra parte, seguiremos explorando, desde una perspectiva innovadora y utilizando la información contenida en el genoma-proteoma, aspectos novedosos relacionados con las rutas de síntesis *de novo* y recuperación de bases y el control de la inserción de uracil en el DNA. Por otra parte, queremos identificar el papel del control de los niveles de dUTP y de la reparación por escisión de bases en la integridad genética mediante el empleo de técnicas de knock-out y silenciamiento génico y el análisis de la naturaleza y la frecuencia de mutaciones. Este tipo de estudios se están realizando en *Trypanosoma brucei*, un protozoo donde se pueden realizar con relativa facilidad experimentos de genética reversa. Por otra parte, una actividad mayoritaria del grupo es la búsqueda de potenciales inhibidores de las dUTPasas diméricas de tripanosomátidos. Esta iniciativa constituye un proyecto europeo coordinado por nuestro grupo (Trypobase, GA 223238).

PUBLICACIONES RECIENTES Y REPRESENTATIVAS

- BO Baragana, McCarthy, P Sanchez, C Bosch-Navarrete, M Kaiser, R Brun, J L Whittingham, S M Roberts, X X Zhou, K S Wilson, N G Johansson, D Gonzalez-Pacanowska y I H Gilbert. (2011). β -Branched acyclic nucleoside analogues as inhibitors of *Plasmodium falciparum* dUTPase. *Bio Med Chem* 19: 2378-2391.
- V Abernier-Villamor, Camacho, F Hidalgo-Zarco, J Perez, L M Ruiz-Perez y D Gonzalez-Pacanowska. (2002). Characterization of deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Let* 526: 147-150.
- AF Camacho, Hidalgo-Zarco, V Bernier-Villamor, LM Ruiz-Perez y D Gonzalez-Pacanowska. (2000). Properties of *Leishmania major* dUTP nucleotidohydrolase, a distinct nucleotide-hydrolysing enzyme in kinetoplastids. *Biochem J* 346: 163-168.
- SB Cammerer, C Jimenez, S Jones, L Gros, SO Lorente, C Rodrigues, JC Rodrigues, A Caldera, LM Ruiz Perez, W da Souza, M Kaiser, R Brun, JA Urbina, D Gonzalez Pacanowska y IH Gilbert. (2007). Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics. *Ant Ag Chem* 51: 4049-4061.
- J Carrero-Lerida, G Perez-Moreno, VM Castillo-Acosta, LM Ruiz-Perez y D Gonzalez-Pacanowska. (2009). Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol* 39: 307-314.
- VM Castillo-Acosta, AM Estevez, AE Vidal, LM Ruiz-Perez y D Gonzalez-Pacanowska. (2008). Depletion of dimeric all-alpha dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in *Trypanosoma brucei*. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2901-2913.
- C Gallego, AM Estevez, E Farez, LM Ruiz-Perez y D Gonzalez-Pacanowska. (2005). Overexpression of AP endonuclease protects *Leishmania major* cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol* 141: 191-197.
- L Gros, SO Lorente, CJ Jimenez, V Yardley, L Rattray, H Wharton, S Little, SL Croft, LM Ruiz-Perez, D Gonzalez-Pacanowska y IH Gilbert. (2006). Evaluation of azasterols as anti-parasitics. *J Med Chem* 49: 6094-103.
- M Harkiolak, EJ Dodson, V Bernier-Villamor, JP Turkenburg, D Gonzalez-Pacanowska y KS Wilson. (2004). The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold. *Structure* 12: 41-53.
- Jimenez-Jimenez C, J Carrero-Lerida, M Sealey-Cardona, LM Ruiz Perez, JA Urbina y D Gonzalez Pacanowska. (2008). Delta24(25)-sterol methyltransferase: intracellular localization and azasterol sensitivity in *Leishmania major* promastigotes overexpressing the enzyme. *Mol Biochem Parasitol* 160: 52-59.
- S Khahnadideh, D Pez, A Musso, R Brun, LM Perez, D Gonzalez-Pacanowska y IH Gilbert. (2005). Design, synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazolines as inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. *Bio Med Chem* 13: 2637-2649.
- OV Moroz, M Harkiolaki, MY Galperin, AA Vagin, D Gonzalez-Pacanowska y KS Wilson. (2004). The crystal structure of a complex of *Campylobacter jejuni* dUTPase with substrate analogue sheds light on the mechanism and suggests the "basic module" for dimeric d(C/U)TPases. *J Mol Biol* 342: 1583-1597.
- C Nguyen, GF Ruda, A Schipani, G Kasinathan, I Leal, A Musso-Buendia, M Kaiser, R Brun, LM Ruiz-Perez, BL Sahlberg, NG Johansson, D Gonzalez-Pacanowska y IH Gilbert. (2006). Acyclic nucleoside analogues as inhibitors of *Plasmodium falciparum* dUTPase. *J Med Chem* 49:4183-4195.
- S Orenes Lorente, R Gomez, C Jimenez, S Cammerer, V Yardley, K de Luca-Fradley, SL Croft, LM Ruiz Perez, J Urbina, D Gonzalez Pacanowska y IH Gilbert. (2005). Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. *Bio Med Chem* 13: 3519-3529.
- Ortiz-Gomez, C Jimenez, AM Estevez, J Carrero-Lerida, LM Ruiz-Perez y D Gonzalez-Pacanowska. (2006). Farnesyl diphosphate synthase is a cytosolic enzyme in *Leishmania major* promastigotes and its overexpression confers resistance to risedronate. *Euk Cell* 5: 1057-1064.
- J Pena-Diaz, M Akbari, O Sundheim, ME Farez-Vidal, S Andersen, R Sneve, D Gonzalez-Pacanowska, HE Krokan y G Slupphaug. (2004). *Trypanosoma cruzi* contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair. *J Mol Biol* 342: 787-799.
- J Pena-Diaz, A Montalvetti, CL Flores, A Constan, R Hurtado-Guerreiro, W De Souza, C Gancedo, LM Ruiz-Perez y D Gonzalez-Pacanowska. (2004). Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the *Trypanosomatidae*. *Mol Biol Cell* 15: 1356-1363.
- J Perez, C Gallego, V Bernier-Villamor, A Camacho, D Gonzalez-Pacanowska y LM Ruiz-Perez. (1999). Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nuc Acid Res* 27: 771-777.
- D Pez, I Leal, F Zuccotto, C Boussard, R Brun, SL Croft, V Yardley, LM Ruiz Perez, D Gonzalez Pacanowska y IH Gilbert. (2003). 2,4-Diaminopyrimidines as inhibitors of Leishmanial and Trypanosomal dihydrofolate reductase. *Bio Med Chem* 11: 4693-4711.
- M Sealey-Cardona, S Cammerer, S Jones, LM Ruiz-Perez, R Brun, IH Gilbert, JA Urbina y D Gonzalez-Pacanowska. (2007). Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Ant Ag Chem* 51: 2123-2129.
- AE Vidal, M Harkiolaki, C Gallego, VM Castillo-Acosta, LM Ruiz-Perez, K Wilson y D Gonzalez-Pacanowska. (2007). Crystal structure and DNA repair activities of the AP endonuclease from *Leishmania major*. *J Mol Biol* 373: 827-838.
- JL Whittingham, J Carrero-Lerida, JA Brannigan, LM Ruiz-Perez, AP Silva, MJ Fogg, AJ Wilkinson, IH Gilbert, KS Wilson y D Gonzalez-Pacanowska. (2010). Structural basis for the efficient phosphorylation of AZT-MP (3'-azido-3'-deoxythymidine monophosphate) and dGMP by *Plasmodium falciparum* type I thymidylate kinase. *Biochem J* 428: 499-509.
- JL Whittingham, I Leal, C Nguyen, G Kasinathan, E Bell, AF Jones, C Berry, A Benito, JP Turkenburg, EJ Dodson, LM Ruiz Perez, AJ Wilkinson, NG Johansson, R Brun, IH Gilbert, D Gonzalez Pacanowska y KS Wilson. (2005). dUTPase as a platform for antimalarial drug design: structural basis for the selectivity of a class of nucleoside inhibitors. *Structure* 13: 329-338.

Biología celular y molecular del estrés microbiano: los ciliados como modelo

Juan Carlos Gutiérrez y Ana Martín-González

Dpto. Microbiología-III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid (UCM).

C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid

El Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid tiene una larga trayectoria en la utilización de protozoos ciliados como modelos microbianos. Dicha trayectoria se inició con el Prof. Dimas Fernández-Galiano (hacia 1961), manteniéndose activa desde entonces. El grupo que actualmente se denomina “Estrés microbiano y contaminación ambiental”, surge a raíz de la incorporación del Dr. Juan Carlos Gutiérrez, tras obtener una plaza de Profesor Titular de Universidad, allá por el año 1987. Desde entonces, han pasado por nuestro grupo numerosos estudiantes que han llevado a cabo sus trabajos de tesis y obtenido el grado de doctor, para luego completar su formación científica fuera de nuestro país o en otras instituciones nacionales. Algunos de ellos han logrado, posteriormente, una posición estable como profesor universitario. Como reflejo de la propia vida, el número de miembros del grupo ha cambiado a lo largo del tiempo, y su aspecto actual se muestra en la fotografía adjunta. Desde el inicio, el grupo ha sido dirigido por los profesores Juan Carlos Gutiérrez y Ana Martín-González.

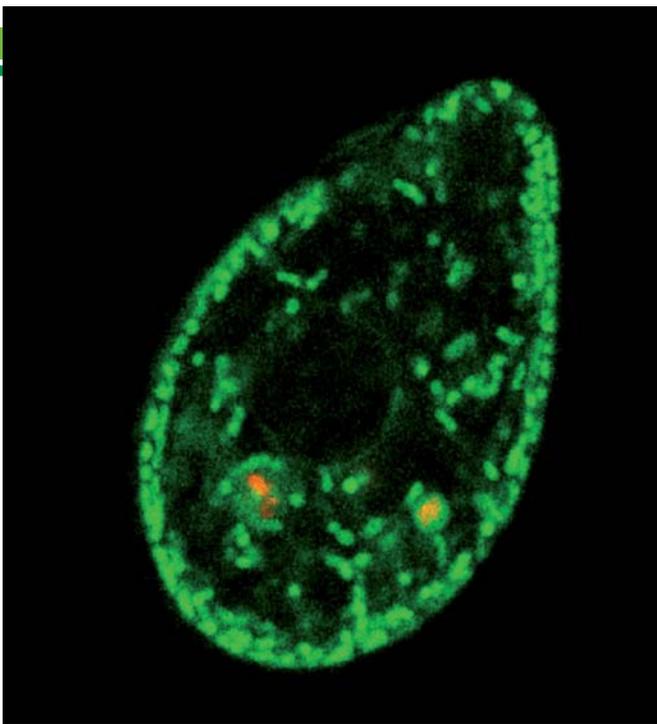
Uno de los mecanismos que presentan los microorganismos para solventar el problema de la ausencia de nutrientes (estrés nutricional), es llevar a cabo un complejo proceso de diferenciación celular (esporulación / enquistamiento) que culmina con la aparición de un estado criptobiótico o quies-

cente (espora / quiste) en el cual puede permanecer de manera indefinida, hasta la aparición de condiciones óptimas (nutrientes) para volver al ciclo crecimiento-división. Una de las líneas de investigación que nuestro grupo ha desarrollado durante una primera etapa (aproximadamente 9 años), ha sido el estudio del proceso de enquistamiento en ciliados. Los avances obtenidos por el grupo sobre este proceso de diferenciación microbiana le han proporcionado reconocimiento internacional y ser un grupo de referencia sobre el tema.

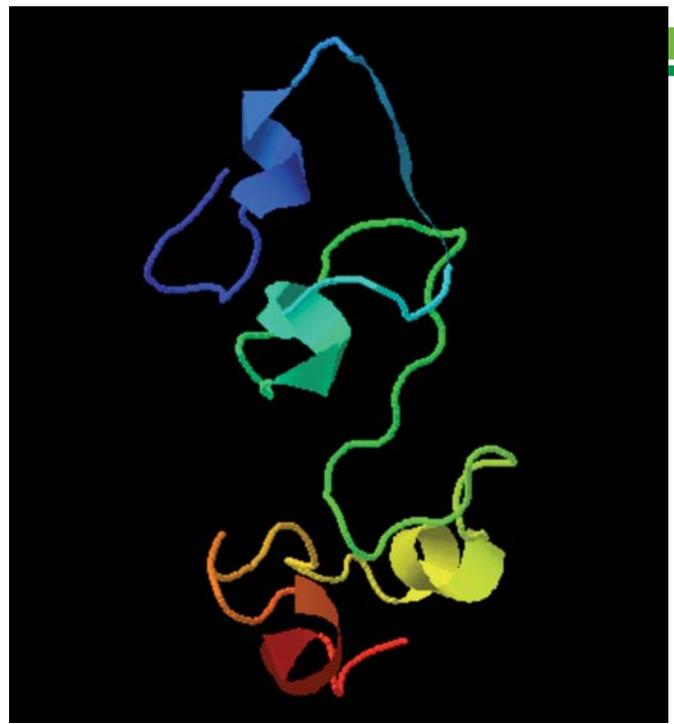
Las contribuciones más importantes que el grupo ha ofrecido a la comunidad de ciliatólogos sobre este tema las podemos resumir en los siguientes puntos: 1- El establecimiento de una cinética del proceso de enquistamiento, utilizando como marcador el grado de maduración de la pared quística, tras usar anticuerpos anti-pared. 2- Un modelo de cinética de aparición de precursores de pared quística y ensamblaje de las diferentes capas que la forman. 3- Una mayor profundización en el conocimiento de la composición bioquímica y molecular de los constituyentes de la pared quística, destacándose la detección y estudio de manoproteínas y la considerable riqueza de residuos de glicina en las proteínas que la componen. 4- El análisis de la condensación cromatínica-macronuclear que tiene lugar durante el enquistamiento, destacándose la detección de formación de cristales poligonales de cromatina, lo que constituye uno de los modelos



Miembros actuales del grupo (de izquierda a derecha): Ana Martín-González (Prof. Titular de Universidad), Juan Carlos Gutiérrez (Catedrático), Silvia Díaz (Prof. Ayudante Doctor), Guillermo Rodríguez (alumno interno), Liliana Cubas y Patricia de Francisco (becarias).



Disminución del potencial de membrana mitocondrial (detectado por el fluoróforo JC-1), originado tras la exposición a Cd^{2+} ($1,7 \mu\text{M}$) durante 24h. En la micrografía se muestra una célula de *T. thermophila* en la que las mitocondrias (principalmente localizadas en la periferia celular) muestran fluorescencia verde ($\sim 1.000\times$).



Estructura 3D de la Cd-metalotioneína TtheMTT1 de *T. thermophila*, inferida de la secuencia aminoacídica. La estructura muestra dos regiones globulares (correspondientes a los extremos N- y COOH-terminales) separadas por una región lineal, cuyo conjunto recuerda a la forma "Yo-Yo" típica de las metalotioneínas de otros organismos.

de condensación cromática eucariota *in vivo* menos conocido, al igual que el aislamiento y análisis de un ADNc codificante de una proteína con una caja HMG (*high mobility group*) involucrada en la condensación del ADN. 5- La obtención y análisis de genotecas de expresión a partir de quistes maduros y poblaciones prequísticas, cuyo análisis nos ha permitido conocer y corroborar muchos de los elementos moleculares y rutas metabólicas involucradas en el proceso de enquistamiento. Los quistes maduros guardan en su citoplasma moléculas de ARNm, ya derivados de transcripciones prequísticas o bien potencialmente útiles en el proceso de exquistamiento. 6- La elaboración de un modelo integrado del proceso de enquistamiento en ciliados, confeccionado a partir de todos los aspectos analizados tanto por el grupo como por otros autores.

El rendimiento de esta línea se traduce en unos 40 trabajos publicados (contando a partir de la creación del grupo) en revistas internacionales de la especialidad, de los cuales 8 son revisiones. Estos trabajos fueron financiados por 6 proyectos de investigación procedentes de diversas entidades, uno de los cuales fue un proyecto europeo, cuya coordinación estuvo a cargo de nuestro grupo.

La segunda línea, igualmente ligada al estrés celular, que nuestro grupo ha desarrollado simultáneamente con la primera (durante unos años) y que continúa hasta la actualidad, nace de una colaboración en un proyecto ("Desarrollo de técnicas analíticas para microorganismos y metales pesados en lodos") que se desarrolla entre 1997-99. A partir de este

proyecto, iniciamos una nueva línea sobre el estudio molecular y celular de la respuesta estrés desencadenada por la presencia de metales pesados en protozoos ciliados, y más concretamente en el ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*. Las principales contribuciones que el grupo ha aportado a la comunidad científica sobre este tema se podrían resumir en los siguientes puntos: 1- Aplicación de la citometría de flujo en los ensayos de ecotoxicidad de metales en diversas especies de protozoos aislados de ecosistemas acuáticos o edáficos. 2- Identificación, utilizando diferentes fluoróforos, de la existencia de bioacumulación de metales en diferentes especies de ciliados, como mecanismo de resistencia a estos agentes tóxicos. 3- Detección y estudio de la existencia de estrés oxidativo inducido por metales en protozoos ciliados. 4- Aislamiento, caracterización y análisis de la expresión de genes que codifican metalotioneínas (MTs) en especies del género *Tetrahymena*. Nuestro grupo ha contribuido con la identificación de 5 nuevos genes que codifican tanto CdMTs (MTs que unen preferentemente Cd^{2+}) como CuMTs (MTs que unen preferentemente Cu^+). 5- Creación de dos subfamilias de MTs en ciliados con valor taxonómico y filogenético, e introducción de un modelo que podría explicar, en base a su estricta estructura modular y submodular, la historia evolutiva de estas proteínas altamente conservadas. 6- Existencia de procesamiento postranscripcional del ARNm codificante para la MT TtheMTT5, que determina su posible localización intracelular dependiendo del proceso celular en la que está involucrada (conjugación, respuesta a estrés inducido por meta-

les, etc). 7- Desarrollo de biosensores celulares basados en la utilización de los promotores de MTs (*TtheMTT5* y *TtheMTT1*) fusionados con la luciferasa como gen reportero. Estos biosensores, tras su validación usando muestras naturales acuáticas o edáficas, han resultado ser los más sensibles para la detección de determinados metales respecto de aquellos elaborados con células procariotas o eucariotas. La patente nacional de ambos biosensores está actualmente tramitándose. 8- Un análisis cuantitativo (qRT-PCR), bajo muy diversas condiciones de estrés (incluyendo metales), de la expresión de genes codificantes de glutation-S-transferasas (GSTs), lo que nos ha revelado que estos genes (un total de 63 isoformas en *T. thermophila*) se conducen como “ecoparálogos” que responden diferencialmente a diversas condiciones de estrés. 9- El descubrimiento en un protozoo de vida libre como *T. thermophila* de la existencia de tripanotio (N^1, N^8 -bis(glutathionil)-espermidina = $T(SH)_2$), molécula antioxidante descubierta en 1985 en protozoos parásitos (tripanosomátidos), y que se creía exclusiva de este grupo de protozoos parásitos que presentan un metabolismo tiólico muy particular, y en los cuales el glutathion (GSH) está ausente. Aunque la coexistencia de ambos tipos tiólicos (GSH y $T(SH)_2$) se ha descrito en otros dos protistas (*Euglena gracilis*, flagelado fotosintético, y la ameba potencialmente patógena *Naegleria fowleri*), ésta es la primera vez en que se detecta y analiza la actividad tripanotio sintética en un protozoo ciliado no parásito. 10- Caracterización y análisis de la expresión de un gen codificante de Fitoquelatina sintasa (FQS) en *T. thermophila* que no sintetiza fitoquelatinas, estando más bien involucrado en la hidrólisis del GSH. 11- Los metales pesados inducen apoptosis en *T. thermophila*, y este proceso apoptótico es muy similar al que ocurre en mamíferos, el cual incluye; degradación parcial de ADN-macronuclear con formación de cuerpos apoptóticos macronucleares, cambios drásticos a nivel de membrana con liberación de fosfatidilserina, liberación de Ca^{2+} mitocondrial y alteraciones en su potencial de membrana, activación de caspasas (iniciadoras y ejecutora), expresión de metacaspasas y endonucleasas-G. La obtención de cepas “knockout” en ambos genes *EndoG1* y *EndoG2* han mostrado la necesidad de ambas enzimas en la degradación controlada de ADN-macronuclear, durante la apoptosis inducida por metal.

Esta segunda línea (actualmente en progreso) ha rendido (desde su inicio, 1999) un total de 20 artículos publicados en revistas internacionales, de los cuales 3 son revisiones. Estos trabajos se han financiado con 8 proyectos concedidos por diversas entidades.

A lo largo de todos estos años hemos establecido colaboraciones y/o proyectos conjuntos con diversos grupos, nacionales e internacionales, entre los primeros cabe destacar la colaboración con los siguientes investigadores: Dra. C. Ascaso (Instituto de Ciencias Medioambientales, CSIC), Dr. LM Ruiz-Pérez (Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC), Dra. S. Atrian (Universidad de Barcelona), Dr. E. Torres (Universidad de la Coruña), entre otros. Y entre los segundos, destacamos a los siguientes investigadores: Dr. E. Orias (Universidad de California, EEUU), Dr. AP. Turkewitz (Uni-

versidad de Chicago, EEUU), Dr. D. Chalker (Universidad de Washington, EEUU), Dr. S. Ottonello (Universidad de Parma, Italia), Dra. G. Sergejeva (Instituto de Citología, Rusia), Dr. A. Viarengo (Universidad de Alessandria, Italia), entre otros.

Simultáneamente a las dos principales líneas de investigación, antes descritas, el grupo ha llevado a cabo, de forma puntual, otros proyectos o actividades, tales como el estudio de los protozoos del suelo (colpodidos) como bioindicadores de desertización, o el de los microfósiles de protistas incluidos en ámbar del Cretácico inferior y la secuenciación masiva de minicromosomas del genoma-macronuclear de ciliados esticotricos.

Como hemos mostrado en este breve resumen sobre la actividad de nuestro grupo, estamos abiertos a la elaboración de proyectos conjuntos y colaboraciones con todos aquellos grupos de microbiólogos que trabajen con protistas u otros microorganismos o bien, que estén interesados en algunos de los aspectos (incluyendo técnicas) o líneas en que el grupo trabaja.

PUBLICACIONES RECIENTES SELECCIONADAS

- Gallego A, Martín-González A, Ortega R y Gutiérrez JC. (2007). Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. Chemosphere. 68: 647-661.
- Díaz S, Amaro F, Rico D, Campos V, Benítez L, Martín-González A, Hamilton EP, Orias E y Gutiérrez JC. (2007). *Tetrahymena* metallothioneins fall into two discrete subfamilies. PLoS ONE. 2(3): e291. doi:10.1371/journal.pone.0000291.
- Martín-González A, Wierzchos J, Gutiérrez JC, Alonso J y Ascaso C. (2008). Morphological stasis of protists in lower cretaceous amber. Protist 159: 251-257.
- Gutiérrez JC, Martín-González A, Díaz S, Amaro F, Ortega R, Gallego A y de Lucas MP. (2008). Ciliates as cellular tools to study the eukaryotic cell-heavy metal interactions. En: Heavy Metal Pollution. S.E. Brown & W.C. Welton (Eds.). Nova Publishers. (EEUU). ISBN: 978-1-60456-899-8.
- Amaro F, de Lucas MP, Martín-González A y Gutiérrez JC. (2008). Two new members of the *Tetrahymena* multi-stress-inducible metallothionein family: Characterization and expression analysis of *T. rostrata* Cd/Cu metallothionein genes. Gene 423: 85-91.
- Rico D, Martín-González A, Díaz S, de Lucas MP y Gutiérrez JC. (2009). Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. Comp Biochem Physiol Part C 149: 90-96.
- Martín-González A, Wierzchos J, Gutiérrez JC, Alonso J y Ascaso C. (2009). Double fossilization in eukaryotic microorganisms from lower cretaceous amber. BMC Biology 7:9 doi: 10.1186/1741-7007-7-9.
- Amaro F, Ruotolo R, Martín-González A, Faccinni A, Ottonello S y Gutiérrez JC. (2009). A pseudo-phytochelatin synthase in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. Comp Biochem Physiol Part C 149: 598-604.
- Gutiérrez JC, Amaro F y Martín-González A. (2009). From heavy metal-binders to biosensors: Ciliate metallothioneins discussed. BioEssays 31: 805-816.
- Amaro F, Turkewitz AP, Martín-González A y Gutiérrez JC. (2011). Whole-cell biosensors for detection of heavy metal ions in environmental samples based on metallothionein promoters from *Tetrahymena thermophila*. Microb Biotechnol doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00252.x.

Aplicabilidad de las microalgas en estudios de contaminación de sistemas acuáticos

Ángeles Cid Blanco

Grupo Microalgae. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña. Campus de A Zapateira s/n. 15071 A Coruña

BIENSAYOS DE TOXICIDAD CON MICROALGAS

La contaminación de los ecosistemas naturales ha estado siempre presente en la vida del hombre, en mayor o menor medida. Dada la importancia del agua en la salud pública, la creciente polución de los ambientes acuáticos como consecuencia de la rápida industrialización, el uso intensivo de pesticidas en la agricultura, y el elevado consumo de fármacos constituye una importante amenaza para la vida en nuestro planeta. Debido a que tanto la cantidad como la calidad del agua afectan a la salud y el bienestar de las poblaciones, en los últimos tiempos ha crecido el interés por la monitorización de los potenciales riesgos, tanto biológicos como químicos, del agua.

Los microorganismos, en general, y las microalgas, en particular, se utilizan como indicadores biológicos de la contaminación en estudios ecotoxicológicos, en los que se pretende determinar la relación entre la cantidad de compuesto químico a la que el organismo está expuesto y la naturaleza y grado de sus efectos perjudiciales. La relación dosis-respuesta proporciona la herramienta necesaria para el análisis de los potenciales peligros que presentan los productos químicos para el medio ambiente. Para cuantificar la toxicidad de un compuesto se puede recurrir a diferentes parámetros,

y el más utilizado es la mortalidad o el crecimiento, pero también es frecuente utilizar efectos fisiológicos, bioquímicos, a nivel de población o comunidad, etc.

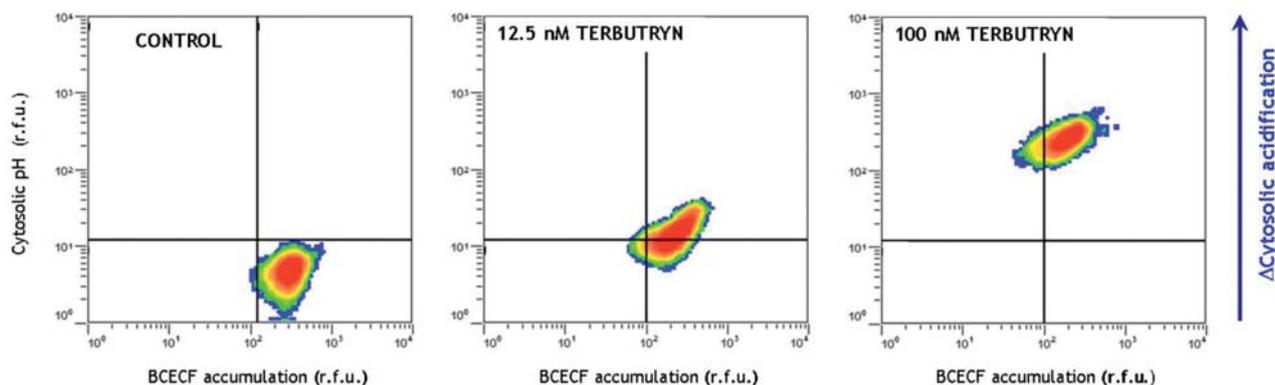
La utilización de células enteras presenta como ventaja evidente el que puedan detectar toda una serie de reacciones complejas que sólo pueden existir en una célula intacta metabólicamente activa. La citómica se define como el estudio de los fenotipos moleculares de las células individuales en combinación con una exhaustiva extracción informática del conocimiento así obtenido, y como disciplina tiene como objetivo el conocimiento del diseño molecular y la funcionalidad de los citomas mediante el análisis célula a célula. Algunas técnicas citómicas que, a través de la fluorescencia, estudian la célula individual en su complejidad se agrupan en torno al concepto metodológico de la citometría de flujo (CMF), que permite cuantificar simultáneamente varios parámetros biológicos en la misma célula a gran velocidad, evitando la pérdida de información que caracteriza a otras metodologías en las que se obtienen valores promedios a partir del análisis a nivel poblacional de un número elevado de células.

Durante el desarrollo de proyectos anteriores de nuestro equipo de investigación, financiados por la Xunta de Galicia y el Plan Nacional de I+D, hemos estudiado mediante análisis citómico la interacción xenobiótico-microalga que nos ha permitido la caracterización mecánica de los efectos de algunos contaminantes sobre las células vivas. Los resultados obtenidos justifican la utilización de diferentes especies de microalgas como modelos biológicos sensibles en estudios ecotoxicológicos ya que, combinadas con las técnicas utilizadas, permiten evaluar parámetros globales como la bio-disponibilidad de los contaminantes, cuestión íntimamente asociada a la toxicidad de los mismos.

En nuestros proyectos en fase de desarrollo, pretendemos abordar la utilización de las microalgas en la detección y monitorización de diferentes contaminantes frecuentes en los sistemas dulceacuícolas (metales, pesticidas y fármacos), aplicando técnicas citómicas puestas a punto en nuestro laboratorio y que permiten detectar la respuesta rápida de estos microorganismos a distintos niveles celulares (viabilidad celular, potencial de membrana citoplasmático y mitocondrial, pH intracelular, calcio intracelular libre, nivel de



Cultivos de la microalga dulceacuícola *Chlorella vulgaris*.



Efecto inmediato de la adición del herbicida terbutrina sobre el pH intracelular de *Chlorella vulgaris* analizado por citometría de flujo.

estrés oxidativo, diversas actividades enzimáticas, autofluorescencia).

Los bioensayos con microalgas realizados en laboratorio pueden contribuir a dar una información muy valiosa sobre los efectos de estos contaminantes (a concentraciones medioambientalmente relevantes) y la dirección o asesoramiento ambiental, que tendrían en estos organismos un temprano y adecuado sistema de alarma para que se pudieran tomar decisiones que permitieran prevenir tales efectos. A largo plazo, el avance en el conocimiento de cómo afectan diferentes contaminantes que llegan a los ecosistemas acuáticos puede contribuir a desarrollar una legislación medioambiental más acorde con los problemas actuales de contaminación de estos ecosistemas.

EL GRUPO MICROALGAE

El grupo “Estudio y aplicaciones de las microalgas” (Acrónimo: MICROALGAE) actualmente está inscrito en el catá-

logo de grupos de investigación de la Universidad de A Coruña y de la Xunta de Galicia. El grupo fue creado por Concepción Herrero a principios de los años 90, momento en el que nacía la Universidad de A Coruña, a partir del Colegio Universitario dependiente de la Universidad de Santiago de Compostela. Este grupo lo conforman hoy dos catedráticos de universidad (Concepción Herrero y Julio Abalde), una profesora titular de universidad (Ángeles Cid, actual coordinadora del grupo), un profesor contratado doctor (Enrique Torres), un profesor asociado a tiempo parcial (Pablo Fidalgo), una ayudante doctora (Carmen Rioboo), una contratada postdoctoral (Raquel Prado) y dos técnicos de laboratorio (Rosa García y Dora Franco), además de estudiantes de máster y doctorado.

La investigación inicial del grupo se centraba en la mejora de los cultivos de diferentes especies de microalgas, fundamentalmente marinas, para su aplicación en los sistemas de acuicultura o la obtención de productos de alto valor económico, como el carotenoide astaxantina. Dentro



Algunos miembros del grupo (de izquierda a derecha): Dora Franco, Raquel Prado, Rosa Díaz, Carmen Rioboo y Ángeles Cid.

de esta línea de investigación se han defendido 5 tesis doctorales a lo largo de estos 20 años. Hoy en día, la principal línea de investigación del grupo se centra en el estudio de la respuesta de las células microalgales a situaciones de estrés provocadas por la presencia de contaminantes en el medio. En esta línea de investigación se han defendido 6 tesis doctorales y otras 2 se encuentran en fase de desarrollo.

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN VIGENTES

- “Detección y monitorización de contaminantes en medios acuáticos mediante análisis de parámetros de respuesta rápida de microalgas dulceacuícolas” (08MDS020103PR) (Consellería de Innovación, Industria e Comercio de la Xunta de Galicia). IP: Ángeles Cid
- “*Chlamydomonas reinhardtii* como modelo biológico para el estudio de los mecanismos involucrados en la acción tóxica de los herbicidas tipo triazina” (CGL2010-15993/BOS) (Ministerio de Ciencia e Innovación). IP: Ángeles Cid

SELECCIÓN DE PUBLICACIONES RECIENTES

- González-Barreiro O, Rioboo C, Herrero C y Cid A. (2006). Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. *Environ Pol* 144: 266-271.
- Rioboo C, Prado R., Herrero C y Cid A. (2007). Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aqua Toxicol* 83: 247-253.
- Prado R, Díaz R, Rioboo C, Herrero C, Abalde J y Cid A. (2009). Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environ Int* 35: 240-247.
- Folgar S, Pérez-Rama M, Cid A, Abalde J, Herrero C y Torres E. (2009). *Dunaliella salina* a marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium. *J Hazard Mat* 165: 486-493.
- Prado R, Rioboo C, Herrero C y Cid A. (2009). The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere* 76: 1440-1444.
- Rioboo C, O'Connor JE, Prado R, Herrero C y Cid A. (2009). Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions. *Aqua Toxicol* 94: 229-237.
- Prado R, Rioboo C, Herrero C y Cid A. (2011). Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: induction of chlorosis. *Aqua Toxicol* 102: 10-17.

Dinoflagelados tóxicos marinos: Aspectos ecológicos, sanitarios y filogenéticos

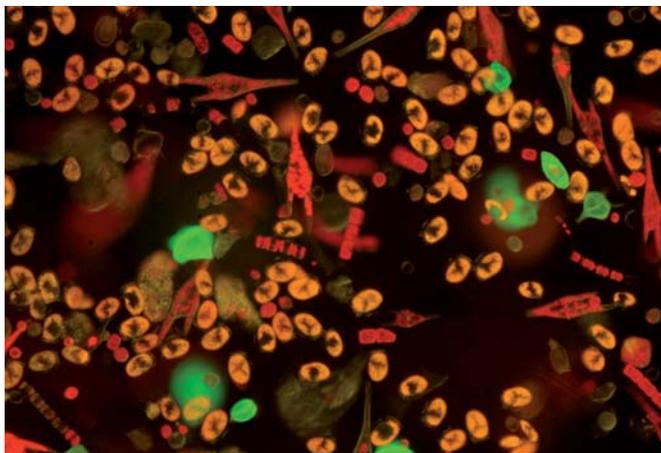
Irma Marín¹ y Beatriz Reguera²

¹Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Edificio de Biología. c/ Darwin 2. Cantoblanco, 28049 Madrid. irma.marin@uam.es

²Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo. Aptdo 1552. 36200 Vigo. beatriz.reguera@vi.ieo.es

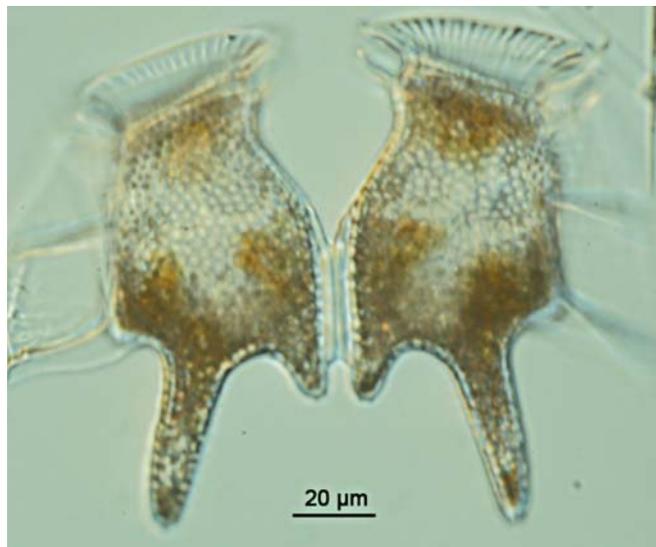
El término *Harmful Algal Blooms* (HAB) o Floraciones Algales Nocivas (FANs en lo sucesivo) fue acuñado por la UNESCO en la década de los 90 para denominar cualquier proliferación de microalgas, independientemente de su concentración, que fuera percibida como un daño por el hombre. Se trata, pues, de un término socio-económico que abarca eventos causados por un amplio espectro de grupos microalgales. Con la excepción de las floraciones de cianobacterias, principales causantes de contaminación por ficotoxinas en los suministros de agua potable, el resto de las FANs están constituidas por proliferaciones de microalgas —eucariotas unicelulares— que forman parte de comunidades microbianas marinas planctónicas y bentónicas.

Hasta la fecha se han identificado al menos 100 especies de microalgas marinas productoras de distintas clases de toxinas que causan mortandades de organismos marinos, irritaciones respiratorias y cutáneas, o que se transfieren a través de la cadena trófica hasta el hombre, constituyendo un riesgo para la salud pública. La “Lista de Especies Tóxicas” (<http://www.marinespecies.org/hab/index.php>) incluye 13 especies de diatomeas, 9 haptofitas, 7 rafidofíceas, 2 dictyocofíceas, y 73 dinoflagelados. Esta gran diversidad de especies va asociada a una diversidad de las condiciones ambientales —específicas de especie (o incluso de cepa)— que promueven su crecimiento óptimo (nicho ecológico), por lo que se debe evitar caer en generalizaciones simplistas tales



Muestra de campo viva (arrastre de red, 100 X) observada al microscopio de epifluorescencia.

Dinophysis acuminata tienen autofluorescencia color naranja por su contenido en ficoeritrinas. Ría de Pontevedra, Octubre de 2007.



Micrografía de campo claro (400X) de *Dinophysis caudata* aislados de la costa de Galicia.

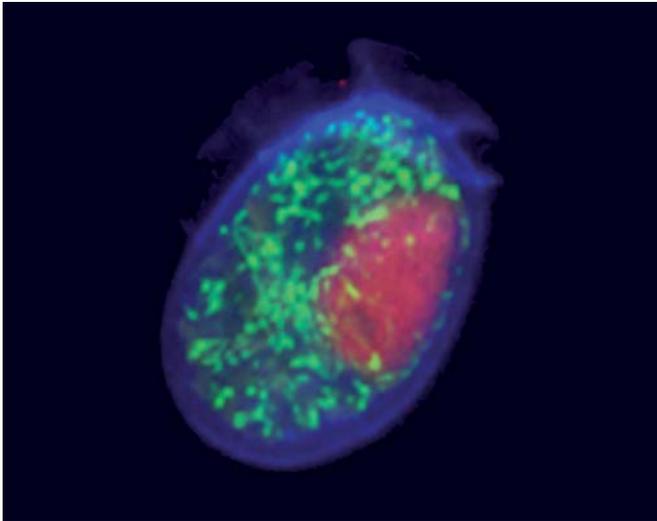
como “hay un incremento global en la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de floraciones algales nocivas”.

Entre las FANs productoras de toxinas que se transfieren a través de la cadena trófica, las de especies productoras de toxinas amnésicas (diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*), neurotoxinas paralizantes (dinoflagelados *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* y distintas especies del género *Alexandrium*), y sobre todo las productoras de toxinas diarreas (dinoflagelados del género *Dinophysis*), constituyen el principal riesgo natural para la explotación de bivalvos en la Unión Europea, cuyas directivas exigen a los países-miembro el establecimiento de costosos programas de seguimiento (*monitoring*) de la presencia de especies potencialmente tóxicas y sus toxinas en las zonas de cultivo. Cada vez que la concentración de toxinas en los bivalvos explotados comercialmente alcanza niveles superiores a los de regulación —establecidos en las directivas europeas— las autoridades sanitario-pesqueras imponen vedas o cierres de extracción del producto que implican cuantiosas pérdidas económicas para el sector marisquero/acuicultor. El objetivo último de los investigadores es alcanzar el desarrollo de modelos acoplados físico-biológicos que permitan aplicar los avances de la oceanografía operacional a la aparición de los eventos tóxicos. Dicho de forma más sencilla: desarrollar sistemas de alerta temprana que avisen a los usuarios finales sobre el inicio, desarrollo y mantenimiento de las floraciones de microalgas nocivas como si de un servicio meteorológico se tratara. Esto requiere un conocimiento sólido de la biología —taxonomía, ciclo de vida, variabilidad morfológica y genética, dinámica de poblaciones— y de las interacciones físico-biológicas de las especies diana con la hidrodinámica local.

El grupo de *Fitoplancton Tóxico* del Instituto Español de Oceanografía (IEO) en Vigo —cuyos orígenes se remontan

al año 1977, tras el primer caso de intoxicación paralizante por bivalvos gallegos— ha llevado a cabo proyectos de investigación y control de fitoplancton potencialmente tóxico en las costas gallegas entre 1977 y 1991. En este período se consiguieron importantes avances en la identificación taxonómica y toxinológica de las especies problema, así como de las condiciones ambientales asociadas a su proliferación. A partir de 1992, el control en aguas costeras pasó a ser competencia del gobierno de la Xunta de Galicia, y desde entonces el grupo dedica todos sus esfuerzos al desarrollo de proyectos centrados en la biología, fisiología y dinámica de poblaciones de especies de interés, financiados por diversos programas del plan nacional y de la Unión Europea.

Desde la identificación en 1980 del dinoflagelado *Dinophysis fortii* como el responsable de las intoxicaciones diarréogénicas por bivalvo en el noreste de Japón, las especies *Dinophysis* se convirtieron en diana para los programas de seguimiento de fitoplancton potencialmente tóxicos. Desde el punto de vista científico, *Dinophysis* planteaba considerables retos a los investigadores. El género incluye especies heterótrofas y especies fotótrofas en las que destaca su contenido en ficoeritrinas —pigmentos dominantes en cianobacterias, criptofíceas y en el ciliado *Myrionecta rubra* (antes *Mesodinium rubrum*)—. No obstante, durante muchos años los esfuerzos por establecer cultivos de especies pigmentadas de *Dinophysis* resultaron infructuosos lo que llevó a sospechar que se trataba de especies mixótrofas, es decir, organismo capaces de obtener energía metabólica tanto a partir de la fotosíntesis (fototrofia), como de la digestión de otros organismos (heterotrofia). Para el personal especializado en observar poblaciones de *Dinophysis* “*in vivo*”, una de las complicaciones a las que se enfrentan es la gran variabilidad en la morfología de su contorno celular (tamaño y forma de las grandes placas que forman su hipoteca) y de su conte-



Pictograma (CLMS) de hibridación *in situ* con sonda fluorescente (TSA-FISH) marcada con Alexa 488 dirigida a bacterias en el interior de *Dinophysis ovum*. En verde se observa la señal de hibridación, en rojo el núcleo teñido con yoduro de propidio y en azul la teca teñida con calcoflúor.



Miembros del Grupo de Fitoplancton Tóxico. De izquierda a derecha: Francisco Rodríguez (Investigador I+D), Pilar Rial (Ayudante de Investigación), Beatriz Reguera (Investigadora I+D) y Laura Escalera (contrato pre-doctoral).

nido. A lo largo de su temporada de crecimiento (que puede durar 6-7 meses en el caso de algunas especies costeras, tales como *D. acuminata* y *D. acuta*), las células pueden aparecer delgadas y con escaso contenido citoplasmático, o hinchadas, rojizas y repletas de vacuolas digestivas. La distribución de tallas de la población puede ser bimodal (células pequeñas y células grandes), unimodal (sólo células vegetativas “normales”) o un continuo de formas. Además, las poblaciones de *Dinophysis* pueden estar presentes todo el año en las zonas de cultivos marinos —pero en concentraciones ínfimas (< 20 cel/L) que escapan al nivel de detección de los controles rutinarios— y sólo en cortos períodos de tiempo, íntimamente relacionados con la hidrodinámica local, alcanzan concentraciones superiores a las 10^3 cel/L. A pesar de su escasez, se ha observado que unos pocos cientos de células por litro son suficientes para convertir a los bivalvos en no aptos para el consumo. Por todo ello, podemos definir las floraciones de *Dinophysis* como FANs de baja biomasa que, **sin formar “mareas rojas”** (tipo especial de FAN donde la excesiva proliferación de organismos pigmentados produce una coloración en el agua), transmiten toxinas a través de la cadena trófica.

La biología molecular se ha revelado como una poderosa herramienta en los estudios de filogenia, taxonomía molecular y biodiversidad del fitoplancton y ha permitido abrir nuevos caminos en situaciones donde las herramientas tradicionales de microscopía óptica y fisiología celular resultaban claramente insuficientes. En los últimos 10 años, varios expertos del grupo de Fitoplancton Tóxico del IEO-Vigo —en la actualidad, *Unidad Asociada CSIC-IEO de Fitoplancton Tóxico*— concentraron sus esfuerzos en distintos aspectos de la biología, dinámica de poblaciones y toxicología de las principales especies

de *Dinophysis* productoras de toxinas diarreicas en el noroeste Ibérico. El acercamiento entre el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y el IEO-Vigo a finales de los 90, permitió acometer retos pendientes combinando las valiosas herramientas moleculares desarrolladas en la UAM y los años de experiencia sobre estudios de campo del IEO-Vigo. Así comenzó una fructífera colaboración, amistosa primero y formalizada después durante el desarrollo de 3 proyectos de investigación (dos de ellos coordinados) del plan nacional de I+D: *DINOPHYSIS 2000* (1999-2002); *PHYCODISIS* (2003-2006) y el actual proyecto en curso *DIGEDINO* (2009-2012). Fue necesario desarrollar estrategias de muestreo apropiadas para poder concentrar las escasas células de campo de *Dinophysis* spp. y aislarlas por micromanipulación. Las incubaciones de ejemplares aislados suplieron la falta de cultivos de laboratorio y combinadas con observaciones de campo permitieron dilucidar el ciclo de vida de estas especies (¡consideradas hasta entonces carentes de procesos sexuales!) (Reguera & Gonzalez-Gil 2001; Escalera & Reguera 2008). Las técnicas moleculares aplicadas por la UAM, sobre una o pocas células, permitieron obtener los primeros resultados sobre secuencias del DNA ribosomal de distintas especies de *Dinophysis* de las costas gallegas (Marín et al. 2001a, b) al igual que los avances de la cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas permitieron determinar sus perfiles de toxinas (Pizarro et al. 2008). Estos estudios revelaron que las secuencias del rDNA no eran las más adecuadas para poder separar molecularmente las distintas especies de *Dinophysis* y que sería necesario explorar nuevas regiones del genoma. La secuencia del DNA mitocondrial (gen *cox1*) se reveló como una herramienta apropiada para separar *Dinophysis acuminata* (principal productor de toxinas diarreicas en Galicia) de una

especie muy próxima, *Dinophysis ovum*, responsable de eventos tóxicos en la costa suratlántica de Iberia, Golfo de México y Mar Egeo (Raho et al. 2008).

En 2006, un grupo de investigadores coreanos consiguió establecer cultivos mixótrofos de *Dinophysis acuminata* alimentados con el ciliado *Myrionecta rubra*, que a su vez era cultivado con adiciones de criptofíceas del género *Teulax*. Los *Dinophysis* cultivados han sido identificados como predadores secundarios y como mixótrofos obligados requiriendo luz y nutrientes para fotosintetizar, así como presa viva que fagocitan por mizocitosis. Estos resultados constituyeron un importante hito en los estudios de comportamiento nutricional de *Dinophysis* que obligó a replantearse muchas interpretaciones previas de los resultados de campo. Además, las técnicas de última generación de microscopía electrónica de transmisión, aplicadas a células individuales, han mostrado que en ocasiones es necesario recurrir a los estudios de ultraestructura para dilucidar si los orgánulos celulares observados corresponden a vacuolas digestivas (presa identificada por pigmentos y biología molecular) o a endosimbiosis en curso (Escalera et al. en prensa). A partir de 2006, se han ido estableciendo cultivos de nuevas especies de *Dinophysis* en nuestro país, tales como *D. acuta* en Huelva (Jaén et al. 2009) y *D. tripos* en Galicia (Rodríguez et al. 2010) y se ha allanado el camino para testar nuevas hipótesis sobre el comportamiento nutricional de *Dinophysis*, su ciclo de vida y producción de toxinas, y la posible existencia de una población de microorganismos acompañantes a las proliferaciones de *Dinophysis* (Raho et al. 2011a, b. Enviados). La utilización de cultivos de laboratorio de *D. acuta* está permitiendo estudiar el controvertido origen de los cloroplastos. Mediante métodos de biología molecular se ha determinado el origen de los cloroplastos presentes en células de *Dinophysis* alimentadas con distintos ciliados los cuales a su vez fueron alimentados con distintas criptofitas. Los resultados apoyan la hipótesis de un origen ancestral de los mismos (Raho et al. 2011a y b).

En la actualidad, además de seguir con los estudios que se han explicitado anteriormente estamos investigando la biodiversidad de protistas presentes en medios ambientes extremos, tanto ácidos como hipersalinos y aislando y caracterizando molecularmente algunas especies nuevas. Así mismo estudiamos la posible relación entre dinoflagelados y otros microorganismos que los acompañan en el crecimiento, producción de toxinas, etc. Y finalmente, estamos desarrollando nuevas herramientas moleculares para la identificación específica de dinoflagelados que son difícilmente identificables por los métodos conocidos.

ALGUNAS PUBLICACIONES RELEVANTES SOBRE DINOPHYSIS DE LOS DOS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

Escalera L & Reguera B. (2008). Planozygote division and other observations on the sexual cycle of several species of *Dinophysis* (*Dinophyceae*, *Dinophysiales*). *J Phycol* **44**: 1425-36.



Grupo UAM: De izquierda a derecha Nicolás Raho (contrato pre-doctoral), Ana Isabel Morato (Ayudante de Investigación), Carlotta Vizioli (contrato pre-doctoral), Irma Marín (Profesora Titular de Universidad) y Jose P. Abad (Profesor Titular de Universidad).

- Marín I, Aguilera A, Reguera B & Abad JP. (2001a). A method for preparation of DNA suitable for molecular biology applications from single cell of dinoflagelates. *Biotechniques* **30**(1): 88-93.
- Marín I, Aguilera A, González-Gil S, Reguera B & Abad JP. (2001). Genetic analysis of three species of *Dinophysis* causing diarrhetic shellfish outbreaks in Galicia (NW Spain). In: Hallegraeff, G. M., Blackburn, S. L., Bolch, C. J. & Lewis, R. J. [Eds.] *Harmful Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 222-25.
- Reguera B & González-Gil S. (2001). Small cell and intermediate cell formation in species of *Dinophysis* (*Dinophyceae*, *Dinophysiales*). *J Phycol* **37**: 318-33.
- Reguera B, González-Gil S & Delgado M. (2007). *Dinophysis diegensis* is a life history stage of *Dinophysis caudata* (*Dinophyceae*, *Dinophysiales*). *J Phycol* **43**: 1083-93.
- Reguera B & Pizarro G. (2008). Planktonic dinoflagellates which produce polyether toxins of the old "DSP Complex". In: Botana, L. M. [Ed.] *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. 2nd ed. CRC Press, London. 798 pp., pp. 257-84.
- Pizarro-Nova G, Escalera L, González-Gil S, Franco JM & Reguera B. (2008). Growth, behaviour and cell toxin quota of *Dinophysis acuta* Ehrenberg during a daily cycle. *Mar Ecol Progr Ser* **353**: 89-105.
- Raho N, Pizarro G, Escalera L, Reguera B & Marín I. (2008). Morphology, toxin composition and molecular analysis of *Dinophysis ovum* Schütt, a dinoflagellate of the "Dinophysis acuminata complex" *Harmful Algae* **7**: 839-848.
- Raho N, Jaén D, Mamán L, Rial P & Marín I. (2011a). Molecular analysis of chloroplasts of *Dinophysis acuta* from Huelva (Spain) chloroplasts fed with different cryptophytes. Enviado *J Phycol*
- Raho N, Rodríguez F, Reguera B & Marín I. (2011b). Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (*Dinophyceae*) from single cell analysis of mitochondrial *cox1* gene. Enviado a *Harmful Algae*.



CECT, año 2010

Esperanza Garay. Directora de la CECT

I. SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

Como continuación de la certificación obtenida en 2004 según la norma ISO 9001:2000 y más adelante según la norma ISO 9001:2008 para “la preparación, venta y distribución de cultivos microbianos (bacterias, hongos y levaduras)”, la CECT ha superado satisfactoriamente las auditorías de seguimiento y renovación hasta la fecha, manteniendo así su certificación.

II. INVESTIGACIÓN

Proyectos:

- La CECT ha participado en 3 proyectos nacionales y dos internacionales: Demonstration Project for a Global Biological Resource Centre Network GBRCN, (www.gbrcn.org) y European Consortium of Microbial Resource Centres EMbaRC (FP7-228310), (www.embarc.eu).
- Publicaciones, comunicaciones en congresos y reuniones científicas y dirección de Tesis Doctorales:** El personal de la CECT ha publicado 9 artículos en revistas, ha dirigido una Tesis Doctoral y ha participado en 5 reuniones o congresos científicos nacionales e internacionales.

III. FORMACIÓN

Cursos impartidos:

- La CECT ha impartido el Certificado de post-grado teórico-práctico (3 créditos): “Conservación y control de cepas microbianas”. XI edición (enero 2010).

Cursos de formación:

Entre los cursos recibidos por su personal destacan:

- “Seminario Agilent Technologies: Técnicas fundamentales de Cromatografía y Espectrometría de Masas” (Valencia), octubre 2010.
- “International Workshop: Sherlock Microbial Identification System Course Outline”, organizado por MIDI-Inc (Newark DE, USA), noviembre 2010.

IV. CONVENIOS VIGENTES CON EMPRESAS Y OTROS ORGANISMOS

Se ha renovado el Contrato de Asesoramiento Técnico entre la *Universitat de València – Estudi General* y el *Institut Valencià D'Art Modern - IVAM*, para el aislamiento e identificación de hongos en las pinturas e instalaciones de éste último.

Se mantienen los convenios con varias empresas para la distribución de las cepas procedentes de la CECT, y el “Memorandum of Understanding” entre la *Universitat de València* y el KRIBB (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology), que incluye a la KCTC (Korean Collection for Type Cultures).

Desde enero de 2011 la nueva dirección de la CECT es:

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)

Edificio 3 CUE. Parc Científic Universitat de València,

Catedrático Agustín Escardino, 9 • 46980 Paterna (Valencia)

V. SERVICIOS PRESTADOS

Depósitos con fines de patente como Autoridad Internacional:	46
Bacterias y arqueas	36
Hongos filamentosos y levaduras	10
Nuevas cepas en depósito público:	172
Bacterias y arqueas	161
Hongos filamentosos y levaduras	11
Nuevas cepas en depósito restringido:	2
Bacterias:	1
Hongos filamentosos y levaduras	1
Identificaciones:	58
Bacterias y arqueas	35
Hongos filamentosos y levaduras	23
Cepas liofilizadas y otros servicios por encargo:	7
Bacterias y arqueas	2
Hongos filamentosos y levaduras	3
Otros	2
Cepas suministradas (*):	3808
Cepas suministradas a laboratorios, empresas y centros españoles:	3466
Cepas enviadas a países extranjeros:	342
Alemania:	11
Austria:	6
Bélgica:	12
Bulgaria:	3
Canadá:	4
Chequia:	1
Chile:	25
China:	30
Corea del Sur:	37
EEUU:	13
Francia:	51
Holanda:	8
India:	2
Irlanda:	1
Italia:	24
Japón:	17
Méjico:	21
Noruega:	2
Perú:	10
Portugal:	40
Reino Unido:	19
Suiza:	2
Turquía:	1
Taiwán:	2

(*): Desde Junio de 2010 no se envían ya liófilos de comprobación sin coste, que antes se contabilizaban como cepas suministradas, lo que ha rebajado en 164 el número total.

VI. PERSONAL

Se ha mantenido el personal anterior y se ha contado con un Técnico de FP en formación desde enero y con un Técnico Medio desde enero hasta octubre.

(*) Más detalle sobre los proyectos y las publicaciones en la página web (www.cect.org)

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