

PRODUCCIÓN DE BIOETANOL: MEJORA DEL PROCESO A PARTIR DE GRANO DE CEREAL Y DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA TRATADA CON STEAM EXPLOSIÓN

Autor: Ángeles Martínez-Alcalá García.

Directores: María Jesús Martínez y Miguel Jurado.

Centro: Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo superior de Investigaciones Científicas.

El incremento de la población y el desarrollo industrial han contribuido a disminuir las reservas de petróleo y aumentar la contaminación ambiental. Por esta razón son necesarias energías alternativas, más respetuosas con el medioambiente, que permitan asegurar el abastecimiento.

El bioetanol puede ser una alternativa para el sector del transporte. Actualmente se produce a partir de caña de azúcar, remolacha o semillas de cereales (etanol de primera generación, 1G). Sin embargo, para evitar que su producción interfiera con la cadena alimentaria se está tratando de producir bioetanol de segunda generación (2G), a partir de biomasa lignocelulósica. En este trabajo se han abordado diferentes aspectos de los dos procesos, utilizando grano y paja de trigo, respectivamente.

Tras el estudio y caracterización de las actividades enzimáticas presentes en 15 cócteles comerciales, se seleccionaron los más idóneos para optimizar la producción de etanol 1G a partir de grano de trigo. A escala de laboratorio, se han encontrado cócteles pocos conocidos, con alta actividad específica, que pueden ser una alternativa más eficaz para la producción.

Por otra parte, los pretratamientos físico-químicos (*steam explosion*) que se utilizan para desestructurar el material lignocelulósico y permitir el acceso de las enzimas a los polisacáridos de la pared celular vegetal, generan inhibidores que afectan negativamente el rendimiento del proceso 2G. Se ha comprobado que las lacasas fúngicas (oxido-reductasas fúngicas implicadas en la degradación de la lignina) detoxifican la paja de trigo pretratada por *steam explosion* (en presencia de vapor de agua o ácido diluido), permitiendo un mayor crecimiento de las lavaduras e incrementando, entre 2 y 3 veces, la producción de etanol.

GENOMOTIPIFICACIÓN DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* MEDIANTE MICROARRAYS DE ADN. ANÁLISIS DE MARCADORES Y DIVERSIDAD GENÉTICA

Autor: Andrea Guridi Kortaberria.

Directores: Aurora Fernández-Astorga y Rodrigo Alonso Monsalve.

Centro: Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

Campylobacter jejuni es una de las principales causas de diarrea bacteriana a nivel mundial y el antecedente más común en neuropatías periféricas como el síndrome Guillain Barré y Miller Fisher.

La búsqueda de marcadores genéticos en *Campylobacter* ha sido un objetivo largamente perseguido en los últimos años para establecer estrategias eficaces de control y reducir la presencia de *C. jejuni* en la cadena alimentaria.

Debido a esto, la finalidad del trabajo fue determinar el grado de variabilidad (diversidad y/o posible plasticidad) genómica entre cepas de *Campylobacter jejuni* procedentes de diversas áreas geográficas y diferentes fuentes de aislamiento, al objeto de detectar posibles genes que puedan emplearse como marcadores genéticos.

Tras la determinación de las condiciones experimentales más adecuadas para la hibridación y elaboración de una colección multigeográfica de cepas no clonales según alelos de la región SVR del gen *flaA* y MLST, se realizó el análisis CGH utilizando *microarrays* de ADN que contienen el pan-genoma de *C. jejuni*.

En combinación con los métodos bayesianos de inferencia filogenética se trató de encontrar algún posible marcador genético vinculado tanto a un origen geográfico como a una fuente concreta. Según el análisis, las cepas de origen humano y pollo presentaron una alta similitud

en cuanto a su contenido genético, no detectándose ningún marcador de fuente de aislamiento. La única relación filogenómica encontrada entre las cepas estudiadas correspondió a los complejos clonales, encontrándose uno o varios genes claramente relacionados de manera exclusiva con un complejo clonal concreto.

Paralelamente, mediante estudios comparativos con el genoma de la cepa NCTC11168, determinamos que aproximadamente el 70 % de los genes presentaban un alto grado de conservación, definiéndose éstos como especie específicos de *C. jejuni*. La base principal de la variabilidad genética en *C. jejuni* se localizó en las regiones hipervariables descritas por otros autores y las dos nuevas regiones descritas en este trabajo. Además, la presencia de cuatro islas genómicas (CJIE) descritas en la cepa RM1221 y la posible adquisición de plásmidos contribuyeron también a la variabilidad genómica de nuestras cepas. En cuanto a la influencia geográfica, principalmente se apreció en la variabilidad genética global y/o en relación al porcentaje de hibridación según el origen de la sonda. Tal fue el caso de las cepas neozelandesas o el conjunto de cepas de origen no europeo que mostraron los porcentajes más altos de ausencia de genes accesorios y el caso de las cepas españolas, entre las cepas de origen europeo, en las que se observó el mayor porcentaje de variabilidad genética en cuanto a genes plasmídicos (pTet) e islas genómicas.

Por otro lado, la alta prevalencia de genes plasmídicos o fágicos asociados a las islas genómicas apoyan la hipótesis del origen plasmídico de la isla CJIE3 y del origen fágico de las islas CJIE1, CJIE2 y CJIE4. En estas últimas, el número de genes fágicos presentes varió según la isla, destacando CJIE4 como la isla con una pérdida más acusada de estos genes. Asimismo, la presencia de las islas genómicas en *C. jejuni* podría sugerir un papel biológico relacionado con la supervivencia. Tal es el caso de las islas que codifican nucleasas, ya que proporcionarían resistencia a la infección por fagos y, además, colaborarían en la estabilidad genética evolutiva, al interferir negativamente en la competencia natural de *C. jejuni*.

EDWARDSIELLA TARDA: PATÓGENO EMERGENTE EN EL CULTIVO DEL RODABALLO

Autor: Nuria Castro Iglesias.

Directoras: Alicia Estévez-Toranzo y Beatriz Magariños Ferro.

Centro: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología / CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela.

Edwardsiella tarda es bacteria gram negativa perteneciente a la familia de las Enterobacterias. Desde su primer aislamiento, a mediados del s. xx, ha sido descrita como causante de infecciones en un amplio abanico de organismos, entre los que se encuentran: reptiles, aves, anfibios, peces, mamíferos (tanto marinos como terrestres) e incluso humanos. Aunque su devastador efecto en los cultivos de peces ha sido descrito desde hace años, no ha sido hasta mediados de esta década cuando se ha convertido en uno de los patógenos importantes en los cultivos de rodaballo en Europa causando graves pérdidas económicas en la industria acuícola.

En esta tesis doctoral se ha realizado una amplia caracterización a nivel fenotípico, bioquímico, serológico y molecular de una colección de cepas de *E. tarda*, todas ellas aisladas de epizootias ocurridas en cultivos de rodaballo de diferentes áreas geográficas de Europa en los últimos años.

La caracterización bioquímica y fenotípica demostró que todas las cepas de *E. tarda* forman un grupo muy homogéneo, independientemente de su origen geográfico y hospedador. El análisis de ácidos grasos reveló también una alta homogeneidad para todas las cepas de *E. tarda*, aunque se comprobó que el medio de cultivo y la temperatura de incubación pueden influir en la composición de ácidos grasos. A nivel serológico sí pudieron establecerse diferencias dentro de la especie, constituyendo los aislados de rodaballo un grupo independiente del resto de aislados de *E. tarda* procedentes de otros hospedadores.

En cuanto a la caracterización molecular, a pesar de que todos los aislados de *E. tarda* de rodaballo mostraron un alta homogeneidad, se pudieron encontrar pequeñas diferencias intraespecíficas empleando las técnicas RAPD y REP-PCR. Además, en todas las cepas de rodaballo se detectó la

existencia de dos plásmidos, uno de 12 Kb, presente también en cepas procedentes de otros hospedadores, y otro de 2,5 Kb que parece ser específico de los aislados de rodaballo. Aunque mediante el análisis proteómico con la técnica MALDI-TOF no se pudieron establecer diferencias entre cepas en función de su hospedador, esta técnica puede ser una herramienta eficaz para la identificación de cepas de *E. tarda*.

Con respecto a las técnicas de diagnóstico de la enfermedad, se describieron dos protocolos de PCR, uno específico para *E. tarda* y otro de multiplex-PCR junto con *Tenacibaculum maritimum*, que resultaron altamente sensibles y específicos y aplicables tanto a nivel de laboratorio como de campo. También se evaluó un medio de cultivo selectivo-diferencial para el aislamiento de *E. tarda* resultando altamente eficaz para el diagnóstico de la edwardsiellosis y que podría llegar a ser de gran utilidad en estudios epidemiológicos del patógeno.

Los estudios de patogenicidad demostraron que esta bacteria representa un grave riesgo para el rodaballo, debido a su alto grado de virulencia independientemente de la ruta de inoculación y temperatura empleadas, siendo también patógena para otras especies como el lenguado y la lubina. Además, los aislados estudiados causaron mortalidades en animales homeotermos (ratones), con el consecuente riesgo de salud pública que ello podría suponer. Los resultados obtenidos en la búsqueda de genes implicados en la virulencia y en los ensayos de correlación genotipo-virulencia y genotipo-fenotipo parecen indicar que determinadas enzimas de degradación e invasivas pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la bacteria.

Por último, se desarrolló una vacuna adyuvantada con aceite no mineral la cual, administrada por vía intraperitoneal, confiere una tasa de protección frente a *E. tarda* en rodaballo superior al 90% durante, al menos, 6 meses.

ANÁLISIS GENÓMICO DE LA INTEGRIDAD CELULAR EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Autor: Patricia Arias López.

Directores: José Manuel Rodríguez Peña y Javier Arroyo Nombela.

Centro: Departamento de Microbiología II. Universidad Complutense de Madrid.

La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* es una estructura esencial para el mantenimiento de la integridad celular y protección de la célula frente al medio externo preservando su integridad osmótica. Así, cuando se produce un daño sobre esta estructura, la célula desarrolla un complejo mecanismo de respuesta mediado principalmente por la ruta de integridad celular (CWI), a través de la activación la MAPK Slt2. Este mecanismo implica, entre otros aspectos, la inducción de la expresión de genes necesarios para sobrevivir en estas circunstancias, entre ellos, destaca el gen *MLP1*.

Con el objetivo de identificar, a escala genómica, genes de la levadura cuya delección conduce a la activación de la ruta CWI como consecuencia de defectos en su regulación o alteraciones en la integridad de la pared celular, se ha desarrollado un rastreo genómico mediante la transformación de la colección completa de mutantes de *S. cerevisiae* delecionados individualmente en cada uno de los genes no esenciales identificados en este organismo (aproximadamente 5000), con un plásmido que incluye la región promotora del gen *MLP1* fusionada al gen de resistencia frente al antibiótico nourseotricina. Utilizando esta estrategia se identificaron 174 mutantes capaces de crecer a concentraciones del antibiótico superiores a las de la cepa silvestre. El análisis de la activación de la MAPK Slt2 en este grupo reveló que 64 mutantes presentaron niveles de fosforilación de esta proteína superiores a los de la cepa silvestre. Desde un punto de vista funcional, dentro de este grupo se incluyen principalmente genes relacionados con pared celular y procesos de morfogénesis y genes de función desconocida, así como genes relacionados con transducción de señales, transporte y transcripción. En general, se observó un elevado grado de correlación entre los niveles de fosforilación de la MAPK Slt2 en los mutantes analizados y los niveles de activación transcripcional.

Dentro del grupo de mutantes que no presentaron activación basal de Slt2 (110), se han confirmado 38 cepas resistentes al antibiótico, y en general con niveles de expresión de *MLP1* superiores a los de la cepa silvestre. En este grupo, se han identificado mutantes, como *ssd1Δ* y *pmt2Δ*, en los cuales existe una elevada activación transcripcional de genes relacionados con la integridad celular dependiente de la actividad de la MAPK Slt2 o del

factor de transcripción Rlm1, en ausencia de incrementos detectables en la fosforilación de la MAPK.

Finalmente, con el fin de caracterizar funcionalmente alguno de los genes seleccionados en el rastreo genómico, uno de los elegidos fue el gen *YPL158C* cuya función hasta el momento es desconocida. Se ha determinado que esta proteína se localiza tanto en el cuello como en el núcleo de la célula y su ausencia conduce a: i) una activación de la ruta CWI que depende del sensor Wsc1, ii) a fenotipos de hipersensibilidad frente a agentes que afectan a la integridad celular, iii) aparición de células multigemadas y, iv) a un retraso en la salida de la fase G1 del ciclo celular. Todos estos resultados sugieren un papel de la proteína Ypl158c en procesos morfogénicos en *S. cerevisiae*.

VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA Y CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA DEL PATÓGENO *LACTOCOCCUS GARVIAE*

Autor: Pilar Reimundo Díaz-Fierros.

Director: José Agustín Guijarro Atienza.

Centro: Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Lactococcus garviae es el agente etiológico de la lactococosis, una importante patología en acuicultura. Esta bacteria es ubicua y ha adquirido relevancia como agente zoonótico en los últimos años. A pesar de ello, los conocimientos que se tienen sobre la biología, la variabilidad entre cepas procedentes de diferentes hospedadores, los mecanismos de patogenicidad, etc., de este microorganismo son limitados.

Con el fin de aportar nuevos datos que ayuden a mejorar esta situación, en la presente Tesis Doctoral se han abordado un conjunto de estudios que han permitido, en primer lugar, la caracterización del sistema de incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular de *L. garviae*, poniéndose de manifiesto su implicación en patogenicidad. En segundo lugar, se ha evaluado la virulencia de dos aislados de la bacteria procedentes de trucha arcoíris (cepa 074) y de humano (cepa HF) en dos modelos animales. Los resultados indican que la cepa 074 es capaz de saltar la barrera de especie y producir un proceso patológico en ratón. Asimismo, la variabilidad genética entre las cepas 074 y HF ha sido analizada mediante la técnica denominada «hibridación sustractiva supresora» (Suppressive Subtractive Hybridization, SSH). De este modo, se han identificado diferencias génicas entre ambas cepas que han sido utilizadas para extender el análisis a una colección de cepas procedentes de diferentes ambientes y hospedadores. Los resultados confirman la existencia de una importante variabilidad genética intraespecífica. Finalmente, se ha secuenciado y analizado el genoma de la cepa 074 lo que ha conducido a la identificación de, entre otros, seis islas genómicas y numerosos elementos móviles, genes de origen fágico, elementos de inserción y secuencias repetidas. Además, se ha puesto de manifiesto la presencia de diversos genes cuyos productos posiblemente ejerzan un papel importante en los mecanismos de patogenicidad de *L. garviae*.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevos conocimientos sobre este microorganismo patógeno y pueden constituir un punto de partida para la futura caracterización de las claves genéticas de su virulencia.

PAPEL DEL COMPLEJO SWI/SNF EN LA TRANSCRIPCIÓN REGULADA POR LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Autor: Ana Belén Sanz Santamaría.

Directores: José Manuel Rodríguez Peña y Javier Arroyo Nombela.

Centro: Dpto de Microbiología II. Universidad Complutense de Madrid.

El programa transcripcional necesario para la adaptación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a situaciones de estrés sobre la pared celular está coordinado principalmente a través de la ruta de integridad celular (CWI). Así, la exposición de la levadura a agentes que

desestabilizan esta estructura conduce a la activación de la MAPK Slt2. Slt2 actúa sobre diferentes factores de transcripción, siendo Rlm1 el principal responsable de la expresión de la mayoría de los genes inducidos en estas condiciones. En este trabajo definimos por primera vez la participación del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF en la regulación de la respuesta transcripcional global mediada por Slt2 y Rlm1. Mutantes *swi/snf* presentan una drástica reducción en la expresión de genes de respuesta a estrés sobre la pared celular e hipersensibilidad a compuestos que interfieren con esta estructura. En condiciones de estrés, Rlm1 interacciona físicamente con SWI/SNF para dirigir su asociación con los promotores diana. Allí, el complejo SWI/SNF produce el desplazamiento de nucleosomas favoreciendo la entrada de Rlm1 y en último lugar, de la RNA polimerasa II. La unión de la RNA Pol II al DNA depende de la presencia de Rlm1, la MAPK Slt2 y el complejo SWI/SNF. En conjunto, nuestros resultados definen los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la mayor parte de la respuesta transcripcional en situaciones de estrés sobre la pared celular, a través de la ruta CWI.

BIORREMEDIACIÓN EN HÁBITATS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS. ESTUDIOS DE LOS PARÁMETROS INDICADORES DE LA VIABILIDAD DE LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN

Autor: Gloria Andrea Silva Castro.

Directores: Concepción Calvo Sainz y Jesús González López.

Centros: Departamento de Microbiología e Instituto Universitario de Investigación del Agua. Universidad de Granada.

Centro de presentación: Instituto Universitario de Investigación del Agua. Universidad de Granada.

Agradecimientos: Estudio financiado por el Ministerio de Medio Ambiente (MMA.A487/2007/20-01.1).

La biorremediación es una tecnología que estimula la actividad microbiana y acelera el proceso natural de degradación de un compuesto contaminante. Las prácticas vigentes de extracción, procesamiento, almacenamiento, transporte y distribución de hidrocarburos del petróleo así como los derrames accidentales han causado y causan problemas medioambientales prácticamente en todos los sitios de nuestro planeta. Actualmente, la biorremediación se considera una tecnología eficaz, poco costosa y ambientalmente segura.

El objetivo fundamental de este proyecto de tesis doctoral fue generar una base amplia de conocimientos que permitiera evaluar los factores físico-químicos y biológicos implicados en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y determinar la eficacia e idoneidad de distintos tratamientos combinados en la recuperación de estos suelos contaminados. Como agentes bioestimulantes se evaluaron: Fertilizante NPK, surfactante Ivey, Biorrem como agente estructurante y etanol como cosustrato. Asimismo, se evaluó el efecto de la oxidación química con reactivo Fenton a bajas concentraciones.

Como parámetros indicadores de la evolución del proceso se determinó la evolución de la microbiota total heterótrofa y degradadora de hidrocarburos, la actividad deshidrogenasa, la producción de CO₂ y los cambios en la biodiversidad mediante análisis de TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura).

Los ensayos se realizaron en dos fases de escalado: I Ensayos a escala de laboratorio donde se valoró la influencia del tipo y concentración del contaminante, del tipo de suelo y la dosis de los tratamientos aplicados. II Ensayos en un sistema a escala de planta piloto donde se valoraron los tratamientos seleccionados en la etapa precedente.

Los resultados obtenidos mostraron que el surfactante IVEY® y el pre-tratamiento Fenton ambos aplicados de forma combinada con el fertilizante NPK aumentaba la eficiencia del proceso de degradación de los hidrocarburos cuando el contaminante se caracterizaba por un alto grado de envejecimiento.

Las condiciones experimentales a escala piloto permitieron establecer que, en condiciones de humedad inferiores a 15% los mayores

rendimientos de degradación se obtuvieron con el fertilizante NPK, mientras que con valores superiores al 30% de humedad el tratamiento combinado NPK+Ivey incrementó la degradación de los hidrocarburos de alto peso molecular. El pre-tratamiento con reactivo Fenton estimuló la biodegradación de todas las fracciones de hidrocarburos, siendo su efecto más notable en las condiciones de humedad superiores al 20%.

Los estudios de biodiversidad basados en la técnica de TGGE mostraron diferencias en las poblaciones microbianas dependiendo de los tratamientos y de la zona muestreada. Indicar que el tratamiento con reactivo FENTON produjo grandes cambios en la biodiversidad del suelo, quedando reflejado por la obtención de un patrón de bandas muy diferente al del resto de biotratamientos.

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA Y VIRULENCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DE DIFERENTE ORIGEN

Autor: María de los Ángeles Argudín Regueiro

Directores: María del Rosario Rodicio Rodicio y María Cruz Martín Martín.

Centros de realización: Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Oviedo, España. Federal Institute for Risk Assessment, Berlín, Alemania.

Centro de presentación: Universidad de Oviedo, Oviedo, España.

Staphylococcus aureus es una bacteria comensal y patógena, que se encuentra en el ser humano y en animales tanto en estado portador como causando enfermedad. Su estructura poblacional es altamente clonal, lo que está facilitado por la presencia de sistemas de restricción-modificación (RM) que modulan el intercambio genético. A pesar de ello, existen fenómenos de transferencia horizontal que permiten la dispersión o intercambio de elementos genéticos móviles (EGM) y sistemas reguladores entre clones del mismo linaje e incluso de diferentes linajes. La presente Tesis Doctoral analiza la estructura poblacional de una amplia colección de aislamientos de *S. aureus* de diverso origen y examina la distribución de determinantes de resistencia y virulencia entre los linajes encontrados. Los aislamientos analizados proceden de pacientes de dos hospitales, de portadores sanos, de muestras de alimentos y de manipuladores de alimentos, todos ellos del Principado de Asturias (PA). También se incluyeron en el estudio aislamientos de origen animal de Alemania, pertenecientes al clon emergente ST398. Los aspectos desarrollados fueron los siguientes:

- Identificación de los linajes circulantes en el PA y de su variabilidad interna mediante el uso de distintas técnicas de tipificación: electroforesis en campo pulsante (PFGE), secuenciación de múltiples loci, secuenciación del gen de la proteína A (*spa*) y amplificación de los genes *sau1hsdS1* y *sau1hsdS2* del sistema RM Sau1. Se estableció la presencia de 15 linajes en la región (CC1, CC5, CC8, CC9, CC12, CC15, CC22, CC25, CC30, CC45, CC59, CC72, CC88, CC97, CC121) siendo mayoritarios CC5, CC30 y CC45. Además, se desarrolló un protocolo para la tipificación por PFGE del clon emergente ST398 no tipificable anteriormente con esta técnica.
- Detección de determinantes de virulencia y de EGM implicados en su dispersión. A diferencia del clon ST398, los aislamientos del PA presentaron un número muy elevado de determinantes de virulencia asociados a EMG (islas genómicas, islas de patogenicidad, profagos, y plásmidos), combinados en numerosos perfiles. Estos resultados ponen de manifiesto la elevada plasticidad del genoma de *S. aureus*, lo cual facilita su adaptación a los distintos nichos ecológicos que ocupa. Este apartado se completó con la caracterización molecular de un plásmido híbrido de virulencia-resistencia, que representa un interesante ejemplo de ingeniería evolutiva.
- Estudios de resistencia. Se encontraron elevados porcentajes de resistencia, especialmente frente a β-lactámicos, aminoglicosidos, macrólidos y lincosamidas, y de multiresistencia, en aislamientos clínicos del PA y en ST398, con respecto a los aislamientos recogidos en la comunidad. Se identificaron los genes responsables de las

resistencias y los EGM implicados en su dispersión (transposones y plásmidos), y se estableció su distribución en los diferentes linajes. La determinación de los tipos SCCmec en aislamientos resistentes a metilina permitió identificar los clones MRSA circulantes en la región y dentro del ST398.

La Tesis Doctoral amplía el conocimiento sobre la estructura poblacional de *S. aureus*, y sobre las propiedades de resistencia y virulencia de los linajes y clones detectados. Además, identificó los clones epidémicos, esporádicos y emergentes que han estado circulando en el PA, cuyo seguimiento epidemiológico debe continuar en el futuro.

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS AISLADAS DE FONDOS MARINOS (DEL PRESTIGE)

Autor: Imane Uad.

Directores: Concepción Calvo Sainz, Jesús González López y Maximino Manzanera Ruiz.

Centros de realización: Departamento de Microbiología e Instituto Universitario de Investigación del Agua. Universidad de Granada.

Centro de presentación: Instituto Universitario de Investigación del Agua. Universidad de Granada

Agradecimientos: Estudio financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional, por Repsol YPF y por el grupo de investigación RNM270

Este proyecto de investigación presenta el estudio de 18 cepas bacterianas, aisladas de muestras de agua y sedimentos marinos procedentes de la zona del hundimiento del petrolero Prestige (4.000 m de profundidad), así como de muestras de fuel que se encontraba en los tanques de almacenamiento del pecio.

Estas cepas se seleccionaron debido a su potencial biotecnológico en la biorremediación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos, ya que eran capaces de degradar hidrocarburos y de exopolisacáridos con actividad emulgente.

Las 18 cepas pertenecieron a los géneros *Bacillus* (siete cepas), *Brevibacterium* (una cepa), *Halomonas* (cuatro cepas), *Thalassospira* (dos cepas), *Marinobacter* (una cepa), *Pseudomonas* (dos cepas) y *Pseudoalteromonas* (una cepa). Crecieron en un amplio rango de salinidad (0,5 y 15% p/v) y presentaron una gran variabilidad metabólica independientemente de su encuadramiento taxonómico.

Asimismo, se estudió la capacidad de estos microorganismos para producir bioemulgentes (BE), obteniéndose producciones superiores a 1g/l para *B. thuringiensis* W1, *B. pumilus* W15, F20 y S22, *B. casei* F2, *H. alkanartctica* W3, *Halomonas variabilis* W4 y W10, *Halomonas* sp. W12, *Thalassospira* sp. W5 y W7, *Marinobacter* sp. W8, *Pseudoalteromonas elyakovii* W18, *Pseudomonas fluorescencia* S21 y *Pseudomonas grimontii* S24.

Para comparar la eficacia de las cepas productoras y determinar las mejores condiciones de producción se desarrolló un índice de calidad bioemulgente (Ic) que relacionara la productividad con la actividad emulgente. La aplicación de este índice seleccionó a los bioemulgentes producidos por *H. alkanartctica* W3, *H. variabilis* W4 y W10, *Halomonas* sp. W12.

Respecto al crecimiento en presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) (naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno), *B. thuringiensis* W1, *B. pumilus* W15, W16, F17 y F20, *B. casei* F2, *Thalassospira* sp. W5 y W7 y *Marinobacter* sp. W8 crecieron en presencia de estos cuatro compuestos aromáticos. Los estudios de degradación en medio líquido mostraron que *H. variabilis* W10 y *Marinobacter* sp. W8 fueron las más eficientes en la degradación de naftaleno. Asimismo se demostró que *B. pumilus* F17, *Halomonas* sp. W12, *P. elyakovii* W18 y *P. grimontii* S24 degradaban eficazmente distintas fracciones de hidrocarburos presentes en el de crudo Kirkuk.

Como base para el desarrollo de futuras herramientas biotecnológicas, se inició el estudio de la caracterización de los promotores de *Halomonas variabilis* W10, para su uso como modelo de búsqueda de promotores que respondieran a señales de contaminación (HPA). Se construyó una genoteca para la búsqueda de promotores que respondieran a naftaleno, utilizando como fondo genético la cepa *Escherichia coli* XL1Blue. La librería construida presentó variabilidad de 37,5% y algunos clones se identificaron por presentar promotores inducibles.

PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A EN LAS PRINCIPALES ESPECIES DE ASPERGILLUS SECCIÓN CIRCUMDATI. ESTUDIO DE LOS GENES IMPLICADOS, MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CONTROL

Autor: Jéssica Gil Serna.

Directoras: Belén Patiño Álvarez y Covadonga Vázquez Estévez.

Centros de realización: Departamento de Microbiología III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina con propiedades tóxicas frente a animales y humanos que se ha encontrado frecuentemente en una gran variedad de sustratos comunes en la dieta. Incluidas dentro de *Aspergillus* sección Circumdati se encuentran importantes especies ocratoxigenas como *A. ochraceus*, *A. steynii* y *A. westerdijkiae*, algunas de las cuales han sido poco estudiadas hasta el momento debido a su reciente descripción. Esta tesis se ha centrado en el estudio de la producción de OTA en estas especies así como en el desarrollo de nuevos métodos para su detección y control.

Las técnicas moleculares para la detección de hongos tóxicos son sensibles y específicas, y suponen una reducción importante en el tiempo de análisis. En este trabajo, se han desarrollado ensayos de PCR para la discriminación de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* y se ha demostrado que se pueden aplicar para la detección de estas especies directamente en sustratos naturales. Por otro lado, se ha puesto a punto un ensayo de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae* en uvas y café verde.

La capacidad de producir OTA de estas especies también ha sido estudiada y se ha comprobado que *A. ochraceus* no es la principal productora de la sección Circumdati como se pensaba hasta el momento, sino que *A. westerdijkiae* y, principalmente, *A. steynii* producen OTA a niveles más elevados y su porcentaje de cepas productoras es mucho mayor. Además, se ha establecido el efecto de la temperatura, la actividad de agua y la composición del sustrato sobre el crecimiento y la producción de OTA en estas dos últimas especies y se ha comprobado que *A. westerdijkiae* es capaz de crecer más que *A. steynii* en todos los casos, mientras que *A. steynii* puede producir niveles muy altos de toxina en un mayor rango de condiciones.

La ruta de síntesis de OTA en el género *Aspergillus* está muy poco estudiada hasta el momento. En esta tesis, se ha demostrado mediante RT-PCR a tiempo real la implicación de tres genes en la ruta biosintética de OTA en *A. westerdijkiae* (*pks*, *p450-B03* y *nrps*) y se ha caracterizado un gen, *p450ste*, cuyos niveles de expresión se relacionan con la concentración de OTA extracelular.

Por último, se ha estudiado la posible utilización de *Debaryomyces hansenii* CYC 1244 como agente de biocontrol frente a *A. westerdijkiae* ya que se ha demostrado que su presencia supone una disminución en el crecimiento y la capacidad de producir OTA del hongo. El agente seleccionado podrá ser útil también para la detoxificación de productos alimentarios al ser capaz de adsorber la OTA a la superficie de su pared celular.

BIOFILM DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE: GENÉTICA, COMPOSICIÓN Y TERAPIA

Autor: Miriam Domenech Lucas.

Directores: Miriam Moscoso Naya y Ernesto García López.

Centros: Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología III. Universidad Complutense de Madrid.

Actualmente se estima que los biofilmes están implicados en más de la mitad de las infecciones bacterianas humanas y, hasta en un 80%, en las infecciones crónicas, debido fundamentalmente a que las bacterias que forman parte de los biofilmes se muestran refractarias tanto a los agentes antimicrobianos como a los mecanismos de defensa del sistema inmunitario del hospedador. Hasta el momento, el modo de vida sésil de *Streptococcus pneumoniae* apenas ha sido investigado y, sin embargo, la otitis media, y, posiblemente, la neumonía y la

meningitis son enfermedades neumocócicas asociadas a la formación de biofilmes.

En esta Tesis hemos concluido que, la formación del biofilm es un proceso multifactorial en el que intervienen genes implicados en muy diversas funciones celulares. Además de genes del metabolismo de carbohidratos y síntesis de poliaminas, se describe por primera vez, la implicación de la proteína PhtE (candidata para una nueva vacuina proteica) en el desarrollo de un biofilm neumocócico.

En general, el polisacárido capsular de neumococo puede constituir una barrera física que impide o, al menos, dificulta, las primeras etapas de formación del biofilm. No obstante, la estructura química del polisacárido capsular influye en la formación del biofilm ya que, dentro del mismo serogrupo capsular, se ha observado que los neumococos de los serotipos 19A y 19F son buenos formadores de biofilm mientras que los de serotipos 19B y 19C, no.

Entre los componentes de la matriz del biofilm neumocócico se encuentran el ADN-extracelular y las proteínas, son importantes tanto para la formación como para el mantenimiento del biofilm. Además es muy probable la existencia de complejos ADN-proteína y, más concretamente, con la lisozima LytC. En dicha matriz se ha demostrado la existencia de uno o más polisacáridos que contienen residuos de Glc $\beta(1\rightarrow4)$ y GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$. La proteína LytB podría desempeñar un papel esencial en las etapas iniciales de la formación del biofilm, ayudando a la diseminación de las células hijas sobre la superficie a colonizar.

Los biofilmes de *S. pneumoniae* son capaces de evadir el sistema del complemento del hospedador ya que las bacterias que forman el biofilm presentan un menor depósito de C3b, C1q y CRP en su superficie que las bacterias planctónicas. La evasión del sistema del complemento conlleva una menor opsonofagocitosis de las bacterias que forman parte del biofilm.

Compuestos como el xilitol y la *N*-acetil-L-cisteína pueden utilizarse para prevenir la formación de biofilmes neumocócicos. Además, la *N*-acetil-L-cisteína ha mostrado una potencial acción terapéutica. Las hidrolasas de pared de neumococo LytA y LytC, las endolisinas fágicas Pal, Ejl, Cpl-1 y Cpl-7 y combinaciones de las mismas, como LytA + Cpl-1, constituyen una prometedora alternativa para el tratamiento de las infecciones neumocócicas asociadas a biofilmes.

VINO Y SALUD: MEJORA DE LA CALIDAD SANITARIA DEL VINO POR HONGOS DE LA VID Y MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA HUMANA POR POLIFENOLES DEL VINO

Autor: Carolina Cueva Sánchez.

Directoras: Begoña Bartolomé Sualdea y M^a Victoria Moreno Arribas.

Centros: Departamento de Biotecnología y Microbiología de los Alimentos Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM Departamento de Química-Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

En la actualidad, los consumidores están cada vez más concienciados de la importancia que tiene una alimentación equilibrada y segura sobre la salud. El vino, entendido como un alimento, es un producto de origen fermentativo que no está exento de riesgos y contaminaciones

de origen microbiano, como la presencia de elevadas concentraciones de aminas biógenas. Por otro lado, el vino también se caracteriza por poseer compuestos con potenciales efectos beneficiosos, entre los que destacan los compuestos fenólicos o polifenoles, a los que se les atribuye un efecto cardioprotector. Un aspecto menos estudiado respecto a la bioactividad de los polifenoles del vino es su interacción con la microbiota humana (oral e intestinal), que engloba tanto el efecto de los compuestos fenólicos sobre las bacterias como el metabolismo microbiano de los compuestos fenólicos.

Con el objetivo global de avanzar en el conocimiento de cómo el vino puede contribuir al mantenimiento de la salud, la presente Tesis doctoral propone la utilización de hongos aislados de la vid como una nueva estrategia natural, para minimizar el contenido de aminas biógenas en los vinos y para su potencial uso en la producción de antimicrobianos en la industria alimentaria. Por otro lado, mediante estudios dirigidos a evaluar la capacidad de los polifenoles del vino (y de sus metabolitos microbianos) para modular la microbiota bacteriana de la cavidad oral y del colon, se pretende aportar nuevas evidencias científicas sobre los efectos en la salud humana del consumo moderado de vino.

En relación a las propiedades biotecnológicas de los hongos de la vid, se llevó a cabo el aislamiento e identificación molecular de 290 cepas de hongos del ecosistema de la vid, para la búsqueda por un lado de actividades enzimáticas amino oxidasas, implicadas en la degradación de aminas biógenas, y, por otro, la producción de metabolitos antimicrobianos. Se ha comprobado que los hongos de la vid presentan elevada capacidad para degradar las aminas biógenas histamina, tiramina y putrescina, y en concreto una cepa de *Penicillium citrinum* (CIAL-274,760) se ha protegido mediante patente y se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 20782), por su elevado potencial para eliminar estas aminas biógenas en vinos. Además, los hongos del ecosistema de la vid producen compuestos capaces de inhibir selectivamente microorganismos patógenos de alimentos, sin afectar a las bacterias probióticas, lo que les convierte en potenciales aditivos para la industria alimentaria para prevenir el deterioro de los alimentos, así como las infecciones alimentarias.

En el marco de los polifenoles del vino y la microbiota humana, se evaluó la capacidad de compuestos y extractos obtenidos de uva y vino, para modular la microbiota de la cavidad oral y del colon. Se ha demostrado la capacidad de algunos compuestos fenólicos del vino, en especial el ácido gálico y el etilgalato, y de extractos fenólicos derivados de uvas o de vino, para inhibir selectivamente el crecimiento de bacterias patógenas respiratorias de la cavidad oral. A nivel intestinal se ha comprobado que la microbiota es capaz de metabolizar los polifenoles del vino, dando lugar a una amplia gama de metabolitos intermedios y ácidos fenólicos, alguno de los cuales, como es el caso de la 5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona se ha propuesto como marcador del catabolismo de flavan-3-oles. Entre los ácidos fenólicos formados se encuentran ácidos fenilpropínicos, fenilacéticos y benzoicos, que a su vez son capaces de inhibir bacterias patógenas intestinales. El catabolismo de los polifenoles del vino está a su vez acompañado de cambios en la microbiota intestinal a favor de las bacterias beneficiosas y/o comensales, lo cual podría contribuir a la prevención del desarrollo de determinadas enfermedades. Además, se ha demostrado que entre la población anaerobia facultativa y/o aerobia del intestino hay bacterias tolerantes a los polifenoles del vino. En conjunto, estos estudios confirman el potencial efecto modulador de los polifenoles del vino sobre la microbiota humana.

Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

SEM@foro publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM (secretaria.sem@semicrobiologia.org) o al Director Editorial (vicjid@farm.ucm.es) por correo electrónico, siguiendo el formato: Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación (si es distinto) y Resumen (máximo, unas 200 palabras).

SEM@foro 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.