

**Universidad de León**



**Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos**

**Incidencia y caracterización de *Psychrobacter*  
spp. en alimentos de origen animal**

**Isabel García López**

**- 2010 -**





Universidad de León

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Los Drs. D. Jesús Ángel Santos Buelga y Dña. M<sup>a</sup> Luisa García López, como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Incidencia y caracterización de *Psychrobacter* spp. en alimentos de origen animal” realizada por Dña. Isabel García López en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 16 de Abril de 2010

Fdo.: Jesús A. Santos Buelga

M<sup>a</sup> Luisa García López





Universidad de León

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y  
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos en su reunión celebrada el día 19 de Abril de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Incidencia y caracterización de *Psychrobacter* spp. en alimentos de origen animal”, dirigida por el Dr. D. Jesús Ángel Santos Buelga y la Dra. Dña. Mª Luisa García López, elaborada por Dña. Isabel García López, y cuyo título en inglés es el siguiente “Incidence and characterization of *Psychrobacter* spp in food of animal origin”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 19 de Abril de 2010.

La Secretaria,

Fdo.: Mª Rosario García Armesto

Vº Bº  
El Director del Departamento,

Fdo.: Carlos Alonso Calleja



Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la financiación recibida del Ministerio de Educación y Ciencia, a través de los proyectos AGL2000-1159, AGL2002-0762 y AGL2004-4672



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a:

La Doctora María Luisa García López por haberme brindado la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación, por su labor en la dirección de la presente memoria y por su constante apoyo y confianza.

Al Doctor Jesús Ángel Santos Buelga, además de por su labor en la dirección científica, por su gran disponibilidad y su apoyo a mi trabajo en todo momento. Sin su ayuda esto no habría llegado a su fin.

Al Doctor Andrés Otero Carballeira, por su inestimable ayuda sobre todo en los tratamientos estadísticos.

A todos mis compañeros del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos que de una u otra manera me han ayudado en este largo trabajo.



A mis padres, por su gran esfuerzo para que todo esto haya sido posible y a mis hermanos que de una forma u otra me han brindado su apoyo desde un principio.

A Carlos, por su constante apoyo y comprensión.

A Carlos y Eva, por haberles robado tantos ratos de estar con su madre.



## ÍNDICE

Antecedentes y Justificación .....	1
Capítulo I. Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas de <i>Psychrobacter</i> spp. procedentes de diversos orígenes .....	11
Capítulo II. Posibles factores de virulencia en cepas de <i>Psychrobacter</i> spp. de diferentes orígenes .....	35
Capítulo III. Estudio filogenético de cepas de <i>Psychrobacter</i> .....	49
Capítulo IV. Desarrollo de una técnica de PCR para la detección e identificación de cepas de <i>Psychrobacter</i> spp.....	69
Capítulo V. Desarrollo de un medio de cultivo selectivo y diferencial para el aislamiento de <i>Psychrobacter</i> spp. ....	83
Conclusiones .....	107
Bibliografía.....	111



## **Antecedentes y Justificación**



Las bacterias pertenecientes al género *Psychrobacter* aparecen regularmente citadas como alterantes de alimentos proteicos almacenados a refrigeración (Mossel *et al.* 1995; García-López *et al.* 1998; ICMSF 2005). En este género se incluyen bacterias Gram-negativas, oxidasa positivas, inmóviles y psicrotrofas. La descripción del mismo data de 1986 (Juni and Heym 1986) y, con anterioridad a esta fecha, los microorganismos Gram-negativos, aerobios, psicrotrofos y que no producían pigmentos se clasificaban dentro del grupo *Achromobacter*. Aunque la cepa tipo de *Achromobacter liquefaciens* era inmóvil, el género incluía organismos tanto móviles como inmóviles. Brisou and Prevot (1954) sugirieron que las especies inmóviles de *Achromobacter* fueran separadas de las móviles y se agrupasen en el género *Acinetobacter*. Posteriormente, la prueba de la oxidasa permitió conocer que el género *Acinetobacter* incluía tanto bacterias oxidasa positivas como oxidasa negativas, agrupando a los organismos oxidasa-negativos como cepas del género *Acinetobacter* y a los oxidasa positivos como *Moraxella* (Baumann *et al.* 1968; Baumann 1968; García-López and Prieto 1999).

Hasta hace varios años, un gran grupo de bacterias inmóviles, oxidasa-positivas, no pigmentadas, psicrotrofas, bacilos o cocobacilos Gram-negativos aislados de piel de pescado y pollo y también de algunos alimentos procesados se nombraban como “*Moraxella-like*” (Shaw and Shewan 1968; Juni and Heym 1986) pero, aunque sus características fenotípicas dejaban claro que no podían considerarse como *Moraxella*, tampoco se identificaban correctamente. Varios estudios revelaron que muchas de esas cepas eran competentes de forma natural para la transformación genética, lo que hizo posible concebir un ensayo en el cual el ADN de bacterias afines pudiera transformar una cepa auxótrofa (la cepa ATCC 43117, auxótrofa para hipoxantina) en una célula capaz de crecer en un medio carente de hipoxantina, en el que la auxótrofa no podía crecer (Juni and Heym 1980). Mediante el ensayo de transformación se pudo concluir que había un gran número de cepas que se podían agrupar juntas como miembros de un nuevo género denominado *Psychrobacter* (Juni and Heym 1986).

El nombre *Psychrobacter* fue elegido por el carácter psicrotrofo de estas bacterias. Este género comprende bacilos y cocobacilos Gram-negativos, psicrotrofos, halotolerantes, aerobios, inmóviles y oxidasa y catalasa positivos, que se encuentran en ambientes naturales y en alimentos proteicos refrigerados como posibles agentes alterantes de éstos. Son bacterias filogenéticamente muy relacionadas con *Acinetobacter* y *Moraxella*; inicialmente los tres géneros se ubicaron dentro de la familia

*Neisseriaceae* (Lessel 1971). Sin embargo, en la actualidad se considera y acepta que los tres deben de constituir una familia separada, creándose a tal fin la familia *Moraxellaceae* (Rossau *et al.* 1991).

La clasificación actual del género *Psychrobacter*, según figura en la última versión del esquema taxonómico del Manual de Bergey (Garrity *et al.* 2004) es la siguiente:

Orden Pseudomonadales

Familia Moraxellaceae

Género *Moraxella*

Género *Acinetobacter*

Género *Psychrobacter*

*Psychrobacter immobilis* fue la única especie incluida inicialmente en el género *Psychrobacter* pero a finales del siglo pasado, Bowmann *et al.* (1996; 1997) describieron tres nuevas especies: *P. glacicola*, *P. urativorans* y *P. frigidicola*, procedentes todas ellas de muestras medioambientales del Antártico (hielo, agua y suelos ornitogénicos). Además, estos autores recomendaron la conveniencia de que *Moraxella phenylpyruvica* pasase al género *Psychrobacter*, proponiendo que se denominara *P. phenylpyruvicus* como así fue (Bowman *et al.* 1996).

Maruyama *et al.* (2000) encontraron una nueva especie, *P. pacificiensis*, entre una colección de cepas psicrófilas procedentes de las aguas profundas de la Fosa del Japón. Cronológicamente, la siguiente especie propuesta fue *P. proteolyticus* (Denner *et al.* 2001). La cepa objeto del trabajo había sido aislada del estómago de un espécimen de krill antártico (*Euphausia superba* Dana) e inicialmente había sido identificada como *Sphingomonas paucimobilis*. Dos nuevas especies, *P. submarinus* y *P. marincola*, fueron descritas por Romanenko *et al.* (2002). El hábitat de donde procedía la única cepa estudiada de la primera especie era agua de mar (noroeste del océano Pacífico) mientras que la también única cepa estudiada de la segunda, se aisló de un homogeneizado del tejido de una ascidia (*Polysyncraton* sp.) capturada en el océano Índico.

La especie *P. faecalis* (Kämpfer *et al.* 2002) se diferencia de las anteriores, ya que no fue aislada de hábitats fríos sino que procedía de heces de paloma. Ya en el 2003 se descubrió la especie *P. jeotgali* (Yoon *et al.* 2003), en este caso se estudiaron 2 cepas que fueron aisladas de mariscos fermentados coreanos. En este mismo año se describieron otras 4 especies: *P. pulmonis*, aislada de pulmones de corderos (Vela *et al.* 2003), *P. okhotskensis*, cepa aislada de la costa del mar Okhotsk de Monbetsu en Hokkido, Japón, cuando el hielo era arrastrado a esta zona por las corrientes frías (Yumoto *et al.* 2003) y *P. fozii* y *P. luti*, ambas procedentes de islas del sur de la Antártida (Bozal *et al.* 2003). Posteriormente en el año 2004 se describieron varias especies: *P. salsus*, *P. adeliensis* y *P. nivimaris* que de igual forma se aislaron de muestras antárticas (Shivaji *et al.* 2004; Heuchert *et al.* 2004) y *P. arenosus* y *P. maritimus*, fueron aisladas del hielo y de los sedimentos del mar de Japón por Romanenko *et al.* (2004).

En el año 2005 se han descrito *P. aquaticus* y *P. vallis*, también procedentes de la Antártica (Shivaji *et al.* 2005).

*P. alimentarius* y *P. cibarius* (Jung *et al.* 2005; Yoon *et al.* 2005c), aisladas de marisco fermentado coreano; *P. celer*, *P. aquimaris* y *P. namhaensis* (Yoon *et al.* 2005a; Yoon *et al.* 2005b) aislados del mar del sur de Corea y *P. cryohalolentis* y *P. arcticus* aisladas de la capa de hielo permanente congelada en los niveles superficiales del suelo de regiones muy frías como en este caso es Siberia (Bakermans 2006) son hasta el momento las últimas especies descritas en la creciente lista de especies incluidas en el género *Psychrobacter*.

Es fácil apreciar como en los últimos años ha habido un aumento espectacular en el número de especies descritas pertenecientes al género *Psychrobacter*, como consecuencia de las innovaciones tecnológicas y genéticas aplicadas a la taxonomía bacteriana.

Sin embargo, el aislamiento de estos microorganismos a partir de alimentos no es fácil; aparecen junto con el resto de la microbiota psicrotrófica en los medios para recuentos generales y como las colonias no poseen características diferenciales pasan fácilmente desapercibidas. Las modificaciones en los medios de cultivo propuestas por Gennari *et al.* (1992) tampoco facilitan su diferenciación; además, por sus caracteres fenotípicos se

confunden fácilmente con cepas de *Pseudomonas* aparentemente inmóviles (García-López *et al.* 2004).

Pese a la dificultad de su aislamiento, existen bastantes trabajos que reseñan su presencia en muestras de diversos orígenes, como pescado, pollo, cordero y diferentes tipos de productos cárnicos, mantenidas a temperatura de refrigeración (Shaw and Latty 1988; Gennari and Tomaselli 1988; Gennari *et al.* 1992; Prieto *et al.* 1992; García-López *et al.* 1998; García-López and Prieto 1999; Gennari *et al.* 1999; González *et al.* 2000). Además, se trata de una bacteria relativamente resistente a los tratamientos con radiaciones ionizantes y está presente en alimentos irradiados (Welch and Maxcy 1975; Björkevoll *et al.* 2003; Rodríguez-Calleja *et al.* 2005).

La incidencia de este microorganismo es variable en los distintos tipos de muestras, pero en general se estima que en carne y productos cárnicos representan un porcentaje inferior al 5 % de la microbiota aerobia (aunque en superficies grasas de productos cárnicos el porcentaje aumenta hasta el 50 %), lo mismo que en especies de pescado de agua dulce, como trucha o lucio, mientras que en el pescado marino (sardina, bacalao) su prevalencia es mayor (García-López and Prieto 1999).

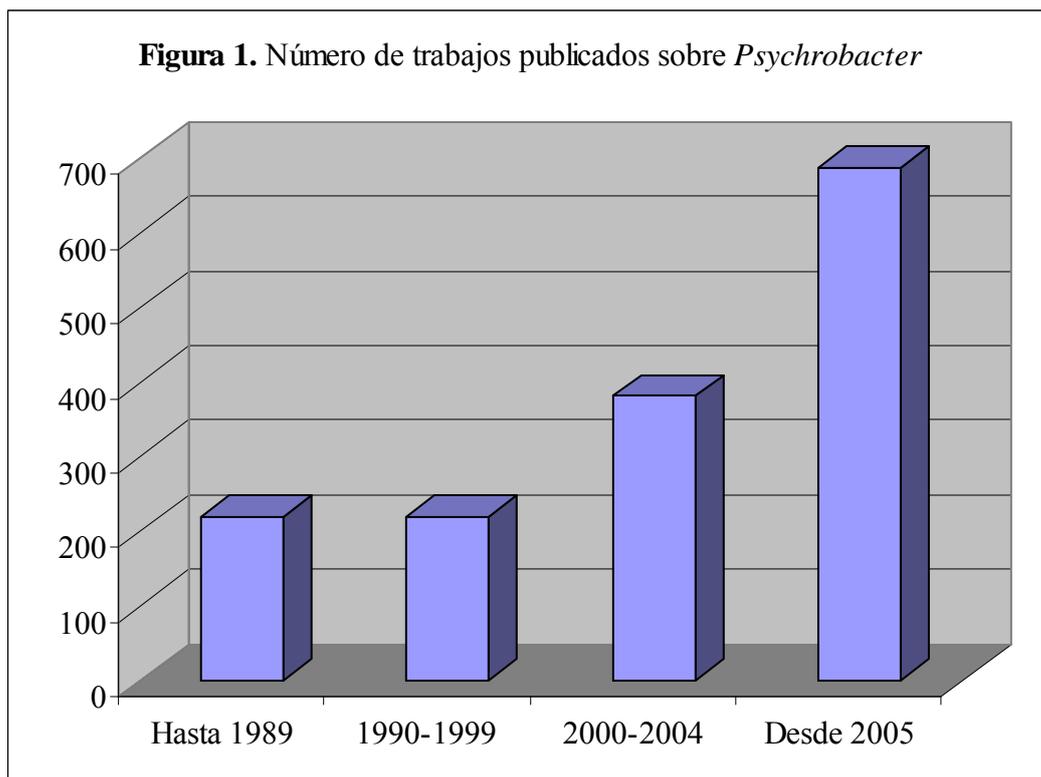
Algunos estudios llevados a cabo con cepas obtenidas de alimentos alterados, originalmente consideradas como “*Moraxella-like*” y “reidentificadas” finalmente como *Psychrobacter immobilis* han dado lugar a la aceptación general de que participan en la alteración de alimentos proteicos mantenidos en aerobiosis y a temperaturas de refrigeración (ICMSF 2005). Cepas de *P. immobilis* son capaces de producir ácido a partir de carbohidratos y presentan una notable actividad lipolítica sobre Tween 20, 40, 60 y 80 y sobre tributirina. Sin embargo, su actividad proteolítica es escasa y no producen compuestos habitualmente asociados con la alteración, como trimetilamina, indol o H<sub>2</sub>S (García-López and Prieto 1999).

En cuanto a su posible patogenicidad, ya en 1987 un grupo de investigadores de los CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Estados Unidos, mostró que algunas cepas de un grupo denominado EO-2 y procedentes de diversas muestras clínicas, transformaban una cepa mutante de *Psychrobacter*, siendo por tanto cepas de *P. immobilis* (Hudson *et al.* 1987). Posteriormente se describieron varios casos clínicos causados por cepas de *Psychrobacter* (Gini 1990; Lloyd-Puryear *et al.* 1991; Lozano *et al.* 1994; Guttigoli and Zaman 2000; Stepanovic *et al.* 2007). Las especies implicadas

eran *P. immobilis* y *P. phenylpiruvicus*, aunque hay que tener presente que estos casos de enfermedad ocurrieron antes de la descripción de la mayor parte de las nuevas especies. En el año 2005 se publicó un caso de bacteriemia en un paciente cirrótico, producido por *P. phenylpiruvicus*, como consecuencia de la ingestión de una almeja panopea (*Panopea abrupta*), siendo la primera descripción de una infección por *Psychrobacter* como consecuencia de su ingestión (Leung *et al.* 2006). Asimismo, parece que *P. submarinus* puede participar en procesos humanos como patógeno oportunista (Musaad *et al.* 2007). También hay que destacar que una de las especies descritas recientemente, *P. pulmonis*, procedía de casos clínicos de cordero (Vela *et al.* 2003).

Un último aspecto interesante en relación con esta bacteria es el de su capacidad de crecer en un ambiente extremo, como son las bajas temperaturas antárticas. Por esta razón se han estudiado algunas enzimas producidas por cepas de este microorganismo, destacando una  $\beta$ -lactamasa capaz de actuar a temperaturas bajas y que podría ser de utilidad para el estudio de algunos procesos biotecnológicos (Feller *et al.* 1995).

De lo expuesto hasta el momento, se puede concluir que a este género de microorganismos se le ha prestado una atención limitada, pese a que se cita habitualmente como alterante de los alimentos proteicos y a su participación en procesos patológicos humanos. Únicamente en los últimos años ha ocurrido una “explosión taxonómica” que ha permitido la descripción de nuevas especies de *Psychrobacter*, con un gran aumento en el número de publicaciones dedicadas a esta bacteria. Esta situación se refleja claramente en la Figura 1, donde se representan las publicaciones sobre *Psychrobacter* a lo largo del tiempo, con datos obtenidos de Google Académico (<http://scholar.google.es>).



Teniendo en cuenta los antecedentes presentados, este trabajo de investigación se ha planteado con el objetivo general de caracterizar filogenéticamente cepas de *Psychrobacter* obtenidas de dos fuentes diferentes: de un lado cepas depositadas en colecciones de cultivos y, por otra parte, cepas aisladas a partir de muestras de alimentos en el curso de este trabajo; conocer, desde un enfoque polifásico, sus características fenotípicas; estudiar la presencia de posibles factores de virulencia; diseñar un medio de cultivo que facilite su aislamiento y desarrollar un protocolo de PCR que permita la detección específica de microorganismos pertenecientes al género *Psychrobacter*.

En concreto, los objetivos de este trabajo han sido los siguientes:

- Aislar y caracterizar cepas de *Psychrobacter* spp. a partir de alimentos de origen animal y caracterizar cepas obtenidas de colecciones de cultivos, con el fin de obtener datos sobre estos microorganismos que permitan mejorar las técnicas disponibles para su estudio.
- Evaluar la incidencia de *Psychrobacter* spp. entre la microbiota psicrotrofa de ciertos alimentos proteicos.

- Investigar posibles factores de virulencia en una colección de cepas de *Psychrobacter* spp. de diferentes orígenes.
- Comprobar, mediante técnicas filogenéticas la adscripción a especie de cepas aisladas e identificadas como pertenecientes al género *Psychrobacter*.
- Diseñar una técnica de PCR que nos permita amplificar de forma específica el gen *lip1* en cepas de *Psychrobacter immobilis* y así facilitar su detección en muestras de alimentos.
- Formular un medio de cultivo selectivo y diferencial que facilite la identificación de las colonias de *Psychrobacter* spp.



**Capítulo I. Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas  
de *Psychrobacter* spp. procedentes de diversos orígenes**



## INTRODUCCION

El género *Psychrobacter*, incluido en la familia *Moraxellaceae*, se ha caracterizado desde los primeros estudios realizados, por las dificultades que presenta en cuanto a su aislamiento e identificación, lo que podría ser debido a la falta de medios específicos para su crecimiento, a los escasos estudios que existen publicados al respecto al desconocerse su importancia desde el punto de vista de la salud pública y por último a las pruebas laboriosas que se han de llevar a cabo a la hora de su identificación, por ejemplo el ensayo de transformación.

La transformación genética es un proceso por el que el ADN libre se incorpora en una célula receptora y lleva a cabo en ésta un cambio genético. El descubrimiento de la transformación suministró la primera evidencia de que el ADN es el material genético y fue realizado por el científico británico Frederick Griffith al final de los años 20 trabajando con *Streptococcus pneumoniae*, una bacteria cuya capacidad de invasión se debe en parte a la presencia de una cápsula polisacáridica. Se pueden aislar mutantes que carecen de esta cápsula y que son incapaces de causar infección; tales mutantes se llaman cepas R porque sus colonias aparecen rugosas en placas con medio con agar, a diferencia de la apariencia lisa de las cepas capsuladas. Un ratón infectado con sólo unas cuantas células de una cepa lisa (S) muere tras 1 día o 2 de la infección por el neumococo, mientras que incluso grandes inóculos de células R no originan la muerte cuando se inyectan en ratones. Griffith demostró que si las células S muertas por calor se inyectaban junto a las células R vivas, se producía una infección mortal y las bacterias aisladas del ratón muerto eran de tipo S. Las células R habían sido transformadas a un nuevo tipo (Madigan *et al.* 1997).

Una célula que es capaz de tomar una molécula de ADN y ser transformada se dice que es “competente”. Sólo algunas bacterias son competentes de forma natural, pero la “competencia” se puede inducir artificialmente, por ejemplo, si la bacteria *E. coli* se trata con altas concentraciones de iones calcio y luego se mantiene en frío, se convierte en transformable con baja eficiencia. La competencia también se puede inducir por tratamientos físicos, como la electroporación, que consiste en generar pequeños poros en las membranas de las células mediante la exposición a campos eléctricos pulsantes. Cuando, durante el pulso eléctrico, se encuentran presentes fuera de las células moléculas de ADN, pueden entrar en las células a través de esos poros.

Se han encontrado varios procariontes que son transformables en condiciones naturales, incluyendo especies de bacterias Gram positivas (*Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*) y Gram negativas; entre estas últimas se incluye *Psychrobacter immobilis*.

Las bacterias difieren por la forma en que incorporan el ADN. En microorganismos Gram-negativos, sólo penetra en las células ADN bicatenario pese al hecho de que los segmentos monocatenarios son los que se llegan a incorporar realmente en el genoma por recombinación. En microorganismos Gram positivos sólo se incorpora ADN monocatenario mientras que la cadena complementaria resulta degradada simultáneamente. No obstante, en todos los casos, el ADN bicatenario se une más eficientemente a las células.

El ADN transformante se une a la superficie celular por una proteína de unión a ADN, tras lo cual el fragmento bicatenario completo resulta captado por la célula o bien una nucleasa degrada una cadena y la otra es incorporada. Tras la incorporación, el ADN se asocia con una proteína específica que permanece unida al ADN, posiblemente para protegerlo de ataques por nucleasas, hasta que alcanza el cromosoma, donde es sustituida por la proteína RecA. El ADN se integra luego en el genoma del receptor por procesos de recombinación.

La competencia natural de las bacterias del género *Psychrobacter* ha permitido precisamente el reconocimiento de este género de bacterias (Juni and Heym 1980; Juni and Heym 1986), pero el ensayo de transformación es laborioso y no resulta práctico a la hora de abordar la caracterización de un gran número de cepas. Asimismo, existen muy pocos datos sobre resistencia a sustancias antimicrobianas, actividades enzimáticas o utilización de azúcares, lo que también dificulta la identificación de los aislamientos presuntamente pertenecientes al género *Psychrobacter*.

Por todo lo dicho, el objetivo de este capítulo ha sido el de aislar cepas de *Psychrobacter* spp., identificarlas mediante el ensayo de transformación y establecer su perfil fenotípico mediante pruebas “convencionales”, pruebas con sustancias antimicrobianas, y galerías de identificación mediante la utilización de azúcares y enzimas, para obtener datos que permitan mejorar las técnicas disponibles para su estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Medios y reactivos*

En la Tabla I.1 se citan los medios de cultivo utilizados en este capítulo, la abreviatura con la que se designan y la casa comercial donde han sido adquiridos.

**Tabla I.1.** Medios de cultivo, abreviatura y casa comercial.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Casa comercial</b>
Bile Salt	SB	Oxoid
Blue agar Base	BAB	Oxoid
GI motility médium	GI	Difco
Heart Infusión	HI	Oxoid
Heart Infusion Agar	HIA	Oxoid
Heart Infusion Broth	BHI	Oxoid
Lab Lemco Powder	LP	Oxoid
LB agar	LBA	Oxoid
L-Broth	L-Broth	Oxoid
M9CA	M9CA	Formulación
Moeller Broth	MB	Difco
Mueller-Hinton	MH	Oxoid
Nutrient Agar	NA	Oxoid
Nutrient Broth	NB	Oxoid
OF de Hugh y Leifson	OF	Difco
P96	P96	Formulación
Phosphate Buffered Saline	PBS	Oxoid
Plate Count Agar,	PCA	Oxoid
Purple Broth	PB	Difco
Trybutirin Agar	AT	Oxoid
Tryptone Soy Agar	TSA	Oxoid
Tryptone Soy Broth	TSB	Oxoid
Urea Agar Base (Christensen)	UAB	Oxoid

Los reactivos químicos de calidad analítica fueron adquiridos a las casas Merck, Sigma-Aldrich y Panreac.

### *Microorganismos*

En total, se estudiaron 142 cepas, cuyo origen y características se detallan a continuación:

- Ciento diecisiete fueron aisladas al azar de placas de PCA, para el recuento de microorganismos psicrotrofos, que habían sido incubadas 14 días a 4,5 °C. Éstas procedían de muestras de ejemplares enteros de conejo (11 muestras, 59 cepas)

y de moluscos bivalvos (mejillón, almeja reloj, almeja japonesa; 9 muestras, 58 cepas), procesadas en el curso de otros trabajos experimentales llevados a cabo en el laboratorio (Rodríguez-Calleja *et al.* 2005).

- Otras dieciséis cepas procedían de colecciones de cultivos tipo y pertenecían a la especie *Psychrobacter immobilis*, de las cuales una era una cepa mutante, auxótrofa para Hipoxantina y Tiamina, que se utiliza en el ensayo de transformación. Las cepas fueron adquiridas a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), la BCCM/LMG de Bélgica y la ATCC estadounidense.
- Finalmente, 9 cepas de *Pseudomonas fragi* obtenidas de muestras de ejemplares enteros de trucha común (*Salmo trutta*), lucio (*Esox lucius*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) así como de filetes de trucha arco iris y de rodajas de salmón (*Salmo salar*) se emplearon con fines comparativos, como microorganismos que comparten hábitat y características con las bacterias del género *Psychrobacter* (García-López *et al.* 2004).

Los microorganismos se mantuvieron en tubos de agar nutritivo inclinado a refrigeración y se cultivaron en caldo HI a 25 °C para preparar los cultivos de trabajo. Para el mantenimiento a largo plazo, las cepas se congelaron a -40 °C en caldo HI con 30 % de glicerol.

### ***Pruebas de caracterización***

Excepto en los casos en que se cita, las pruebas de caracterización se llevaron a cabo siguiendo la metodología detallada por Harrigan (1998) y Cowan y Steel (1974) y a una temperatura de incubación de 25 °C.

### **Morfología**

La forma y disposición de las células se estudió utilizando la tinción por el método de Gram.

### **Prueba de la oxidasa**

Se mezclaron, a partes iguales, una solución acuosa de dimetil-p-fenilendiamina al 1 % y  $\alpha$ -Naftol al 1 % en etanol absoluto y se depositaron unas gotas encima de las colonias. Las colonias positivas tomaban una coloración azulada en un tiempo inferior a 10 segundos.

### **Prueba de la catalasa**

A un cultivo de 24 horas en agar TSA se añadían unas gotas de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % (v/v) manifestándose la actividad enzimática por la aparición inmediata de burbujas.

### **Movilidad**

Fue estudiada mediante examen microscópico de cultivos tras 18 horas de incubación. También se llevó a cabo esta prueba inoculando por picadura en tubos con medio GI e incubando a la temperatura óptima (Soutourina *et al.* 2001). A las cepas que no mostraban movilidad se les repetía tres veces esta prueba antes de ser consideradas como inmóviles.

### **Oxidación/fermentación**

Para esta prueba se utilizó como base el medio OF de Hugh y Leifson al que se le adicionó glucosa al 1 %. Las cepas se sembraron por picadura en dos tubos. Después de inocular, a uno de ellos se le añadió un tapón de vaselina estéril de 10 mm de altura con el fin de obtener condiciones anaerobias y los tubos se incubaron a la temperatura óptima. La producción de ácido se manifiesta por un cambio de color de verde a amarillo; se considera que el microorganismo tiene metabolismo fermentativo cuando presenta cambio de color en ambos tubos, mientras que su metabolismo será oxidativo cuando sólo se produce ácido en el tubo sin vaselina.

### **Ensayo de transformación**

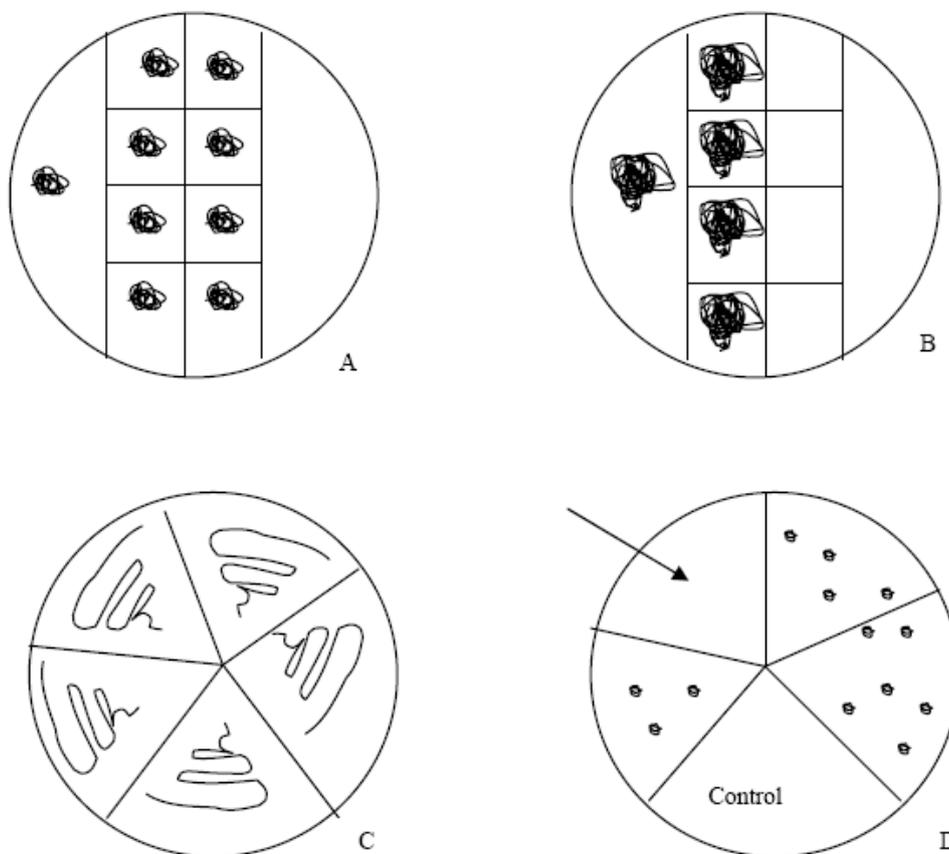
La transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Juni y Heym (1980) que consta de las siguientes etapas:

- ❖ Preparación del ADN crudo. La extracción de ADN se realizó a partir de una colonia, procedente de un cultivo puro en placa, que se resuspendía en 1 ml de solución salina estéril (0,15 M NaCl) con dodecil sulfato sódico (0,05 %) y 0,015 M de citrato trisódico. La mezcla se calentó durante 1 hora en un baño de agua a 65 °C para liberar el ADN. Esta preparación se almacenaba a refrigeración hasta su uso.
- ❖ Transformación de una cepa mutante. Se utilizó la cepa de *Psychrobacter* Hyx-7 ATCC 43117 auxótrofa para Hipoxantina y Tiamina y como control la cepa tipo *P. immobilis* CECT 5008. La cepa Hyx-7 se cultivó en el medio HIA

y, una vez crecida (25 °C/24 h), se mezcló con la preparación de ADN de las cepas problema obtenida en la etapa anterior. Un asa de cultivo de este mismo ADN se depositó sobre la placa de medio como control de esterilidad. La mezcla de cepa mutante y ADN se incubó durante 16-18 horas a 25 °C; tras este período de incubación, la placa se observó para determinar el crecimiento de la mezcla cepa mutante/preparación de ADN y la ausencia de crecimiento en las áreas de control de esterilidad.

- ❖ Observación de la reversión del mutante. A partir de las zonas de mezcla de la cepa mutante y la preparación de ADN, se tomó una fracción con el asa de cultivo que se inoculó en el medio M9A, carente de Hipoxantina y Tiamina (Juni and Heym 1980) y cuya composición es la siguiente: hidrolizado de caseína 3,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 g; NaCl, 2 g y MgSO<sub>4</sub>, 0,09 g. Las placas inoculadas se incubaron a 25 °C durante 72 h. La aparición de crecimiento es señal de reversión de la mutación y, por tanto, de transformación pudiéndose entonces afirmar que la cepa problema, donante de ADN, pertenece al género *Psychrobacter*.
- ❖ Para descartar la reversión espontánea de la cepa mutante se utilizó un control compuesto de la cepa mutante sin la adición de ADN foráneo, no apreciándose crecimiento en las placas de medio M9A.

El proceso se representa gráficamente en la Figura I.1.



**Figura I.1.** Esquema del protocolo de transformación de *Psychrobacter*. **A;** Mezcla de cepa mutante y preparación de ADN en una placa de HIA. **B;** Placa de HIA tras la incubación, donde se observa ausencia de crecimiento en las casillas donde se inoculaba la preparación de ADN. **C;** Inóculo de la mezcla de cepa mutante y ADN en placas de medio deficiente en Hipoxantina y Tiamina. **D;** Observación de la reversión del mutante. La sección marcada con una flecha indica una cepa problema que no pertenece al género *Psychrobacter*, la sección control se ha inoculado con la cepa mutante sin mezcla con ADN foráneo.

### **Producción de amoníaco a partir de la urea**

Se utilizó el medio Urea agar base de Christensen con adición de urea al 2 % repartido en tubos que se dejaron solidificar en posición inclinada. Los tubos inoculados se incubaron de 1 a 7 días. El crecimiento del microorganismo produce ácido que hace que el indicador de rojo fenol cambie de color rojo a amarillo. Al producirse ureasa y posteriormente la hidrólisis de la urea, se forma amoníaco, que eleva nuevamente el pH del medio y se produce entonces una reversión del color amarillo al rosa-rojo

nuevamente. Los tubos que muestran color amarillo se consideran negativos, mientras que los tubos en los que se produce reversión de color del amarillo al rosa se consideran positivos.

#### **Producción de indol a partir del triptófano**

Para este ensayo se utilizó caldo triptona (2 %) pH 7,2 en tubos de 5 ml que se inocularon e incubaron de 2 a 7 días. Pasado este tiempo se añadieron 0,5 ml de reactivo de Kovacs para indol (alcohol isoamílico, 75 ml, p-dimetilamino benzaldehído, 5 g, HCl, 25 ml). En presencia de indol se produce un color rojo intenso que destaca en la capa de alcohol.

#### **Desaminación de la fenilalanina**

Este carácter se investigó en tubos inclinados de agar fenilalanina, que se inocularon y posteriormente incubaron durante 24 h. Tras la incubación se añadieron a cada tubo 0,2 ml de FeCl<sub>3</sub> al 10 % observando los mismos. Se consideró reacción positiva si de forma rápida aparecía un color verde que se decoloraba en muy poco tiempo.

#### **Crecimiento en agar esculina**

El medio que se utilizó fue TSA suplementado con esculina (1 g/l) y citrato férrico (0,5 g/l). Las cepas se inocularon de forma concentrada en un punto de inoculación y se dejaron incubando 24 h, considerándose un resultado positivo la aparición de un halo oscuro alrededor de la zona de inoculación.

#### **Descarboxilación de aminoácidos**

Se utilizó el medio base de Moeller, suplementado al 1 % con lisina, arginina y ornitina respectivamente. Los tubos inoculados se incubaron a 25 °C y se examinaron diariamente durante 7 días. Estos medios, en un principio se ponen amarillos debido a la producción de ácido a partir de la glucosa y posteriormente, si se produce la descarboxilación, el medio se vuelve púrpura (reacción alcalina). Los tubos control (sin aminoácido) y las reacciones negativas permanecen amarillos.

#### **Producción de ácido a partir de glúcidos**

Se utilizó como medio el Caldo Púrpura al que se añadía un 1 % de azúcar (a partir de soluciones al 10 % de los siguientes azúcares: glucosa, xilosa, lactosa, manitol, manosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, trealosa, rafinosa, glicerol, glucógeno, melezitosa,

salicina, sorbitol y sorbosa). Tras la inoculación de las cepas se hizo la lectura a las 24 horas. Las cepas capaces de producir ácido a partir del carbohidrato respectivo viraban el color del indicador hacia amarillo.

### **Sistemas API**

La caracterización de los microorganismos también se realizó mediante el uso de galerías comerciales, con determinados componentes deshidratados, que permiten llevar a cabo múltiples tests bioquímicos estandarizados de manera simultánea. La caracterización se basa en la capacidad de los microorganismos para hidrolizar o modificar los distintos componentes, provocando la aparición de determinados colores indicadores de reacción positiva. Estas galerías están especialmente diseñadas para cada tipo de grupo microbiano y, cuando se usan con fines de identificación, los resultados se comparan con una base de datos comercial.

En este trabajo se usaron los sistemas API 20NE, diseñado para la identificación de bacilos Gram-negativos no enterobacterias, API ZYM, adaptado al estudio de las reacciones enzimáticas y API 50 CH que permite realizar el estudio del metabolismo de hidratos de carbono de los microorganismos, todos ellos de la casa BioMerieux. Se siguieron los protocolos establecidos por el fabricante, excepto en las galerías API 50 CH, dado que no tienen un protocolo comercial para microorganismos Gram-negativos.

Para la preparación de los inóculos de las galerías API 50CH se cultivaron las cepas en placas del medio HIA durante 24 h. A partir de los cultivos puros se preparó una suspensión en solución salina al 0,85 % con una concentración de células equivalente al número 6 en la escala McFarland (aprox.  $1,8 \cdot 10^9$  ufc/ml), de ésta se pasaron 2 ml a un tubo con 20 ml de NB suplementado con 0,02 g/l de púrpura de bromocresol y se llenaron las galerías para finalmente ser incubadas a 25 °C durante 24 horas.

En el caso de las galerías API 20NE y API ZYM los resultados se interpretaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante, mientras que en las galerías API 50CH se consideraron positivos los pocillos en los que se observaba un cambio de color del indicador de pH de púrpura a amarillo, indicativo de la producción de ácido.

### **Tolerancia a las sales biliares**

Se llevó a cabo en medio TSB suplementado con extracto de levadura al 0,6 %, al que se añadían las sales biliares, a partir de una solución al 10 %, para obtener concentraciones finales de 0, 0,2 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 % y 1 %.

### **Prueba de halotolerancia**

Se utilizaron tubos de HI con adición de NaCl para obtener distintas concentraciones finales (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 %). Los tubos se inocularon a partir de un cultivo de 24 horas en TSB y se incubaron a 25 °C durante 24 horas. Se consideraron positivos aquellos tubos que mostraban un crecimiento evidente.

### **Resistencia a antibióticos**

Se utilizó la técnica de difusión en disco, empleando los siguientes antibióticos:

Ácido Nalidixico D (NA) 30 µg, Ampicilina (AP) 10 µg, Carbenicilina (PY) 100 µg, Cefazolina (CZ) 30 µg, Clindamicina (CD) 10 µg, Cloranfenicol (C) 10 µg, Eritromicina (E) 10 µg, Estreptomina (S) 10 µg, Gentamicina (GM) 10 µg, Kanamicina (K) 5 µg, Lincomicina (L) 10 µg, Meticilina (MT) 10 µg, Neomicina (NE) 10 µg, Nitrofurantoina (NI) 300 µg, Novobiocina (NO) 30 µg, Oxacilina (OX) 1 µg, Penicilina G (PG) 2 U, Polimixina B (PB) 300 U, Sulfato de colistina (CO) 25 µg, Tetraciclina (T30) 30 µg, Tobramicina (TN) 10 µg, Trimetoprim (TM) 5 µg y Vancomicina (VA) 5 µg.

Los cartuchos con los discos fueron suministrados por Oxoid.

Las cepas se cultivaron en TSB y, una vez crecidas, se sembraron en toda la superficie de placas de agar Mueller-Hinton (4 mm de profundidad) con un hisopo. Seguidamente se pusieron los discos de antibiótico sobre la zona inoculada y se dejaron incubando 24 horas a 25 °C. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro de las zonas de inhibición aparecidas alrededor de cada disco, si había sensibilidad (S) o, se registró resistencia (R), si no existía halo.

### **Crecimiento en presencia de agentes inhibidores**

Para conocer el efecto de algunos agentes inhibidores sobre *P. immobilis* se determinó la capacidad de crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de los mismos mediante un ensayo turbidimétrico.

Se utilizaron las cepas de colección de *P. immobilis* y dos cepas (RM5 y RM6) obtenidas de muestras de carne de conejo (véase sección de Resultados). Las cepas se cultivaron en caldo HI durante 24 h antes de ser inoculadas en las placas de ensayo.

Los agentes inhibidores sulfato de colistina y feniletanol se prepararon en tampón fosfato salino (PBS, Oxoid) y se dispensaron en caldo BHI a diferentes concentraciones finales (0; 12,5; 25; 50 y 100 µg/ml). El caldo así preparado se dispensó en placas de microtítulo de 100 pocillos del sistema Bioscreen y se inoculó, por quintuplicado (5 pocillos por cepa), con 10 µl del cultivo del microorganismo. El sistema Bioscreen se programó para incubar a temperatura ambiente (22 °C), tomando medidas de la densidad óptica a 600 nm cada 20 minutos durante 28 h.

Los datos obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo para su análisis.

## RESULTADOS

Tras la caracterización inicial de las 117 cepas tomadas al azar de placas de recuento de microorganismos psicrotrofos 12 tenían el perfil típico de *Psychrobacter* (cocobacilos Gram-negativos, oxidasa y catalasa positivos, inmóviles y no fermentadoras). Estas 12 cepas se analizaron mediante el ensayo de transformación, obteniendo un resultado positivo.

En la Tabla I.2 se muestran las cepas de *Psychrobacter* con su referencia y origen.

**Tabla I.2.** Cepas adscritas a la especie *P. immobilis* y aisladas a partir de muestras de alimentos y cepas de colección y cepas patrón utilizadas en este trabajo.

Cepa	Identificación	Origen
RM1	<i>P. immobilis</i>	Conejo
RM2	<i>P. immobilis</i>	Conejo
RM3	<i>P. immobilis</i>	Conejo
RM4	<i>P. immobilis</i>	Conejo
RM5	<i>P. immobilis</i>	Conejo
RM6	<i>P. immobilis</i>	Conejo
SLL1	<i>P. immobilis</i>	Bivalvo
SLL2	<i>P. immobilis</i>	Bivalvo
SLL3	<i>P. immobilis</i>	Bivalvo
SLL4	<i>P. immobilis</i>	Bivalvo
SLL5	<i>P. immobilis</i>	Bivalvo
SLL6	<i>P. immobilis</i>	Bivalvo
1012	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
1071	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
1074	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
1075	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
3294	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
5125	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
6782	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
6783	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
7019	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
7023	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
7062	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
7523	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
7550	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
7551	<i>P. immobilis</i>	Colección BCCM/LMG
5008	<i>P. immobilis</i>	Colección CECT
47113 (Hyx-7)	<i>P. immobilis</i>	Colección ATCC
Ps 7	<i>Pseudomonas fragi</i>	Pescado

Cepa	Identificación	Origen
Ps 8	<i>Pseudomonas fragi</i>	Pescado
Ps 9	<i>Pseudomonas fragi</i>	Pescado
Ps 10	<i>Pseudomonas fragi</i>	Pescado
Ps 18	<i>Pseudomonas fragi</i>	Pescado
Ps 19	<i>Pseudomonas fragi</i>	Pescado
Ps 20	<i>Pseudomonas fragi</i>	Pescado
Ps 23	<i>Pseudomonas fragi</i>	Pescado
Ps 25	<i>Pseudomonas fragi</i>	Pescado

La desaminación de la fenilalanina resultó ser negativa en todas las cepas objeto de estudio excepto en 4 de ellas, RM1, RM2, RM4 Y SLL4. Todas las cepas producían amoniaco a partir de la urea excepto dos de colección, la cepa 5125 y la 6782. Por el contrario, ninguna de ellas producía indol a partir del triptófano.

La capacidad de las cepas para hidrolizar la esculina fue variable, ya que cuatro cepas de colección pertenecientes al género *Psychrobacter immobilis* y dos de las cepas aisladas (RM5 y RM6) no la hidrolizaban.

Las galerías del sistema API 20NE no fueron capaces de identificar ninguno de los aislados correctamente, adscribiéndolos a otros géneros de bacilos Gram-negativos. Los resultados de la producción de ácido a partir de azúcares mediante el sistema API 50 CH mostraron que la mayoría de las cepas eran capaces de formar ácido a partir de la glucosa, xylosa y arabinosa, mientras que la mayor parte de las cepas estudiadas no son capaces de formar ácido a partir de la salicina, sorbosa, rafinosa, glicerol, ramnosa, observándose diferencias en la producción de ácido entre las distintas cepas. Los resultados se muestran en la Tabla I.3

**Tabla I.3.** Producción de ácido de las cepas objeto de estudio a partir de distintos azúcares.

Cepa	Azúcares															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
RM1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
RM2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
RM3	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
RM4	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
RM5	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
RM6	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
SLL1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
SLL2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
SLL3	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-

<b>SLL4</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SLL5</b>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>SLL6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<b>1012</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>1071</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<b>1074</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>1075</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>3294</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>5125</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<b>6782</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<b>6783</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>7019</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<b>7023</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>7062</b>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>7523</b>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<b>7550</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>7551</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<b>5008</b>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Ps7</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>Ps8</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Ps9</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
<b>Ps10</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Ps18</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<b>Ps20</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Ps19</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Ps23</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Ps25</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

**Azúcares:** 1, trealosa; 2, rafinosa; 3, glicerol; 4, glucógeno; 5, melezitosa; 6, salicina; 7, sorbitol; 8, sorbosa; 9, glucosa; 10, xilosa; 11, lactosa; 12, manitol; 13, manosa; 14, galactosa; 15, arabinosa; 16, ramnosa.

En relación a la actividad enzimática que presentan las bacterias objeto de estudio, se apreció que todas las cepas ensayadas eran positivas para la fosfatasa alcalina, esterasa y esterasa lipasa. Para el resto de las actividades se apreciaron diferencias entre las distintas cepas, sin observar ningún patrón específico.

**Tabla I.4.** Perfil individual de actividad enzimática de cepas de *Psychrobacter immobilis* y *Pseudomonas fragi*.

Cepa	Enzimas estudiadas																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<b>RM1</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>RM2</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>RM3</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-

Cepa	Enzimas estudiadas																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
RM4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RM5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
RM6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
SLL1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SLL2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SLL3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SLL4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SLL5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SLL6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1012	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1071	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1074	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
1075	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3294	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5125	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6782	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6783	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7019	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7023	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7062	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7523	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7550	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7551	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5008	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
Ps9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps10	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps18	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps20	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps23	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

**Enzimas:** 1: fosfatasa alcalina; 2: esterasa; 3: esterasa lipasa; 4: lipasa; 5: leucina arilamidasa; 6: valina arilamidasa; 7: cistina arilamidasa; 8: tripsina; 9:  $\alpha$ -quimotripsina; 10: fosfatasa ácida; 11: naftol-AS-BI-fosfohidrolasa; 12:  $\alpha$ -galactosidasa; 13:  $\beta$ -galactosidasa; 14:  $\beta$ -glucoronidasa; 15:  $\alpha$ -glucosidasa; 16:  $\beta$ -glucosidasa; 17: N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa; 18:  $\alpha$ -manosidasa; 19:  $\alpha$ -fucosidasa.

La mayoría de las cepas de *Psychrobacter* procedentes de colecciones de cultivo resultaron ser sensibles a un 1 % de sales biliars, excepto las cepas 6782 y 7062, mientras que las cepas aisladas de muestras de alimentos eran resistentes a esta concentración. Además, todas ellas toleraban hasta un 8 % de NaCl, excepto las cepas 7551 y RM6 que sólo toleraban hasta un 5 %.

Todas las cepas de *Psychrobacter* fueron sometidas al ensayo de resistencia/sensibilidad a antibióticos, como se muestra en la Tabla I.5, encontrándose las mayores resistencias con los siguientes compuestos: lincomicina, oxacilina, tobramicina, clindamicina y sulfato de colistina.

**Tabla I.5.** Resistencia/sensibilidad de las cepas de *Psychrobacter* frente a distintos antibióticos, expresado como diámetro del halo de inhibición en mm (R: resistente).

Cepa	Antibióticos																						
	NEL	PY	NO	OX	PG	PB	S	T	TN	TM	VA	NA	AP	CZ	C	CD	CON	T	K	GM	E	NI	
RM1	26	R	26	10	R	26	18	R	26	26	16	10	26	26	26	26	R	18	16	26	26	16	18
RM2	26	R	26	16	R	10	18	R	8	26	R	12	26	14	26	10	R	22	R	R	12	26	16
RM3	20	R	R	R	R	R	20	18	24	24	R	R	R	8	R	8	8	8	8	R	R	R	R
RM4	26	R	26	22	R	26	26	26	26	26	14	16	26	26	26	26	R	24	26	26	26	26	18
SLL1	26	R	26	14	R	26	26	26	26	26	10	14	26	26	26	26	R	20	26	26	26	26	26
SLL2	26	R	26	16	R	26	26	26	26	26	12	14	26	26	26	26	R	18	26	26	26	26	26
SLL3	26	R	26	26	R	26	26	26	16	26	18	16	26	26	26	26	R	26	26	26	26	26	26
SLL4	26	R	26	16	R	26	26	26	26	16	12	16	26	26	R	26	R	18	12	26	26	26	26
SLL5	26	R	26	26	R	26	26	26	26	26	10	16	26	26	26	26	R	26	26	26	26	26	16
SLL6	26	R	26	12	R	26	32	26	26	26	R	14	26	26	10	26	R	16	26	26	26	26	18
1012	20	R	16	16	R	12	8	18	10	20	R	18	26	12	14	16	R	R	12	24	22	26	18
1071	26	R	40	16	12	36	20	20	R	26	10	10	28	38	26	26	R	16	28	28	28	18	16
1074	24	R	40	18	12	36	18	20	10	26	10	12	24	42	30	26	R	16	18	26	28	16	14
1075	20	R	12	20	R	10	10	R	22	20	R	18	24	12	14	24	18	R	12	20	20	26	18
3294	20	R	14	20	R	2	8	16	24	16	R	16	24	10	14	24	14	R	12	24	18	26	20
5125	20	R	28	14	R	10	36	42	20	24	8	12	24	34	28	26	R	16	16	32	32	12	14
6782	18	R	12	20	R	8	8	16	22	18	R	18	24	10	14	24	20	R	14	20	24	26	20
6783	22	R	40	14	8	30	18	24	28	24	12	14	30	36	36	38	10	16	18	26	26	24	14
7019	24	R	30	12	R	28	18	20	26	22	R	16	26	34	36	44	R	18	20	26	26	24	12
7023	24	R	36	12	R	32	16	20	24	26	R	12	26	32	32	36	R	16	18	28	26	24	12
7062	22	R	30	14	R	24	16	22	20	26	10	10	26	30	32	28	R	24	R	34	36	14	14
7523	18	R	12	16	R	10	8	14	20	16	R	14	22	10	12	22	10	R	10	18	16	18	14
7550	24	R	42	20	R	38	20	24	24	30	12	14	34	38	32	30	12	18	20	34	30	22	22
7551	20	R	12	22	R	12	8	16	24	18	R	18	24	12	14	24	38	R	26	22	26	24	20

**Antibióticos:** NE: neomicina; L: lincomicina; PY: carbenicilina; NO: novobiocina; OX: oxacilina; PG: penicilina G; PB: polimixina B; S: estreptomina; T: tetraciclina;

TM: tobramicina; TM: trimetoprim; VA: vancomicina; NA: ácido nalidíxico; AP: ampicilina; CZ: cefazolina; C: cloramfenicol; CD: clindamicina; CO: sulfato de colistina; NT: meticilina; K: kanamicina; GM: gentamicina; E: eritromicina; NI: nitrofurantóina.

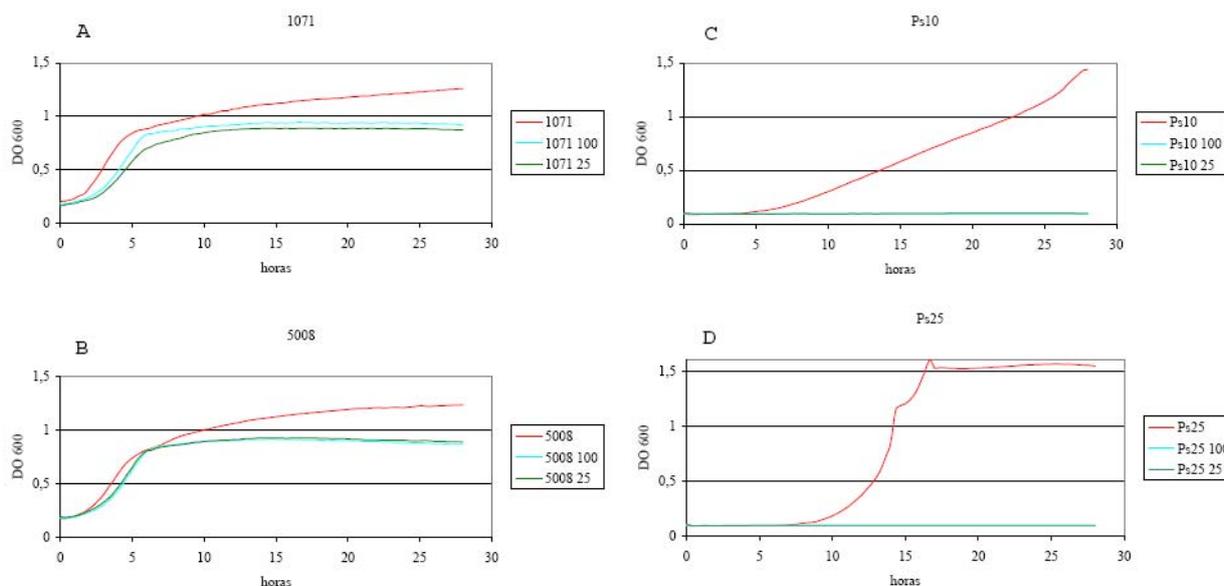
Las cepas patrón de *Pseudomonas fragi* se probaron únicamente frente a estos cinco antibióticos, como se muestra en la Tabla I.6.

**Tabla I.6.** Resistencia/sensibilidad frente a cinco antibióticos de las cepas de *Pseudomonas fragi*.

Cepa	Antibióticos				
	L	OX	TM	CD	CO
<b>Ps 7</b>	R	R	R	R	16
<b>Ps 8</b>	R	R	R	R	14
<b>Ps 9</b>	R	R	R	R	16
<b>Ps 10</b>	R	R	R	R	12
<b>Ps 18</b>	R	R	R	R	R
<b>Ps 19</b>	R	R	R	R	14
<b>Ps 20</b>	R	R	R	R	R

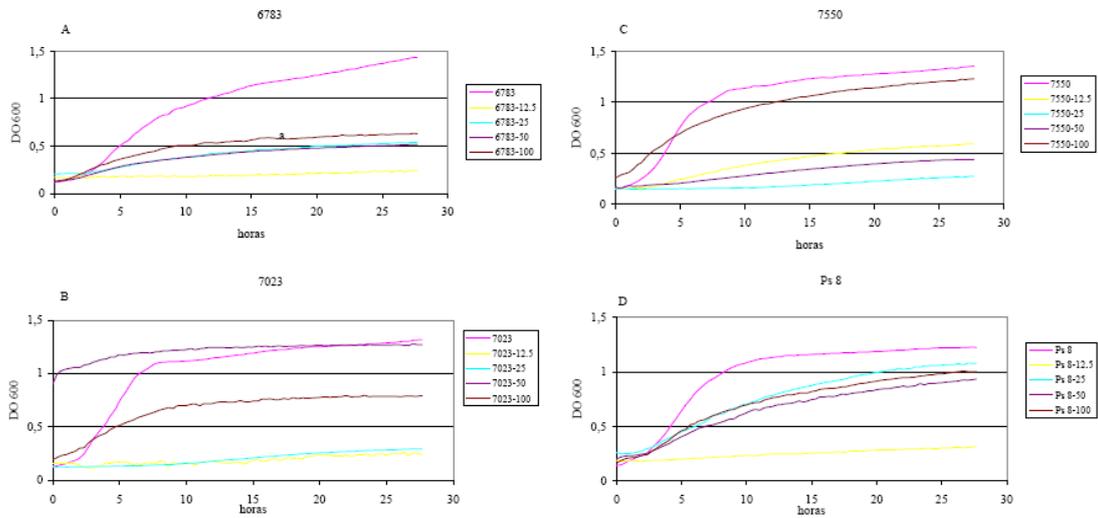
**Antibióticos:** L: lincomicina; OX: oxacilina; TM: tobramicina; CD: clindamicina; CO: sulfato de colistina.

Por lo que se refiere al comportamiento en presencia de agentes inhibidores, las cepas de *Psychrobacter* crecieron bien en presencia de las concentraciones ensayadas de sulfato de colistina, alcanzando una densidad óptica ligeramente inferior a la del control, como se muestra, a modo de ejemplo con dos cepas de *Psychrobacter*, en la Figura I.2 (A y B), mientras que las cepas de *Pseudomonas* fueron totalmente inhibidas por el mismo agente (Figura I.2, C y D).



**Figura I.2.** Influencia del sulfato de colistina en el crecimiento de dos cepas de *Psychrobacter immobilis* y dos cepas de *Pseudomonas fragi* a dos concentraciones del compuesto, 25  $\mu\text{g/ml}$  y 100  $\mu\text{g/ml}$ . A: Cepa de *P. immobilis* 1071; B: Cepa de *P. immobilis* 5008; C: Cepa de *P. fragi* Ps10; D: Cepa de *P. fragi* Ps25.

El comportamiento de las cepas de *Psychrobacter* y de *Pseudomonas* en presencia de feniletanol fue errático, observándose en muchos casos inhibición del crecimiento a concentraciones bajas del compuesto. A modo de ejemplo en la Figura I.3 se muestran los datos medios obtenidos con tres cepas de *Psychrobacter immobilis* y una cepa de *Pseudomonas fragi*.



**Figura I.3.** Influencia del feniletanol en el crecimiento de tres cepas de *Psychrobacter immobilis* y una cepa de *Pseudomonas fragi* a cuatro concentraciones del compuesto, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml. A: Cepa de *P. immobilis* 6783; B: Cepa de *P. immobilis* 7023; C: Cepa de *P. immobilis* 7550; D: Cepa de *P. fragi* Ps25.

## DISCUSIÓN

De las 117 cepas seleccionadas al azar de las placas de recuento de microorganismos psicrotrofos, solamente 12 pudieron ser adscritas finalmente al género *Psychrobacter* en base a una prueba definitiva, como es la transformación genética. Este resultado supone una incidencia del 10,2 %, que es una cifra baja, pero superior a la citada en alimentos proteicos (5 % o inferior) (García-López *et al.* 1998; García-López and Prieto 1999). Teniendo en cuenta la forma aleatoria de llevar a cabo la selección de las cepas y el número similar de muestras y de cepas obtenidas de los distintos orígenes, se puede concluir que el dato obtenido es un reflejo fiel de la incidencia real en carne de conejo y en moluscos bivalvos. Todas las cepas adscritas al género *Psychrobacter* se consideraron como pertenecientes a la especie *P. immobilis* por sus características fenotípicas, pero también por la escasez de datos fenotípicos del resto de especies descritas. Hay que considerar que al inicio de este trabajo sólo se consideraban 5 especies de este género, mientras que en la actualidad se reconocen 29 especies (Euzéby 2009). Cabe destacar que en las descripciones de las nuevas especies no es habitual hacer referencia a la capacidad de transformación y complementación del mutante Hyx-7. Aunque quede fuera del alcance de esta memoria, es importante tener en consideración que la descripción de nuevas especies es, en muchas ocasiones, insuficiente, y este hecho causa, como ya ha sido manifestado por otros autores (Janda and Abbott 2002), bastantes problemas a los laboratorios de diagnóstico microbiológico.

La descripción de nuevas especies de *Psychrobacter* se lleva a cabo principalmente por técnicas genéticas y se realiza también una caracterización fenotípica para la que se suelen emplear galerías comerciales, como las galerías API 20E o API 20NE (véase, entre otros, Bowman *et al.* 1997; Maruyama *et al.* 2000; Yoon *et al.* 2003). Sin embargo, las especies de *Psychrobacter* son bastante inertes desde el punto de vista bioquímico, y eso hace que la mayor parte de las reacciones de las galerías sean negativas (Bowman 2006) y además estas nuevas especies no son añadidas a las base de datos de estas galerías, por lo que su uso para la identificación rutinaria de estos microorganismos no es aconsejable; de hecho, en la base de datos Apiweb

(<https://apiweb.biomerieux.com>) solamente figura la especie *P. phenylpiruvicus*, debido a que anteriormente estaba incluida en el género *Moraxella*.

En este trabajo, el uso de las galerías estuvo encaminado a recabar datos fenotípicos, no con fines de identificación, pero la introducción de los bionúmeros obtenidos con las galerías API 20NE en la base de datos APILAB identificó al 70,6 % de las cepas analizadas como *Pasteurella multocida* y un 23,53 % presentaban una baja discriminación aunque el microorganismo más próximo era *Pasteurella* spp.

Además de contribuir a la caracterización fenotípica de *Psychrobacter*, otro objetivo del uso de las galerías era el de poner de manifiesto diferencias genéricas entre las cepas de *Psychrobacter* y las de *Pseudomonas* que sean de utilidad a la hora de diferencias entre ambas.

En las Tablas I.3 y I.4 se muestran los resultados obtenidos para la producción de ácido a partir de azúcares y de actividades enzimáticas. Se puede observar que existen diferencias entre cepas, pero ningún compuesto da un resultado uniforme en todas las cepas de *Psychrobacter* que además sea de signo contrario en las cepas de *Pseudomonas*. Asimismo, la actividad enzimática de las cepas de *Psychrobacter* fue escasa, destacando sobre todo las actividades relacionadas con el metabolismo lipídico (esterasa, esterasa lipasa y lipasa) que abren interesantes posibilidades para su detección rápida, como veremos en posteriores secciones de esta memoria.

Los patrones observados de resistencia/sensibilidad frente a los antibióticos son muy similares, independientemente del origen de las cepas (Tabla I.5). Las cepas fueron resistentes a lincomicina, oxacilina, tobramicina y clindamicina y, en menor medida, al sulfato de colistina. De nuevo con el fin de poner de manifiesto diferencias genéricas, estos cinco compuestos se probaron frente a las cepas de *Pseudomonas*, observándose (Tabla I.6) que también son resistentes a los cuatro primeros y sensibles al sulfato de colistina. Por esta razón, se decidió estudiar con mayor detalle el comportamiento de las cepas durante el crecimiento en caldo en presencia de este compuesto, así como del feniletanol, que es una sustancia que se considera inhibidora para las bacterias Gram-negativas (Hedberg 1969).

Como se aprecia en la Figura I.1, las cepas de *Psychrobacter* fueron capaces de multiplicarse activamente en presencia de sulfato de colistina, que sin embargo resultó

bastante inhibitorio para las cepas de *Pseudomonas*. Este resultado es interesante para el objetivo de encontrar sistemas que permitan diferenciar rápidamente ambos géneros.

El feniletanol afectó de diferente manera a las cepas, siendo bastante inhibitorio para *Psychrobacter* y, curiosamente, con mayor capacidad de inhibición a concentraciones bajas. Este mismo fenómeno se observa con las cepas de *Pseudomonas*, aunque éstas fueron capaces de multiplicarse activamente a concentraciones de feniletanol superiores a 25 µg/ml. Estos datos son curiosos, ya que, aunque la capacidad del feniletanol para inhibir un espectro amplio de bacterias (y la relativa resistencia de especies del género *Pseudomonas*) es bien conocida (Fraud *et al.* 2003), habitualmente se emplea en concentraciones mucho más elevadas (0,2 %) de las utilizadas en este trabajo (0,01 % en la concentración más alta usada).

En resumen, en este capítulo se ha demostrado la baja prevalencia de las bacterias del género *Psychrobacter* en alimentos proteicos, resaltando las dificultades para su aislamiento, por la ausencia, o desconocimiento, de características específicas de fácil detección. Además, se ha conseguido una colección inicial de microorganismos que ha sido caracterizada de forma homogénea, en lo que se refiere a sus características fenotípicas y a sus actividades enzimáticas y de resistencia/susceptibilidad a antimicrobianos. La baja incidencia de *Psychrobacter*, junto con la ausencia de capacidad competitiva de esta bacteria sugiere que no puede ser considerado como un agente que participe activamente en la alteración de los alimentos proteicos almacenados a refrigeración.

**Capítulo II. Posibles factores de virulencia en cepas de  
*Psychrobacter* spp. de diferentes orígenes**



## INTRODUCCIÓN

Se considera patógeno a todo agente infeccioso que puede comportarse como parásito y causar una lesión o alteración patológica a nivel celular, tisular u orgánica, en el hospedador al que infecta. El daño producido en el hospedador puede deberse tanto a la acción directa del microorganismo como a la reacción promovida en el hospedador.

Sólo una pequeña proporción de los microorganismos asociados con el ser humano y los animales pueden causar enfermedades. La infectividad de un microorganismo puede definirse como la capacidad que éste posee para adaptarse a vivir dentro del hospedador. La patogenicidad se refiere a la capacidad del microorganismo para producir la enfermedad en el organismo infectado. La virulencia, en cambio, se utiliza como un término cuantitativo para indicar el grado relativo de patogenicidad de un determinado microorganismo. Los determinantes de virulencia de un microorganismo consisten en un conjunto de caracteres genéticos, bioquímicos y componentes estructurales, que les permiten ocasionar un daño al hospedador y establecer la relación de parasitismo que sigue a la infección (Finlay and Falkow 1989; Madigan *et al.* 1997).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el género *Psychrobacter* se encuentra en ambientes naturales y alimentos proteicos refrigerados. Habitualmente se relacionan con la alteración de estos últimos y, a pesar de que ocasionalmente se han aislado de caso clínicos (Gini 1990; Lloyd-Puryear *et al.* 1991; Lozano *et al.* 1994; Guttigoli and Zaman 2000; Leung *et al.* 2006; Musaad *et al.* 2007; Stepanovic *et al.* 2007), hay muy pocos datos sobre su significación como patógeno humano. Los casos reseñados hasta el momento han sido causados por *P. immobilis* y *P. phenylpiruvicus*, aunque también *P. submarinus* puede participar como patógeno oportunista.

En la mayoría de estos casos clínicos las bacterias del género *Psychrobacter* actuaban como patógenos oportunistas, en pacientes que además presentaban otros problemas de salud (inmunodepresión, otras infecciones, heridas quirúrgicas) y sólo en una circunstancia la infección fue provocada por la ingestión de alimentos, concretamente una almeja panopea cruda, pero también se trataba de un paciente con serios problemas hepáticos (Leung *et al.* 2006).

Las bacterias de este género, por el momento, se consideran patógenos oportunistas, con escasa virulencia intrínseca, no existiendo suficientes datos acerca de su capacidad

para expresar características habitualmente asociadas con la virulencia (García-López and Prieto 1999; Bowman 2006).

El primer paso en la infección es la adherencia del patógeno a una célula “diana” del huésped. En su forma más sencilla, esto implica un receptor (habitualmente un carbohidrato) en la célula huésped y una adhesina (estructura proteica superficial) en el patógeno (Finlay and Falkow 1989). En el caso del género *Psychrobacter* es posible que las numerosas fimbrias que aparecen en su superficie sean las moléculas que participan en esta unión (Bowman 2006).

Una vez que el patógeno se ha establecido en el hospedador, debe multiplicarse para producir la infección. El crecimiento del patógeno depende de las condiciones ambientales y de la disponibilidad de nutrientes que encuentre en el hospedador. Muchos microorganismos necesitan hierro y otros elementos para su crecimiento (ciertos azúcares, aminoácidos), que normalmente no abundan en los tejidos del hospedador. Los microorganismos patógenos pueden producir enzimas extracelulares que les sirven para la adquisición de nutrientes, para evadir las defensas del huésped o para destruir estructuras orgánicas y facilitar la invasión de tejidos (proteasas, lipasas) y también sideróforos (proteínas de bajo peso molecular), que actúan como complejos quelantes secuestrando el hierro ligado a la transferrina o a otros compuestos presentes en el hospedador.

Por tanto, la producción de estos compuestos es indicativa del potencial patogénico de un microorganismo. La detección de estas actividades en el laboratorio es, en muchos casos, sencilla, ya que las actividades enzimáticas se pueden poner de manifiesto empleando un sustrato adecuado (proteínas, lípidos) o una diana celular, como pueden ser eritrocitos (Madigan *et al.* 1997).

El objetivo del presente capítulo es el de investigar la presencia de posibles factores de virulencia en las cepas de *Psychrobacter* mediante la determinación de actividades lipolíticas, proteolíticas, hemolíticas y de producción de sideróforos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Microorganismos, medios y reactivos***

Se utilizaron las cepas de *Psychrobacter immobilis* y *Pseudomonas fragi* listadas en la Tabla I.2, así como una cepa de colección de *Escherichia coli* (CECT 679) como control positivo para la producción de sideróforos. El mantenimiento y la preparación de los cultivos de trabajo se realizaron como se indicó en el capítulo I.

Los medios de cultivo comerciales se obtuvieron de la casa Oxoid. Los reactivos químicos de calidad analítica fueron adquiridos a las casas Merck, Sigma-Aldrich y Panreac.

### ***Pruebas relacionadas con la actividad lipolítica y proteolítica***

#### **Hidrólisis de la tributirina**

Se sembraron las cepas en la superficie de placas de Agar Tributirina y se incubaron durante 96 horas. La aparición de un halo de aclaramiento alrededor de la colonia se interpretó como indicativo de la actividad lipolítica (Gray and Stewart 1980).

#### **Hidrólisis del Tween 80**

Esta prueba se llevó a cabo en un medio nutritivo con Tween 80 al 1 % (Cowan and Steel 1974) inoculando las cepas de forma concentrada en un punto de inoculación. La incubación se llevó a cabo en dos condiciones diferentes: durante 3 días a 25 °C y 9 días a 4,5 °C. Tras la incubación se observaron las placas y aquellas cepas que presentaban una zona de precipitación a su alrededor se consideraron positivas.

#### **Actividad lecitinasa**

Se utilizó Agar Nutritivo con NaCl al 0,9 %, al que, una vez esterilizado y atemperado a 45 °C, se le añadió una emulsión de yema de huevo al 10 %, repartiéndolo en placas de Petri estériles inmediatamente. Las cepas, procedentes de un cultivo de trabajo en caldo HI, se inocularon de forma concentrada en un punto de inoculación. Las placas se incubaron durante 96 horas. La reacción se consideró positiva cuando apreciaba la formación de halo opaco alrededor de la zona de crecimiento (Harrigan 1998).

### **Hidrólisis de la caseína**

El medio empleado era el resultado de la mezcla, a partes iguales, de agar nutritivo a doble concentración y leche desnatada al 10 %. Las placas se inocularon a partir de un cultivo de trabajo en caldo HI haciendo una estría a través de la superficie. La presencia de halos de aclaramiento alrededor de la zona de crecimiento se consideró debida a la hidrólisis de la caseína (Collins and Lyne 1984; Harrigan 1998).

### **Actividad elastolítica**

Se determinó en un medio nutritivo con 1 % de elastina (Santos *et al.* 1999). Las placas se inocularon en un punto y se incubaron durante 3 días. Posteriormente se inundaron con ácido tricloroacético al 10 % para precipitar la elastina no degradada y poner de manifiesto la presencia de halos de aclaramiento.

### ***Pruebas relacionadas con la actividad hemolítica y la producción de sideróforos***

#### **Actividad hemolítica**

Esta prueba se llevó a cabo sobre agar nutritivo al que se le adicionaba sangre de conejo, oveja, perro, yegua o vaca, obtenida de casas comerciales y de animales del servicio del animalario de la Universidad de León, aunque no siempre se pudo obtener sangre de todos los animales a la vez por problemas de coagulación o porque los animales no estaban en condiciones de extraerles sangre. El medio utilizado fue agar nutritivo estéril que se atemperaba a 45 °C antes de suplementarlo con un 5 % de eritrocitos de la especie correspondiente. Las placas así obtenidas se inocularon e incubaron durante 72 horas. Se consideraron hemolíticas aquellas cepas en las que aparecía un halo de aclaramiento alrededor de la zona de siembra como resultado de la lisis total de los eritrocitos presentes en el medio (Santos *et al.* 1999; González-Rodríguez *et al.* 2007).

#### **Incorporación de agar rojo congo**

El medio se formuló con agar nutritivo con la adición de 0,003 % de Rojo Congo. Tras la esterilización a 121 °C/15 minutos, se realizó una siembra por agotamiento en la superficie del medio para después incubar a 25 °C durante 72 horas. La incorporación de Rojo Congo se manifiesta en un color rojo de las colonias (Surgalla and Beesley 1969).

**Producción de sideroforos**

La detección de la producción de sideróforos se llevó a cabo en el medio Blue agar de Schwyn y Neiland (1987) con las modificaciones de Barghouti et. al. (1989). Este medio lleva incorporado un compuesto, Chrome Azurol S (CAS), que presenta un fuerte color azul cuando está formando un complejo con el hierro; cuando un quelante captura el hierro de este complejo el colorante cambia de azul a naranja. Las cepas se inoculan en un punto y se incuban durante 72 horas. Se consideran positivas aquellas cepas que aparecen de color anaranjado con un halo alrededor del mismo color.

## RESULTADOS

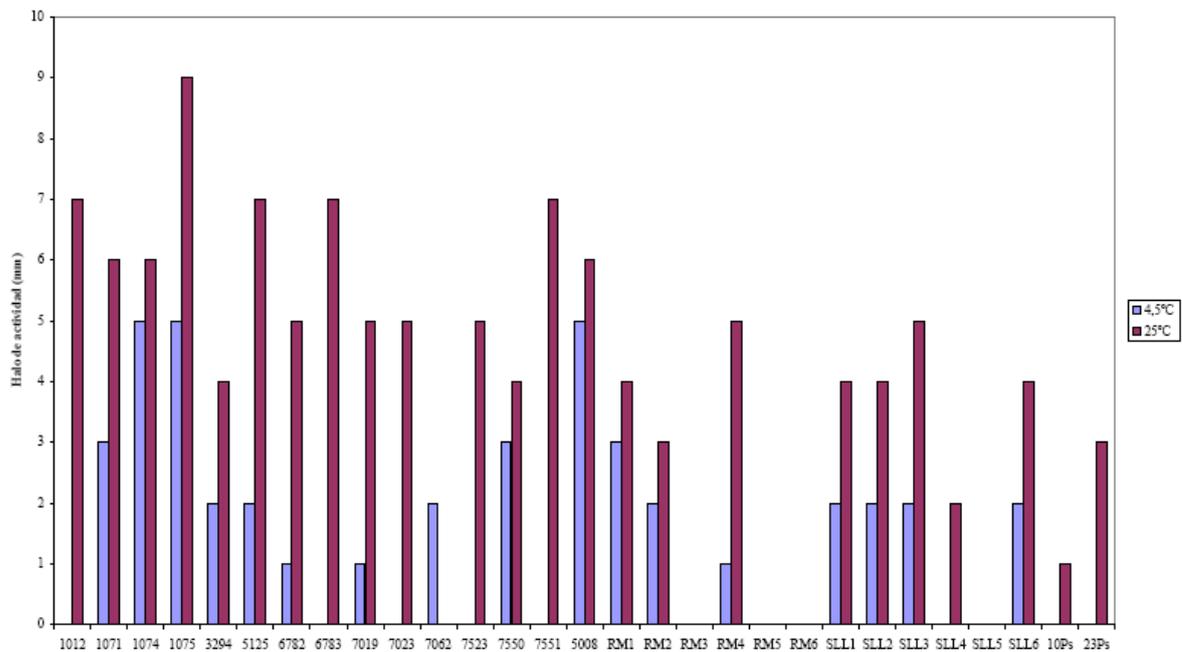
Sólo seis de las cepas de *Psychrobacter* aisladas en el curso de este trabajo (4 obtenidas de muestras de carne conejo y dos de moluscos bivalvos) mostraron actividad lecitinasas; por el contrario, todas las cepas de *Psychrobacter* hidrolizaron la tributirina, mientras que ninguna de las cepas de *Pseudomonas* fue capaz de hacerlo (Tabla II.1). Todas, excepto 5, mostraron actividad lipolítica en Agar Tween 80 a 25 °C y un débil efecto sobre este sustrato cuando se incubaron a 4,5 °C, mientras que sólo dos de las cepas de *Pseudomonas* hidrolizaron el Tween 80 a 25 °C, pero ninguna fue capaz de hacerlo a 4,5 °C (Figura II.1).

En cuanto a las actividades proteolíticas, ninguna de las cepas ensayadas pudo hidrolizar la elastina, mientras que la mayoría de las cepas de *Psychrobacter immobilis* (22 de 27) fueron caseinolíticas, pero sólo 1 cepa de *Pseudomonas* hidrolizó este sustrato (Tabla II.1).

**Tabla II.1.** Actividades lipolíticas y proteolíticas sobre diversos sustratos

	<b>Tributirina</b>	<b>Lecitina</b>	<b>Elastina</b>	<b>Caseína</b>
<b>RM1</b>	+	+	-	+
<b>RM2</b>	+	+	-	-
<b>RM3</b>	+	+	-	+
<b>RM4</b>	+	+	-	+
<b>RM5</b>	+	-	-	-
<b>RM6</b>	+	-	-	-
<b>SLL1</b>	+	-	-	+
<b>SLL2</b>	+	-	-	+
<b>SLL3</b>	+	-	-	+
<b>SLL4</b>	+	+	-	+
<b>SLL5</b>	+	+	-	+
<b>SLL6</b>	+	-	-	+
<b>1012</b>	+	-	-	+
<b>1071</b>	+	-	-	+
<b>1074</b>	+	-	-	+
<b>1075</b>	+	-	-	-
<b>3294</b>	+	-	-	-
<b>5125</b>	+	-	-	+
<b>6782</b>	+	-	-	+
<b>6783</b>	+	-	-	+
<b>7019</b>	+	-	-	+
<b>7023</b>	+	-	-	+

	Tributirina	Lecitina	Elastina	Caseína
<b>7062</b>	+	-	-	+
<b>7523</b>	+	-	-	+
<b>7550</b>	+	-	-	+
<b>7551</b>	+	-	-	+
<b>5008</b>	+	-	-	+
<b>Ps7</b>	-	-	-	-
<b>Ps8</b>	-	-	-	-
<b>Ps9</b>	-	-	-	-
<b>Ps10</b>	-	-	-	-
<b>Ps18</b>	-	-	-	-
<b>Ps19</b>	-	-	-	-
<b>Ps20</b>	-	-	-	-
<b>Ps23</b>	-	-	-	+
<b>Ps25</b>	-	-	-	-



**Figura II.1.** Actividad sobre el Tween 80 de cepas de *Psychrobacter* y *Pseudomonas* a 4,5 °C y 25 °C.

En relación con la actividad hemolítica sobre sangre de distintas especies, la mayoría de las cepas de *Psychrobacter immobilis* (27 cepas) fueron hemolíticas sobre sangre de perro (26 cepas), conejo (25 cepas), oveja (25 cepas) y yegua (24 cepas) pero ninguna sobre sangre de vacuno como se observa en la Tabla II.2.

Sin embargo, las cepas de *Pseudomonas* no fueron hemolíticas, con la excepción de Ps8, que lisó los eritrocitos de oveja.

**Tabla II.2.** Actividad hemolítica de las cepas objeto de estudio frente a eritrocitos de diferentes especies.

Cepa	Perro	Conejo	Oveja	Yegua	Vaca
RM1	+	+	+	+	-
RM2	+	+	+	+	-
RM3	+	+	+	+	-
RM4	+	+	+	+	-
RM5	+	+	+	+	-
RM6	+	+	+	+	-
SLL1	+	+	+	+	-
SLL2	+	+	+	+	-
SLL3	+	+	+	+	-
SLL4	+	+	+	+	-
SLL5	+	-	+	+	-
SLL6	+	+	+	+	-
1012	+	+	+	+	-
1071	+	+	+	-	-
1074	+	+	+	+	-
1075	+	-	+	+	-
3294	+	+	+	+	-
5125	+	+	+	+	-
6782	+	+	+	+	-
6783	+	+	+	+	-
7019	+	+	+	-	-
7023	+	+	+	+	-
7062	+	+	+	+	-
7523	-	+	+	-	-
7550	+	-	+	+	-
7551	+	+	+	+	-
5008	+	+	+	+	-

Al mismo tiempo, todas las cepas estudiadas (*Psychrobacter immobilis* y *Pseudomonas fragi*) fueron capaces de incorporar el rojo Congo y de producir sideróforos, aunque es destacable que la incorporación del rojo Congo era mucho más rápida en las cepas de *Psychrobacter* que en las de *Pseudomonas* (48 horas las primeras, frente a 72 horas las segundas) y de mayor intensidad, observándose colonias claramente coloreadas.

## DISCUSIÓN

La actividad de las enzimas extracelulares es un buen indicio de la virulencia de las bacterias patógenas, aunque su sola presencia no quiere decir que una bacteria sea realmente patogénica. Su papel fundamental está relacionado con la adquisición de nutrientes, la evasión de los mecanismos defensivos del huésped y la invasión de tejidos (Finlay and Falkow 1989). Como ya se ha comentado, *Psychrobacter* es un patógeno oportunista humano, aunque no se conocen los mecanismos por los que ejerce su virulencia.

La acción de las cepas de *Psychrobacter* sobre los diferentes sustratos lipídicos, indica que son cepas que se pueden considerar lipolíticas, aunque existen diferencias en la manifestación de dicha actividad. Así la tributirina es fácilmente degradada, al igual que el Tween 80. Estos resultados están en consonancia con las actividades enzimáticas estudiadas en el capítulo anterior y en las evidencias que indican que estas bacterias son más frecuentes en las partes grasas de los alimentos de origen animal (García-López and Prieto 1999). Además, algunas de estas actividades no están presentes, o tienen una baja incidencia, en las cepas de *Pseudomonas*, lo que es de interés en la diferenciación de estos microorganismos.

Seis de las cepas aisladas durante la realización de este trabajo mostraron actividad lecitinasa. La hidrólisis de la lecitina indica actividad fosfolipasa y esto se relaciona con los mecanismos de virulencia bacterianos, ya que es una de las formas que tienen las bacterias de degradar las membranas celulares (Harshman 1988). Los datos recogidos en la bibliografía señalan que esta actividad lecitinasa no es habitual en las especies de *Psychrobacter*, aunque se considera que puede manifestarse en gran parte de las cepas de *P. immobilis*, *P. luti* y *P. glacincola* (Bozal *et al.* 2003).

La mayoría de las cepas de *P. immobilis* eran capaces de hidrolizar la caseína, que tampoco es un sustrato habitualmente degradado por las especies de este género, con la excepción de *P. proteolyticus* y *P. luti* (Denner *et al.* 2001; Bozal *et al.* 2003). Por el contrario, la elastina no fue degradada por ninguna de las cepas ensayadas.

Las proteasas son moléculas importantes en la virulencia de muchos patógenos bacterianos por su acción directa sobre moléculas, tejidos, estructuras o defensas del huésped, también como activadores de otras toxinas y factores de virulencia o por simular la acción de otras proteasas reguladoras de zimógenos en el huésped (Goguen *et*

al. 1995; Maeda 1996; Lantz 1997). Sin embargo, no hay una metodología sencilla para determinar la actividad de proteasas que puedan estar relacionadas con virulencia, sobre todo por el desconocimiento de sustratos específicos que puedan poner de manifiesto este potencial patógeno (Goguen *et al.* 1995). En este sentido, la capacidad de degradar la caseína (proteína de la leche), pero no la elastina (proteína del tejido conectivo), sugiere que las cepas de *Psychrobacter* utilizadas en esta investigación tienen más capacidad de alterar alimentos que de invadir tejidos humanos; es importante tener presente que la elastina presenta una secuencia con numerosos aminoácidos poco comunes, lo que hace que su degradación se vea dificultada por los mecanismos proteolíticos habituales (Mithieux and Weiss 2005).

La mayoría de las cepas presentaban actividad beta-hemolítica cuando se ensayaban en placas de agar sangre con eritrocitos de conejo, oveja, perro y yegua, pero no de vacuno. La observación de la actividad hemolítica es una forma sencilla de poner de manifiesto la acción de toxinas citolíticas, ya que el resultado es claro y evidente sobre una placa de cultivo, pero hay autores que indican que la sensibilidad frente a una hemolisina concreta puede variar en los eritrocitos de diversos orígenes, o incluso en eritrocitos de una especie, pero obtenidos de individuos distintos (Harshman 1988). Esto puede explicar algunas diferencias observadas en diferentes repeticiones de los experimentos o la consideración de hemolíticas o no de algunas cepas. Los resultados más uniformes se observaban sobre eritrocitos de oveja, que, por tanto, serían los más adecuados para estudiar la actividad hemolítica de *Psychrobacter spp.*

La actividad hemolítica se correlaciona con la incorporación de rojo Congo. Se ha propuesto que existe un sitio común de unión de la hematina y el rojo Congo (Surgalla and Beesley 1969), siendo más sencillo y homogéneo observar la incorporación de este colorante, ya que no está sujeto a las variaciones que pueden ocurrir con los eritrocitos, como ya se comentó. Esta relación de la capacidad de incorporar rojo Congo con la actividad hemolítica también se ha observado en otras bacterias patógenas en las que se supone que las hemolisinas son factores de virulencia (Tiwari *et al.* 2002). Por otro lado, en estos experimentos se han puesto de manifiesto diferencias en la actividad de incorporación de este compuesto entre las cepas de *Psychrobacter* y las de *Pseudomonas*, lo que abre otra posibilidad de diferenciación entre ambos microorganismos.

Otro mecanismo de obtención de hierro es mediante la producción de sideróforos. Estos agentes quelantes pueden unir hierro presente en muy bajas concentraciones. Debido a que la mayor parte de las sales inorgánicas son altamente insolubles, muchos microorganismos producen estos agentes para unir hierro de una manera muy específica, ya que solubilizan las sales de hierro transportándolo al interior celular y también les ayudan a obtener hierro a partir del ambiente (Roth 1988). Las cepas de *Psychrobacter* son productoras de sideróforos “in vitro”, por lo que se puede concluir que se trata de un microorganismo que posee diversos sistemas de obtención de hierro.

Como conclusión, por lo estudiado en este capítulo, las cepas de *Psychrobacter* presentan varias actividades (lipolíticas, proteolíticas y de captación de hierro) que en otros microorganismos se relacionan con la patogenicidad. Hay que considerar, sin embargo, que no todas las bacterias que presentan características asociadas con la virulencia necesariamente expresan ésta “in vivo”, como se ha visto en otras bacterias patógenas Gram negativas, como *Aeromonas* o *Yersinia* (Kirov *et al.* 1993; Revell and Miller 2001). Sería necesario ampliar los estudios del género *Psychrobacter* para conocer en profundidad los factores que pueden afectar a la expresión de estas actividades.



### **Capítulo III. Estudio filogenético de cepas de *Psychrobacter***



## INTRODUCCIÓN

Las especies de bacterias presentan suficiente diversidad interna como para permitir la identificación de distintos clones o grupos clónicos (cepas que tienen un alto grado de afinidad) entre aislamientos de las mismas especies recolectadas de distintas fuentes y lugares y a distintos tiempos. Esta identificación, también llamada “tipificación” es muy útil en estudios ecológicos y epidemiológicos. Tradicionalmente la tipificación se llevaba a cabo por métodos fenotípicos, que permitían una observación sencilla de algunas reacciones diferenciales (aglutinación serológica, reacciones bioquímicas, lisis por bacteriofagos...), pero en los últimos años se emplean con mayor frecuencia las técnicas de tipificación molecular, que se pueden definir como los procedimientos utilizados para diferenciar bacterias basados en la composición de las moléculas biológicas, tales como las proteínas, los ácidos grasos, los polisacáridos, etc., o los ácidos nucleicos. Estos últimos, que también se denominan métodos genotípicos, son los que presentan mayor capacidad de diferenciación (Mossel *et al.* 2003).

Los principales métodos para el tipado o tipificación de las bacterias son:

1. Métodos fenotípicos:
  - a. Serotipado
  - b. Fagotipado
  - c. Biotipado
  - d. Sensibilidad a agentes antimicrobianos
2. Métodos moleculares
  - a. Análisis de los polisacáridos
  - b. Análisis de los ácidos grasos
  - c. Perfiles electroforéticos de proteínas
  - d. Electroforesis de enzimas multilocus
  - e. Métodos basados en los ácidos nucleicos

En general, los métodos fenotípicos no precisan de equipamiento sofisticado y son sencillos de realizar, aunque también requieren un gran esfuerzo en tiempo y materiales; además, algunos de los reactivos o compuestos necesarios sólo están disponibles en algunos laboratorios especializados, como ocurre con sueros o “sets” de fagos. Por su

parte, los métodos moleculares son atractivos porque tienen una alta capacidad de discriminación, son reproducibles, son aplicables a todas las cepas, permiten una evaluación objetiva de los resultados y también permiten el análisis estadístico de los datos, pero, como contrapartida, se necesita un equipamiento que no está disponible en muchos de los laboratorios de rutina de análisis de alimentos.

Aunque estos métodos tienen alto poder discriminatorio y alta reproducibilidad, deben ser estandarizados y cuidadosamente validados, para lo que se usa un conjunto de cepas seleccionadas, algunas de las cuales son homogéneas (por criterios epidemiológicos y microbiológicos) y otras heterogéneas con el fin de poder llevar a cabo comparaciones, ya que el objetivo último de los métodos de tipificación es el de poder distinguir cepas que están relacionadas de las que no lo están.

Uno de los métodos genéticos de tipificación es el análisis de perfiles de ADN por amplificación aleatoria (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*), técnica basada en la PCR, que usa uno o varios iniciadores cortos (normalmente de 8 a 10 pares de bases) y una temperatura de hibridación baja, para amplificar fragmentos aleatorios de ADN que se separan y después se visualizan por electroforesis en un gel de agarosa (Welsh and McClelland 1990). Las cepas que presentan un patrón de bandas similar, se consideran pertenecientes al mismo tipo.

La técnica es simple, de ahí que se haya hecho muy popular, aunque por otra parte presenta problemas de reproducibilidad ya que es una técnica muy sensible a cualquier cambio en las condiciones de la PCR, lo que conlleva diferencias en los patrones de bandas. No obstante, se pueden obtener resultados reproducibles si se tiene la precaución de estandarizar las condiciones empleadas (Munthali *et al.* 1992; Power 1996; Lowe *et al.* 1996).

Otra técnica de tipificación, basada en los genes que codifican el ARN ribosomal, es el Ribotipado (Grimont and Grimont 1986). Los genes que codifican para las tres clases de ARNr (23S, 16S y 5S) se encuentran en una unidad de transcripción policistrónica: el operón *rrn*. En el cromosoma bacteriano se encuentran un número variable de copias del operón *rrn* según la especie, aunque existen especies en las que sólo se encuentra una copia. Cuanto mayor es el número de copias, mayor es la capacidad discriminativa del ribotipado. Las secuencias de nucleótidos que codifican para el ARN 16S y 23S han cambiado muy poco a lo largo de la evolución, ya que la función de estos ácidos

nucleicos está condicionada a su estructura secundaria. Esto significa que algunas partes de estas secuencias están muy conservadas en las distintas especies bacterianas a pesar de la diversidad que pueda existir en el resto del genoma, pero también existen regiones que pueden variar sin que se vea afectada la estructura secundaria. En esta zona también existe una región espaciadora heterogénea que codifica para el ARNt. Así pues, la estructura del operón *rrn* permite por una parte que sea reconocido por una sonda universal y por otra que se generen polimorfismos de restricción. Algunos de los polimorfismos son específicos de especie mientras que otros permiten discriminar a nivel infraespecífico. Los patrones de bandas (número y tamaño, pero también intensidad) del ADN cromosómico digerido e hibridado con sondas marcadas para los genes ARNr son específicos de cada cepa bacteriana, por lo que pueden ser utilizados para reflejar diferencias a nivel de especies y subespecies, es decir, para identificar y caracterizar bacterias al comparar dichos patrones con los obtenidos a partir de bacterias conocidas (Persing *et al.* 1993; Bingen *et al.* 1994).

Si se realiza de forma manual, la técnica de Ribotipado es larga y tediosa, ya que implica la preparación del ADN, digestión, transferencia “Southern” e hibridación, y podría llevarle a un operador experimentado unos días de trabajo. Sin embargo, existe un equipo comercial, “Riboprinter Microbial Characterization System”, que permite la total automatización del proceso con el consiguiente ahorro de tiempo, ausencia de errores de manipulación y una mayor capacidad de procesamiento de muestras ([http://www2.dupont.com/Qualicon/en\\_US/products/RiboPrinter\\_System/index.html](http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/RiboPrinter_System/index.html)).

Precisamente los genes que dan lugar a los ácidos nucleicos de los ribosomas se pueden utilizar como “cronómetros moleculares” para establecer relaciones evolutivas entre microorganismos. Los genes que codifican para el ARNr 16S, el ARNr 23S y, en menor medida, el ARNr 5S constituyen una herramienta poderosa de la sistemática molecular por varias razones: están presentes en todos los procariotas, su estructura y función están conservadas en todos ellos, son moléculas pequeñas, fáciles de manipular, amplificar y secuenciar, presentan regiones muy conservadas y otras que pueden presentar variabilidad (Woese 1987). El ARNr 16S (o el gen que lo codifica) ha sido la molécula más utilizada en estudios taxonómicos, siendo prácticamente imposible conocer el número de trabajos que lo emplean (más de 200.000 citas en Google Scholar), existiendo incluso bases de datos dedicadas (Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole *et al.* 2009) con más de 700.000 secuencias disponibles.

Hoy en día, la combinación de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa, junto con la utilización de colorantes fluorescentes específicos, han permitido la automatización y abaratamiento de la secuenciación de ácidos nucleicos, lo que ha contribuido al incremento en la descripción de nuevas especies bacterianas en base a las relaciones evolutivas del gen ADNr 16S y a otras moléculas similares (genes conservados de mantenimiento o “housekeeping genes”). Este es el caso de todas las especies propuestas dentro del género *Psychrobacter* desde la descripción inicial de *P. immobilis*, ya que la catalogación filogenética ha sido esencial para delimitar las similitudes entre las diferentes especies.

El objetivo de este capítulo es comprobar si las cepas de colección y las cepas aisladas en el curso de este trabajo e identificadas como *Psychrobacter immobilis* mediante el ensayo de transformación y pruebas fenotípicas, se adscriben a esta misma especie al llevar a cabo la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S con el fin de conocer la posición taxonómica de las cepas. Asimismo también se llevará a cabo la tipificación molecular de las cepas mediante análisis de perfiles de ADN por amplificación aleatoria (RAPD) y mediante ribotipado para conocer su grado de diversidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Microorganismos, medios y reactivos*

La Tabla III.1 muestra las cepas con las que se ha trabajado en este capítulo y las pruebas realizadas a cada una de ellas.

**Tabla III.1.** Cepas y pruebas realizadas a esas cepas.

Cepa	Secuenciación 16S	Ribotipado	RAPD
5008	X	X	X
7062	X	X	X
1012	X	X	X
5125			X
6782			X
6783		X	
3294			
1074			
7550			X
7551			X
SLL1	X	X	X
SLL2		X	X
SLL3		X	
SLL4		X	
SLL5	X	X	X
SLL6		X	X
RM1		X	
RM2		X	X
RM3	X	X	
RM4		X	X
RM5		X	
RM6		X	

Los medios de cultivo comerciales se obtuvieron de la casa Oxoid. Los reactivos químicos de calidad analítica fueron adquiridos a las casas Merck, Sigma-Aldrich y Panreac. Los reactivos para biología molecular eran de las casas Eppendorf, GE Healthcare y Biotools.

### *Amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S*

Las cepas utilizadas para la secuenciación se muestran en la Tabla III.1. En total se estudiaron 6 cepas de *Psychrobacter* (3 de colección y 3 aisladas durante este trabajo) y se utilizaron las secuencias de las cepas tipo de *Psychrobacter* y las de 5 cepas de otras especies relacionadas con fines de comparación.

En primer lugar se llevó a cabo la extracción del ADN de las cepas objeto de estudio, para esto, se tomó 1 ml de un cultivo de la bacteria crecido en TSB a 25 °C durante 24 horas y se centrifugó a 9000g/5 minutos. Después se realizaron tres lavados del sedimento con tampón fosfato salino (PBS). Para la liberación del ADN se adicionaron 50 µl de agua bidestilada estéril y 450 µl de tritón X-100 al 1 %, se agitó y se trató por ebullición durante 10 minutos e inmediatamente se pasó a hielo, congelándose a -20 °C para su mantenimiento a largo plazo (Wang *et al.* 1997).

Las concentraciones de ADN se estimaron por electroforesis en un gel de agarosa con muestras de ADN de concentración conocida. Para la PCR se usaron muestras de ADN (aprox. 100 ng), un iniciador directo 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', correspondiente a las posiciones 8-27, establecidas para el gen 16S de *E. coli* y un iniciador reverso 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3', correspondiente a las posiciones 1552-1541 establecidas también para el gen 16S de *E. coli* (Hutson *et al.* 1993).

Con el fin de obtener un volumen total de 50 µl por muestra, se utilizó la siguiente reacción:

- Master Mix (2,5x) de Eppendorf:.....20µl
- Iniciador directo: ..... 1µl (25 pmol)
- Iniciador reverso:..... 1µl (25 pmol)
- Agua bidestilada estéril: .....20 µl
- ADN muestra: ..... 8 µl

Se usó un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf). Las condiciones de PCR consistieron en un tratamiento a 94 °C durante 3 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 92 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C/30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Finalmente se realizó un paso único de extensión a 72 °C/1,5 minutos.

Para observar el amplificado, se preparó un gel de agarosa al 1 %, donde se cargaron alícuotas de 5 µl de las reacciones de amplificación, usando un patrón de peso molecular de 100 pb (Biotools). Las bandas de ADN fueron visualizadas utilizando un transiluminador de luz ultravioleta, después de teñir el gel con bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron y trataron digitalmente con el sistema EDAS 290 (Kodak).

Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) y se secuenciaron directamente en el equipo MegaBACE 500 (GE Healthcare), empleando, cuando fue necesario, iniciadores internos (Persing *et al.* 1993). Cuando se detectaron ambigüedades en las secuencias se procedió en primer lugar a su clonación en *E. coli*, utilizando el kit de clonación “pMOSBlue Blunt Ended” (GE Healthcare) y después se secuenciaron completamente de la forma antes descrita.

La edición y el análisis de las secuencias se hizo con las aplicaciones Vector NTI y jPHYDIT (Jeon *et al.* 2005) y MEGA (Tamura *et al.* 2007) y las herramientas de análisis filogenético del Ribosomal Data Base Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole *et al.* 2009) y el programa BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul *et al.* 1990). Las matrices de distancias se calcularon con el modelo del parámetro 2 de Kimura y los árboles filogenéticos se realizaron con el algoritmo “Neighbor-Joining”, comprobando su estabilidad en 500 repeticiones del análisis “bootstrap”.

#### ***Tipificación mediante RAPD***

Por esta técnica se tipificaron 13 cepas, 7 de colección y 6 aisladas en este trabajo. Las cepas objeto de estudio (Tabla III.1) se incubaron 24 horas a 25 °C en TSB. Para la extracción del ADN de las cepas se utilizó el kit: “Genomic prepcells and tissue DNA Isolation Kit” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN se llevó a cabo por comparación con soluciones de ADN de concentración conocida mediante visualización en gel de agarosa. Se ajustó la concentración final de ADN de cada cepa a 10 ng/μl, diluyendo en agua bidestilada.

Las reacciones RAPD se llevaron a cabo empleando el kit de análisis “Ready To Go RAPD Analysis Beads” (GE Healthcare) y el iniciador 2, suministrado por el mismo fabricante, cuya secuencia es: 5'-GTTTCGCTCC-3', probando también otros cebadores del kit de RAPD del mismo fabricante.

La reacción RAPD se preparó añadiendo 25 pmol (1 μl) del iniciador, 8 μl de ADN de cada cepa y 16 μl de agua bidestilada (volumen total, 25 μl) a un tubo conteniendo una “RAPD Analysis Bead”. Para la amplificación se utilizó un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) utilizando el siguiente programa: 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos seguido de 45 ciclos a 95 °C durante 1 minuto, 36 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos.

Para la electroforesis, 5µl de la muestra amplificada se cargaron en un gel de agarosa al 2 %. Se empleó un patrón de 1000 pb (Biotools). La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora a 6 V/cm y el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio. Finalmente se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y se documentó mediante el sistema EDAS 290.

### ***Ribotipado***

La ribotipificación se realizó en 16 cepas, 4 de colección y 12 aisladas en este trabajo (Tabla III.1). Las cepas se incubaron 18 h en TSB a 25 °C y posteriormente se sembraron por agotamiento en placas de TSA, incubando 24 h a 25 °C. A partir de una colonia pura se realizaba la extracción del ADN, mediante el “kit” específico del equipo de ribotipado automático “Riboprinter Microbial Chracterization System”. El resto de las etapas (digestión con *EcoRI*, electroforesis, transferencia a membrana, hibridación con una sonda del operón ARNr de *E. coli* marcada químicamente para permitir la unión de un conjugado enzimático, detección de las bandas mediante quimioluminiscencia y análisis y comparación de bandas frente a la base de datos interna) fueron realizadas de forma automática por el equipo, completándose el proceso (para cada tanda de 8 cepas) en aproximadamente 8 horas. Además de la comparación propia del equipo, se forzó la comparación con el patrón de bandas del estándar de *P. immobilis* presente en la base de datos interna. Asimismo, las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software del sistema EDAS para establecer el patrón de bandas y se utilizó el programa informático SPSS para realizar un análisis “cluster” aplicando el coeficiente de Dice y agrupamiento UPGMA.

## RESULTADOS

La secuenciación del gen ADNr 16S se completó en 6 cepas de *Psychrobacter*. Se obtuvieron secuencias de entre 1300 y 1500 pares de bases, que se editaron y analizaron con la ayuda de dos herramientas comparativas, el programa BLAST y los programas Seqmatch y TreeBuilder del Ribosomal Database Project. Los resultados se muestran en la Tabla III.2, donde se presentan las especies identificadas por comparación con las bases de datos (las dos primeras entradas) y el porcentaje de similitud de las secuencias.

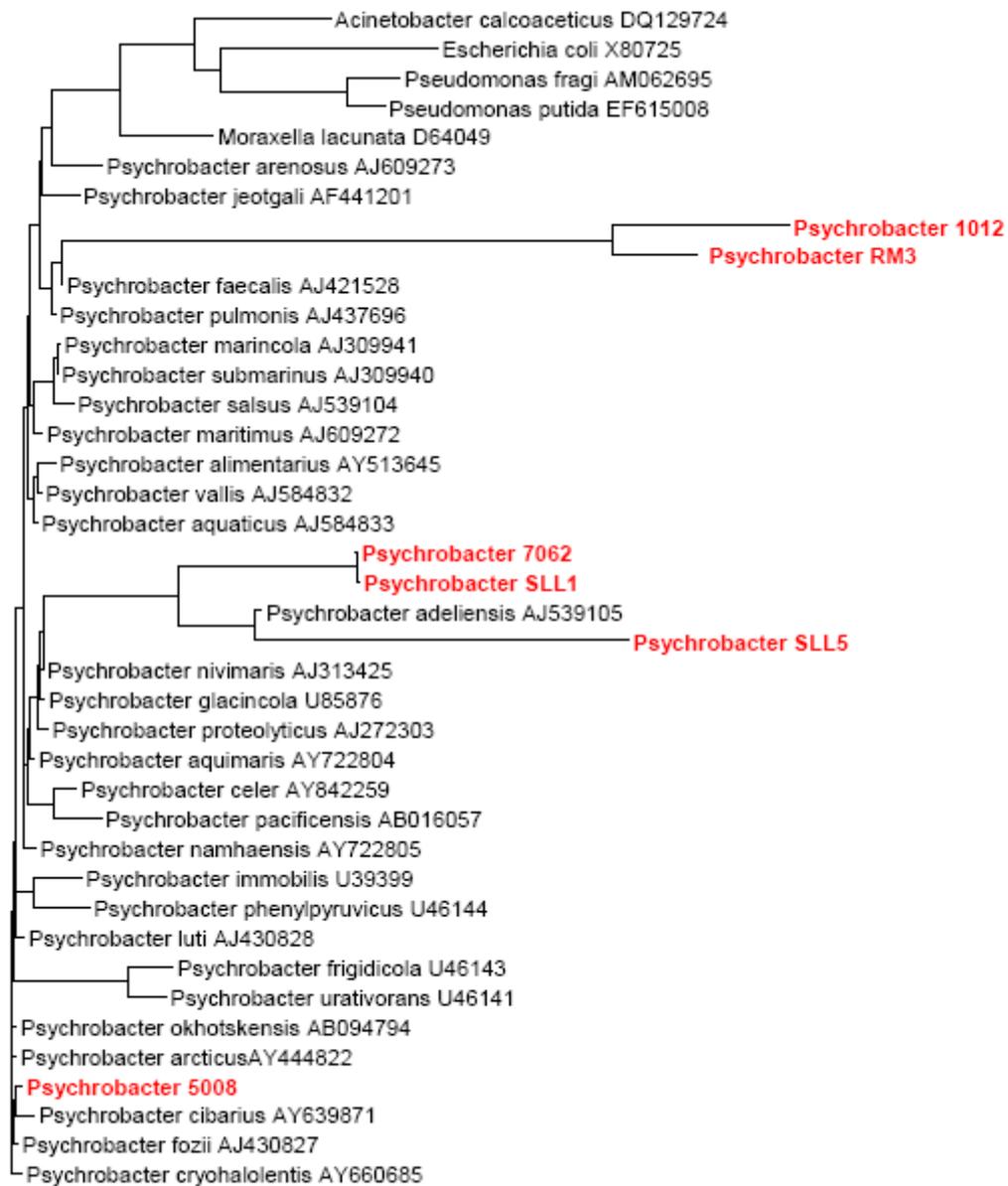
**Tabla.III.2** Identificación de cepas mediante la secuenciación del gen ADNr 16S y su posterior análisis utilizando las bases de datos NCBI Blast y RDP II.

	Identificación NCBI BLAST			Identificación RDP-II		
			%			%
<b>1012</b>	<i>P. faecalis</i>	FJ613302	87	<i>Psychrobacter</i> sp.	AJ431338	62
	<i>Psychrobacter</i> sp.	EU016158	87	<i>P. faecalis</i>	EU370412	58
<b>5008</b>	<i>Psychrobacter</i> sp.	FN377742	98	<i>P. immobilis</i>	AJ309942	95
	<i>P. arcticus</i>	CP000082	98	<i>Psychrobacter</i> sp.	AF260715	94
<b>7062</b>	<i>P. nivimaris</i>	EU880519	100	<i>Psychrobacter</i> sp.	AY573041	70
	<i>Psychrobacter</i> sp.	FJ966160	100	<i>P. nivimaris</i>	AJ313425	69
<b>SLL1</b>	<i>P. nivimaris</i>	EU880519	100	<i>Psychrobacter</i> sp.	AY573041	70
	<i>Psychrobacter</i> sp.	FJ966160	100	<i>P. nivimaris</i>	AJ313425	69
<b>SLL5</b>	<i>Psychrobacter</i> sp.	AM990814	99	<i>P. glacicola</i>	AJ312213	65
	<i>Psychrobacter</i> sp.	AM421980	98	<i>P. urativorans</i>	AJ609555	64
<b>RM3</b>	<i>P. pulmonis</i>	EU434362	100	<i>Psychrobacter</i> sp.	AJ431338	40
	<i>P. pulmonis</i>	GQ200199	100	<i>Psychrobacter</i> sp.	EU016160	38

%; Medidas porcentuales de similitud de los diferentes algoritmos.

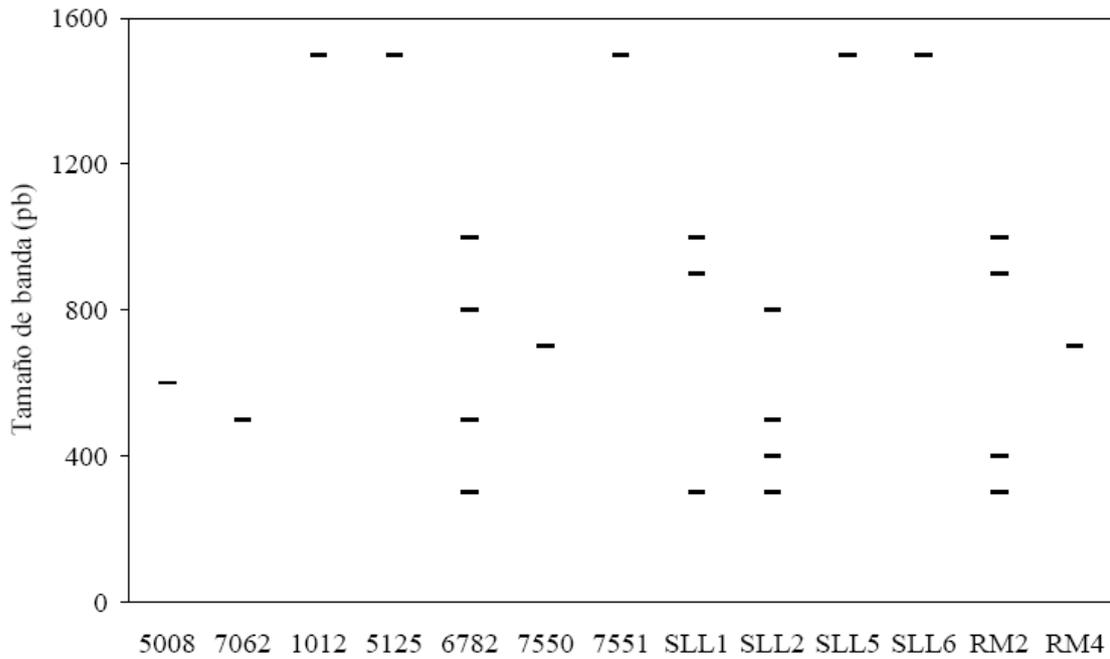
En la Figura III.1 se muestra el árbol filogenético obtenido tras el análisis de las secuencias del ADNr 16S de las 6 cepas secuenciadas, junto con las secuencias de las especies descritas del género *Psychrobacter* y de otras cinco especies de bacterias Gram negativas usadas con fines comparativos.

**Figura III.1.** Árbol filogenético mostrando las relaciones entre las cepas estudiadas (resaltadas en rojo) y las secuencias de especies pertenecientes a otras especies de *Psychrobacter* y de bacterias Gram negativas.



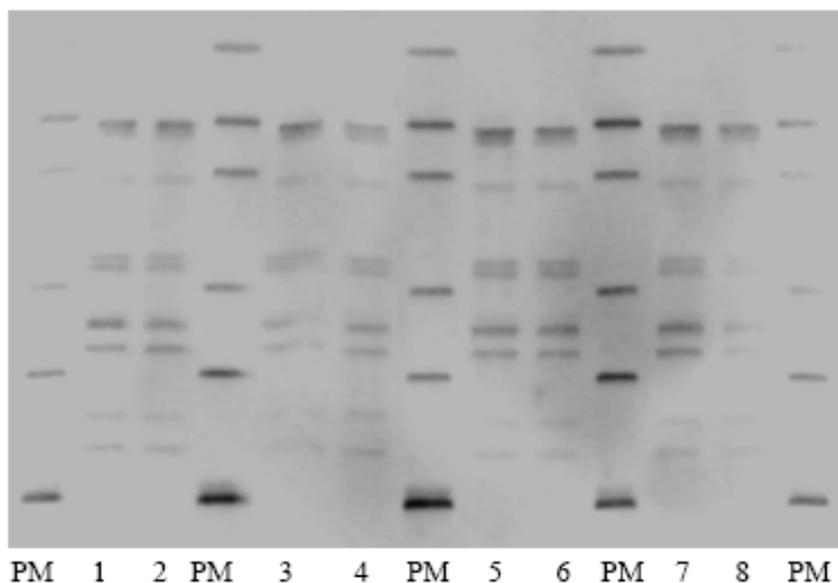
El patrón de bandas obtenido mediante RAPD con el cebador 2 se muestra en la Figura III.2.

**Figura III.2.** Patrón de bandas obtenido mediante RAPD de 13 cepas de *Psychrobacter*.

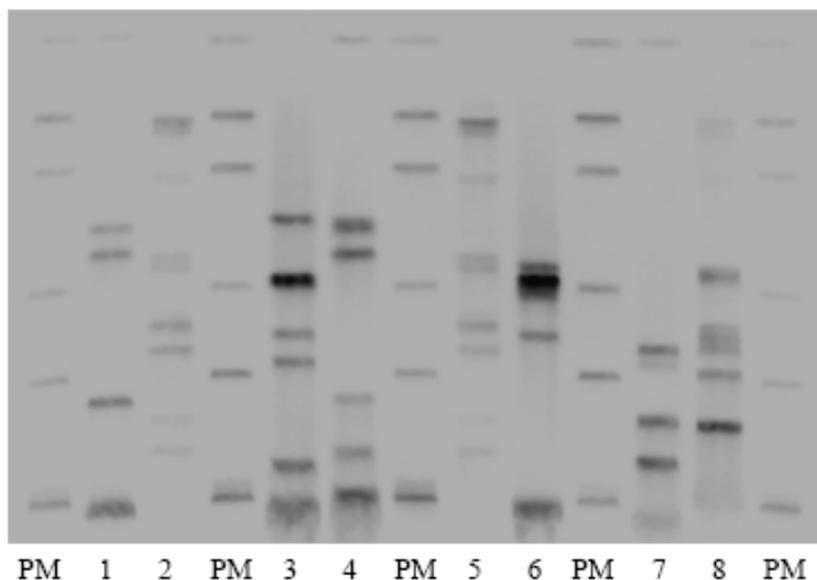


En las Figuras III.3 y III.4 se muestran las imágenes de las membranas obtenidas tras el ribotipado automatizado de las cepas.

**Figura III.3.** Patrón de bandas de ribotipado. PM, patrón de peso molecular; 1, SLL4; 2, RM4; 3, RM2; 4, 5008; 5, RM1; 6, 6783; 7, SLL5; 8, RM6.



**Figura III.4.** Patrón de bandas de ribotipado. PM, patrón de peso molecular; 1, 1012; 2, 7062; 3, SLL1; 4, RM3; 5, SLL6; 6, SLL2; 7, SLL3; 8, RM5.



En 7 cepas (6783, 7062, RM1, RM4, SLL4, SLL5 y SLL6) el equipo Riboprinter identificó las cepas como pertenecientes a la especie *Carnobacterium maltaromaticum*, aunque con un bajo porcentaje de similitud; en el resto de las cepas, solamente se ofrecía el ribotipo más próximo, ya que el dato de similitud fue considerado insuficiente. Estos resultados se resumen en la Tabla III.3.

**Tabla III.3.** Identificación por comparación con la base de datos del Riboprinter

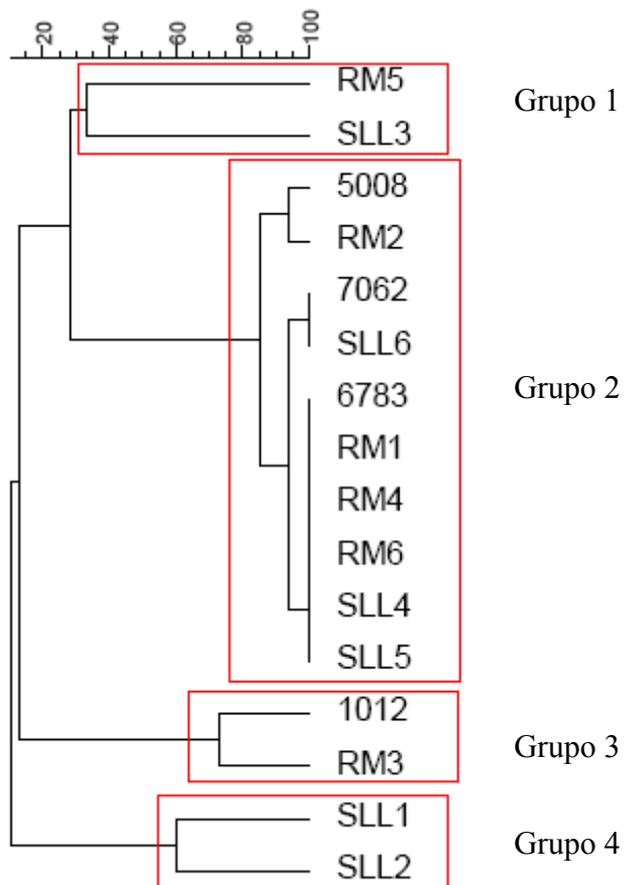
Cepa	Identificación Riboprinter	% Similitud*	% Similitud con el patrón DUP 16651**
5008	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	80	0,12
1012	<i>Micrococcus luteus</i>	64	0,09
6783	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	90	0,08
7062	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	92	0,08
RM1	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	92	0,09
RM2	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	75	0,12
RM3	<i>Enterobacter gergoviae</i>	61	0,09
RM4	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	87	0,09
RM5	<i>Pseudomonas putida/fluorescens</i>	74	0,08
RM6	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	80	0,09
SLL1	<i>Serratia marcescens</i>	66	0,12
SLL2	<i>Luteococcus peritoneo</i>	75	0,08
SLL3	<i>Vibrio penaeicida</i>	78	0,08
SLL4	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	86	0,08
SLL5	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	85	0,12
SLL6	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	92	0,08

\* Los porcentajes inferiores al 83 % no son considerados por el sistema; el resultado se muestra con fines ilustrativos.

\*\* El patrón DUP 16651 es el estándar de *P. immobilis* de la base de datos del equipo

Para comparar las similitudes entre las cepas, se realizó un análisis “cluster” a partir de los patrones de bandas, obteniéndose el dendrograma que se presenta en la Figura III.5

**Figura III.5.** Dendrograma obtenido a partir de los patrones de bandas de ribotipado, empleando el coeficiente de Dice y agrupamiento UPGMA.



## DISCUSIÓN

La secuenciación y análisis filogenético del gen que codifica para el ARNr 16S indica, como se muestra en la Tabla III.2 y en la Figura III.1, que las cepas analizadas se encuadran dentro del género *Psychrobacter*. Los dos algoritmos utilizados, BLAST y RDP-II identificaron todas las cepas estudiadas como pertenecientes a este género, aunque hubo diferencias entre ambos en la adscripción a especie. En general, los porcentajes de similitud fueron menores en el caso del RDP-II, lo que puede ser debido al mayor número de secuencias que están depositadas en GenBank y también a la mayor “calidad” de las secuencias del RDP-II, es decir, que siempre será más fácil encontrar similitudes altas en una base de datos general, en la que muchas secuencias se depositan de forma directa sin un análisis previo, que en una base de datos “editada”. Esta paradoja se observa claramente con la cepa tipo CECT 5008, que es identificada como *P. immobilis* en el RDP-II, mientras que el análisis BLAST la adscribe en primer lugar a *Psychrobacter* spp. Precisamente, la búsqueda de la calidad de las secuencias utilizadas en la identificación mediante la catalogación ribosomal es la que justifica la existencia de estas bases de datos “exclusivas” como el RPD-II y otras similares (Harmsen *et al.* 2002; Pruesse *et al.* 2007; Cole *et al.* 2009).

Para la construcción del árbol filogenético sólo se tuvieron en consideración las secuencias de las cepas tipo, lo que hace que los resultados puedan ser diferentes de los obtenidos en los análisis BLAST y RDP-II. Los seis cultivos secuenciados incluidos en el análisis se encuadran dentro del árbol, aunque la posición filogenética no se corresponde con *P. immobilis*, sino con otras especies del género, así, las cepas 1012 y RM3 estarían próximas a *P. faecalis*, coincidiendo con la identificación BLAST de la cepa 1012, pero no de RM3, que asocia con *P. pulmonis* (Tabla III.2), aunque se puede apreciar que las dos especies, *P. faecalis* y *P. pulmonis* se encuentran en el mismo “cluster”. Más curiosa resulta la ubicación de las cepas 7062, SLL1 y SLL5, que se encuentran próximas a *P. adeliensis*. Estas cepas eran asociadas con otras especies de *Psychrobacter* (*P. nivimaris* principalmente, pero también *P. glacincola* o *Psychrobacter* spp.) en los análisis BLAST y RDP-II. La secuencia de la cepa tipo de *P. immobilis* CECT 5008 aparece relacionada con *P. cibarius*, aunque el análisis RDP-II la asocia con *P. immobilis*. Hay que tener presente que los porcentajes de similitud entre las secuencias 16S de las especies de *Psychrobacter* son siempre muy elevadas (a veces,

como en el caso de *P. marincola* y *P. submarinus* superior al 99 %, (Romanenko *et al.* 2002), de forma que la delimitación de nuevas especies se tiene que hacer con criterios polifásicos (Roselló-Mora and Amann 2001; Stackebrandt *et al.* 2002), ya que la secuenciación del 16S ofrece una visión muy limitada de la diversidad genética de este género (Bakermans 2006). El análisis de estas secuencias de las cepas empleadas en este trabajo muestra claramente que la adscripción a género es correcta, pero la identificación de especies por este método no es fiable y ofrece resultados diferentes en función de la base de datos empleada. Asimismo, pone de manifiesto la necesidad de revisar la taxonomía del género *Psychrobacter* utilizando criterios homogéneos para evitar las ambigüedades que pueden aparecer en la identificación de nuevos aislamientos.

La diversidad genética que presentan las cepas de *Psychrobacter* también se aprecia al utilizar las técnicas de tipificación dirigidas a todo el genoma de la bacteria, como RAPD o ribotipado.

La amplificación al azar (RAPD) es una técnica sencilla de llevar a cabo y poco costosa, pero que presenta algunas limitaciones bien conocidas, como su falta de reproducibilidad o la dificultad de establecer bases de datos (Power 1996; Rademaker and Savelkoul 2004). Además, la optimización de las condiciones de reacción puede requerir el análisis de diversos cebadores hasta obtener los perfiles más adecuados (Rademaker and Savelkoul 2004). En nuestro caso, pese a probar diversas condiciones y cebadores en las reacciones de RAPD, no se obtuvieron perfiles suficientemente discriminantes. El número de bandas obtenidas fue muy bajo en todas las situaciones probadas, observándose solamente tres o cuatro bandas en las mejores circunstancias (Figura III.2), que además no permitían el agrupamiento de las cepas en tipos similares.

El ribotipado automatizado de las cepas de *Psychrobacter* ofreció buenos resultados, aunque con algunas limitaciones. El tipado de las cepas fue muy satisfactorio y permitió discernir con claridad los patrones de bandas (Figuras III.3 y III.4), pero la comparación de los patrones con la base de datos del equipo fue ineficaz, ya que no identificó adecuadamente ninguna de las cepas. Además, al forzar la comparación de los patrones de las cepas con el estándar de *P. immobilis* de la base de datos, el porcentaje de similitud obtenido fue muy bajo, inferior en todos los casos al 0,12 % (Tabla III.3), lo que puede indicar que se trata de un género con una gran diversidad genética y que está infrarrepresentado en la base de datos del equipo. El único trabajo existente en el que se

aborda la ribotipificación automatizada de cepas de *Psychrobacter* es el de Shivaji *et al.* (2005) en la descripción de las especies *P. vallis* y *P. aquaticus*; en este trabajo tipifican 15 cepas tipo de especies de *Psychrobacter*, con el objetivo de demostrar que los ribotipos de las dos especies nuevas son diferentes de las restantes, pero no se muestran datos de similitud de comparación ni de análisis “cluster” que reflejen la proximidad existente entre las distintas especies. Una observación visual entre los ribotipos mostrados en el artículo de Shivaji *et al.* (2005) y los obtenidos en el curso de este trabajo no permite establecer ninguna semejanza entre ellos, es decir, los ribotipos de las cepas utilizadas en esta tesis no se parecen a los generados por Shivaji *et al.* (2005).

De mucha más utilidad ha sido el análisis “cluster” de los patrones de bandas, ya que permite establecer relaciones filogenéticas entre las cepas. Como se observa en la Figura III.5, las cepas estudiadas se clasifican en cuatro grupos, aunque tres de ellos, 1, 3 y 4, con un porcentaje bajo de similitud. El grupo 2 comprende 10 cepas, 3 de las cuales son cepas patrón, incluida la cepa tipo de *P. immobilis*, por lo que es posible considerar que se trata de cepas pertenecientes a esta especie. Curiosamente, el ribotipado no muestra la identidad que se observaba en la secuencia del gen ADNr 16S de las cepas 7062 y SLL1, que además estaban próximas a *P. adeliensis* (Figura III.1). Sin embargo, las dos cepas que constituyen el grupo 3, 1012 y RM3 también se agrupaban en un “cluster” propio, próximo a *P. faecalis*, en el análisis del gen ADNr 16S (Figura III.1).

En resumen, el análisis filogenético de las secuencias del gen ADNr 16S muestra con claridad que las cepas empleadas en este trabajo pertenecen al género *Psychrobacter*, pero que la capacidad de discriminación de especies de este método es baja, mientras que el ribotipado permite agrupar a las cepas de una forma coherente y reproducible, aunque la identificación automática no es posible.



**Capítulo IV. Desarrollo de una técnica de PCR para la  
detección e identificación de cepas de *Psychrobacter* spp.**



## **INTRODUCCIÓN**

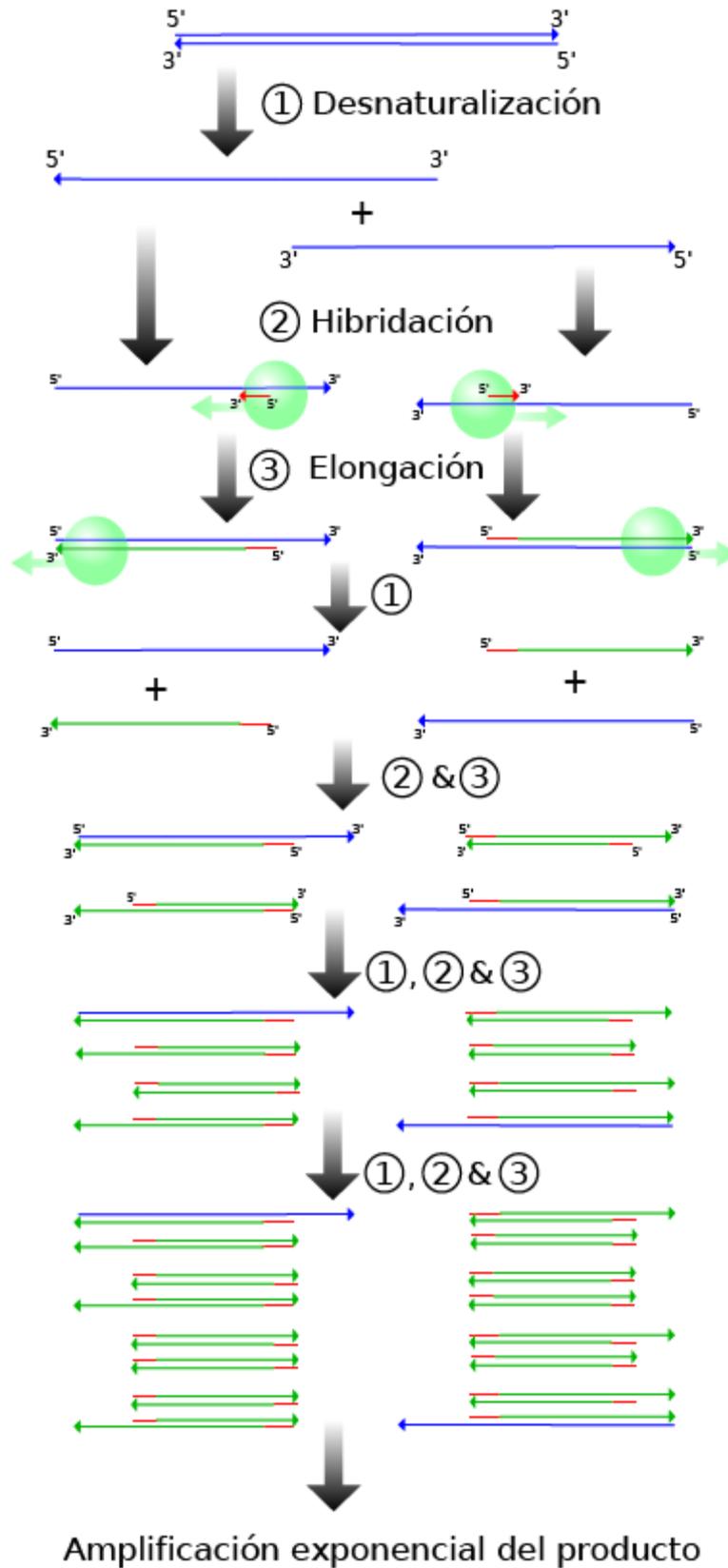
En la detección de numerosos microorganismos, las técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han adquirido mucha importancia en los últimos años debido a que presentan varias ventajas sobre las técnicas tradicionales; entre ellas, rapidez, especificidad, sensibilidad y el permitir la detección de genes que codifican para la producción de factores de virulencia, disminuyendo así la necesidad de utilizar ensayos biológicos (Hill 1996).

La reacción en cadena de la polimerasa puede multiplicar moléculas de ADN hasta cientos de miles de veces en el tubo de ensayo, proporcionando grandes cantidades de material genético para su análisis posterior por diversas técnicas de biología molecular (visualización, clonación, secuenciación, modificación).

Para llevar a cabo una PCR se requiere conocer la secuencia de nucleótidos de una región del gen que se desea amplificar, ya que es preciso disponer de oligonucleótidos iniciadores, complementarios de secuencias presentes en el gen de interés. Los pasos para la amplificación del ADN son los siguientes:

- Preparación de una mezcla de reacción que contenga una muestra del ADN que se desea amplificar, los oligonucleótidos específicos, desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) y polimerasa termostable, todo ello en un medio tamponado y con una concentración optimizada de  $Mg^{2+}$ .
- Desnaturalización del ADN de la muestra mediante la aplicación de temperaturas de 92-95 °C.
- Hibridación de los cebadores al ADN desnaturalizado a una temperatura específica.
- Polimerización del ADN a la temperatura de trabajo de la ADN polimerasa.
- Repetición de los pasos de desnaturalización, hibridación y polimerización durante un número variable de veces (entre 25 y 40 ciclos)

Estas etapas se representan gráficamente en la Figura IV.1.



**Figura IV.I.** Etapas secuenciales de la reacción en cadena de la polimerasa. Modificada a partir de <http://es.wikipedia.org>

Las primeras aplicaciones prácticas de la PCR estaban encaminadas a la detección de microorganismos causantes de enfermedades en el ámbito de la microbiología clínica, pero rápidamente se amplió su uso para la detección de microorganismos de interés en alimentos. Las principales diferencias entre la aplicación a muestras clínicas y a muestras de alimentos se deben a las distintas matrices sobre las que se trabaja y a que en las muestras clínicas la concentración de microorganismos de interés, es decir, aquellos que se quieren detectar, es mayor que en las muestras de alimentos, por lo que es más fácil poner de manifiesto la presencia de estos microorganismos en aquellas que en éstas (Patel 1994).

Los protocolos de PCR publicados para la detección de un agente bacteriano concreto en los alimentos son muy diversos, comenzando por los diferentes tipos de muestras en los que se va a aplicar y los tratamientos previos que se necesitan, el uso de diferentes termocicladores, distintas temperaturas de unión de los iniciadores y diferentes sistemas tampón; sirva como ejemplo que una búsqueda sencilla en Google Académico (<http://scholar.google.es>) de técnicas de PCR para la detección de *Salmonella* en alimentos ofrece más de 30000 resultados. Así pues, para desarrollar un protocolo rutinario de PCR es conveniente seguir unas etapas estructuradas (Malorny *et al.* 2003):

- Evaluar los métodos disponibles para la detección del microorganismo en cuestión.
- Valorar las diferentes técnicas para la preparación de la muestra, teniendo en consideración las posibles interferencias de la matriz alimentaria o de los reactivos utilizados en la preparación.
- Diseño experimental del método de PCR y validación del mismo, incluyendo la precisión del método en términos de inclusividad (detección del microorganismo de interés dentro de un grupo amplio de microorganismos) y exclusividad (ausencia de amplificación en microorganismos relacionados con el microorganismo de interés), límite de detección, flexibilidad y otras consideraciones

Se deben tener en cuenta algunos problemas adicionales que pueden aparecer como consecuencia de la naturaleza del alimento que se analiza a la hora de usar la técnica de PCR para detectar microorganismos procedentes de alimentos. Por ejemplo, algunos componentes o partículas de los alimentos pueden inhibir la PCR y se deberían eliminar

antes de llevar a cabo la reacción (Lantz *et al.* 1994); por otra parte, hay que tener presente que la PCR no puede distinguir el ADN de las células vivas del de las células muertas, lo que podría dar lugar a la detección de falsos positivos (Hill 1996). Se han desarrollado técnicas para disminuir estas interferencias, tales como sistemas para la extracción y purificación del ADN a partir de los alimentos, que minimizan la inhibición de la reacción por componentes del alimento, o protocolos basados en la incubación previa de las muestras para evitar la presencia de células no viables (Lantz *et al.* 1994; Stone *et al.* 1994; Wang *et al.* 1997).

Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, la detección, aislamiento e identificación de *Psychrobacter spp.* es compleja, debido a su baja incidencia y a las dificultades para diferenciar las bacterias de este género de otros bacilos Gram negativos inmóviles, por lo que disponer de una técnica de PCR sería de gran utilidad para facilitar los estudios con estas bacterias.

El primer aspecto que hay que valorar es la disponibilidad de secuencias específicas de microorganismos del género *Psychrobacter*. De acuerdo con los resultados mostrados en el Capítulo I, las actividades lipolíticas están presentes en todas las cepas de *Psychrobacter* empleadas en esta memoria, lo que convierte a estas enzimas en una buena diana para su detección específica. En la bibliografía sobre *Psychrobacter* existen varias referencias a la actividad lipolítica de este microorganismo (Arpigny *et al.* 1993; Yumoto *et al.* 2003; Kulakova *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007) y además, en la base de datos genética GenBank está depositada la secuencia (X67712) del gen de una lipasa (*lip1*) producida por una cepa de *P. immobilis* (Arpigny *et al.* 1993).

El objetivo planteado en este capítulo es el diseño de una técnica de PCR que ayude a diferenciar este género de otros con características semejantes, a partir de la secuencia del gen *lip1*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Microorganismos medios y reactivos*

En este trabajo se utilizaron las 15 cepas de *Psychrobacter immobilis* procedentes de las colecciones de cultivo (con la excepción de la cepa auxotrofa ATCC 47113) y las 12 aisladas de muestras de alimentos que aparecen listadas en la Tabla I.2, así como tres cepas de *Pseudomonas fragi* aisladas en nuestro laboratorio (García-López *et al.* 2004) como tipo de microorganismo Gram negativo, oxidasa positivo e inmóvil, además de lipolítico y una cepa lipolítica de *Aeromonas hydrophila*, también procedente de la colección de nuestro laboratorio (Rodríguez-Calleja *et al.* 2006).

Los medios de cultivo comerciales se obtuvieron de las casas Oxoid y Difco. Los reactivos químicos de calidad analítica fueron adquiridos a las casas Merck, Sigma-Aldrich y Panreac. Los reactivos para biología molecular eran de las casas Eppendorf, GE Healthcare y Biotools.

### *Diseño de cebadores*

La secuencia del gen *lip1* (número de acceso X67712) que codifica para la producción de una lipasa en la cepa *P. immobilis* B10 (Arpigny *et al.* 1993) se obtuvo de la base de datos GenBank. Esta secuencia tiene 1280 nucleótidos, con una región codificante de 954 pb que se extiende entre las posiciones 244 y 1197, para dar lugar a una ORF de 317 aminoácidos. Para el diseño de cebadores se utilizó la región codificante que se analizó con el programa VectorNTI 9.0, seleccionando pares de cebadores que amplificasen un fragmento de aproximadamente 400 pb. Concretamente se seleccionó el siguiente par de cebadores:

Ps\_lipF (Cebador directo): 5'-CGG CGC AAT CAG TGT GGC TTA TG-3'

Ps\_lipR (Cebador inverso): 5'-ACT TGT GCT TGC GGG ATG ATT TTT-3'

El par de cebadores corresponde a las posiciones 657-697 (Ps\_lipF) y 1094-1071 (Ps\_lipR) de la secuencia X67712 y amplifican un fragmento de 420 pb. La especificidad de los cebadores se comprobó mediante el programa BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul *et al.* 1990).

### ***Extracción de ADN***

A partir de cultivos puros de los microorganismos en caldo TSB incubado a 25 °C durante 24 h se realizó la extracción de ADN para los experimentos de PCR. Para ello se probaron dos protocolos diferentes:

#### **Método 1 (Sambrook *et al.* 1989)**

- Se partió de 3 ml de caldo que se centrifugan a 13000g/4 minutos.
- El sedimento se resuspendió en 500 µl de TES (Tris, 0,05 M; NaCl, 0,05 M; EDTA, 0,005 M; pH 8) y se lisaron las células con 5 µl de solución de lisozima (10 mg/ml), incubando a 37 °C/30 minutos.
- A continuación se adicionaron 5 µl de solución de proteinasa K y 5 µl de RNasa (10mg/ml), mezclando cuidadosamente e incubando durante 1h a 65 °C.
- Se agregaron 50 µl de SDS al 20 % y se prolongó la incubación durante 10 minutos.
- Tras enfriar se añadió un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se emulsionó mediante agitación constante.
- Se centrifugó a 6000g/10m/4 °C y se pasó la capa acuosa a un tubo limpio.
- La extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico se repitió hasta que se eliminó todo el material proteico.
- Se adicionaron a los sobrenadantes 2,5 volúmenes de etanol (96 %) a -20 °C.
- El ADN precipitado se recuperó centrifugando a 13000g durante 5 minutos y se secó a vacío, resuspendiendolo finalmente en 50 µl de agua bidestilada estéril.
- Se cuantificó la concentración de ADN obtenido en gel de agarosa al 1 % por comparación con soluciones de ADN de concentración conocida.

#### **Método 2 (Wang *et al.* 1997)**

- Se partió de 1 ml de caldo, que se centrifuga a 9000g/5 minutos.
- El sedimento se lavó 3 veces con PBS, se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada y se añadieron 450 µl de tritón X-100 al 1 %.

- Las células se lisaron por ebullición durante 5 minutos y los tubos se enfriaron inmediatamente en hielo para posteriormente centrifugarlos a 9000g/5 minutos, transfiriendo el sobrenadante a un tubo limpio para su uso como ADN molde.

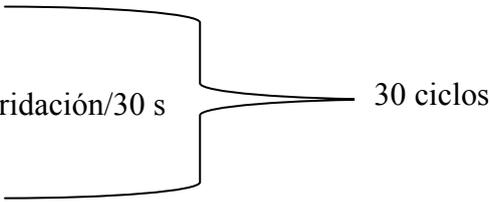
### PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en microtubos de 0,2 ml y en un volumen final de 50  $\mu$ l. La mezcla de reacción se preparó como sigue:

- Tampón de reacción (10x): ..... 5 $\mu$ l (2 mM final de MgCl<sub>2</sub>)
- mezcla de dNTP's (1 mM): ..... 10 $\mu$ l (200  $\mu$ M)
- cebador directo (Ps\_lipF; 25 pmol/ $\mu$ l): ..... 1  $\mu$ l (0,5  $\mu$ M final)
- cebador inverso (Ps\_lipR; 25 pmol/ $\mu$ l): ..... 1  $\mu$ l (0,5  $\mu$ M final)
- ADN polimerasa: ..... 1  $\mu$ l (1 U)
- Preparación de ADN: ..... 5 $\mu$ l.
- Agua: ..... 27  $\mu$ l

Para optimizar la reacción de PCR se comprobó la temperatura óptima de hibridación de los cebadores utilizando un termociclador Mastercycler Personal Gradient (Eppendorf), programando un gradiente de temperaturas desde 58 a 68 °C.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) con el siguiente programa de amplificación:

- 94 °C/3 minutos
  - 92 °C/30 s
  - Temperatura óptima de hibridación/30 s
  - 72 °C/1 minutos
  - 72 °C/1,5 minutos
- 

Alícuotas de 5  $\mu$ l de los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En una de las calles del gel se colocó un patrón marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio de 1  $\mu$ g/ml durante 30 minutos y se documentaron mediante el sistema Kodak EDAS 290.

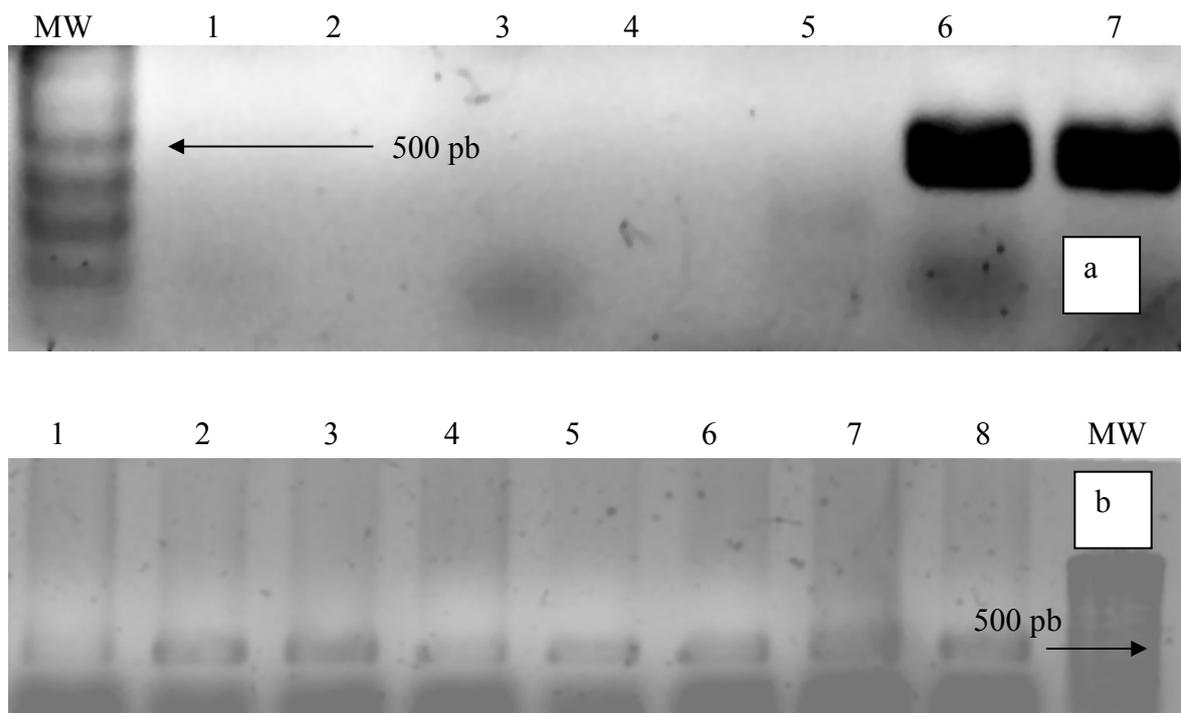
## RESULTADOS

El par de cebadores diseñado para la amplificación de un fragmento de la secuencia codificante del gen *lip1* no mostró una identidad significativa con otras secuencias disponibles en la base de datos de GenBank tras el análisis BLAST, por lo que se consideraron adecuados para la amplificación específica de *Psychrobacter*.

Tampoco hubo diferencias importantes entre los dos métodos de extracción de ADN ensayados, ya que ambos permitieron obtener una cantidad suficiente de material genético y con una calidad adecuada para la realización de la PCR; de forma rutinaria se empleó el método 2 de extracción rápida por ebullición por su rapidez y simplicidad.

El uso del gradiente de temperaturas para optimizar la reacción de PCR permitió comprobar que una temperatura de 62 °C era la que ofrecía mejores resultados, en cuanto a intensidad y definición de las bandas, sin apreciarse amplificaciones inespecíficas.

Los resultados de la amplificación por PCR se muestran en la Figura IV.1. La reacción de PCR fue específica, no observándose amplificación en las cepas de *Pseudomonas fragi* ni *Aeromonas hydrophila* (Figura IV.1a). Todas las cepas de *Psychrobacter* aisladas de alimentos en el curso de este trabajo, resultaron positivas, con una banda de amplificación del tamaño esperado (420 pb), mientras que tres (1071, 1075 y 3294) de las 15 cepas de colección ensayadas dieron resultados contradictorios, con ausencia de amplificación en algunas de las repeticiones de los experimentos. En la Figura IV.1b se muestra un ejemplo de amplificación positiva de algunas de las muestras.



**Figura IV.1.**

a) Especificidad de la reacción de PCR. MW, Patrón de peso molecular de 100 pb; 1, blanco de reacción; 2, cepa de *P. fragi* Ps7; 3, cepa de *P. fragi* Ps9; 4, cepa de *P. fragi* Ps10; 5, cepa patrón de *A. hydrophila*; 6, cepa tipo de *P. immobilis*; 7, cepa RM1 de *P. immobilis*

b) Amplificación de cepas de *P. immobilis*. 1; cepa RM1; 2, cepa RM2; 3, cepa RM3; 4, cepa SLL1; 5, cepa SLL2, 6, cepa SLL3; 7, cepa 5008; 8 cepa 7062; MW, patrón de peso molecular de 100 pb

## DISCUSIÓN

Las técnicas de detección de microorganismos basadas en PCR han tenido un desarrollo impresionante en los últimos años. Su rapidez, sensibilidad y especificidad han hecho que sea la metodología de elección en el campo diagnóstico para la investigación y el desarrollo de nuevos métodos.

Aunque parece una afirmación obvia, uno de los principales factores para desarrollar un ensayo de PCR es la disponibilidad de una secuencia genómica característica del microorganismo de interés. Los primeros métodos de PCR que se desarrollaron a finales del siglo pasado dependían de secuencias seleccionadas al azar y no siempre bien caracterizadas, mientras que, en la actualidad, es posible ser más selectivo, gracias al gran número de secuencias depositadas en las bases de datos internacionales.

Esta afirmación general es cierta para la mayoría de los microorganismos de interés clínico o importantes en alimentos, pero en el caso de microorganismos de menor relevancia no siempre es sencillo. Así, el número de secuencias disponibles del género *Psychrobacter* no es muy abundante; en GenBank hay 1160 secuencias, pero la mayoría de ellas son secuencias parciales de los genes del ADNr o de otros genes conservados, como *gyrB*. Si se eliminan de la búsqueda los genes ribosomales y otros genes conservados y las secuencias de plásmidos, los resultados se reducen a 49 secuencias, algunas de ellas no bien caracterizadas, en el sentido de que se trata de ORFs no identificadas.

Es cierto que los genes ribosomales son muy populares a la hora de diseñar reacciones de PCR para la detección de bacterias, pero también hay que considerar que puede existir una homología elevada entre especies relacionadas, como se ha visto para algunas de las especies de *Psychrobacter* (Romanenko *et al.* 2002; Juni 2005), lo que impide establecer relaciones filogenéticas fiables; asimismo, muchas veces la calidad de las secuencias disponibles no es buena, al tratarse de secuencias parciales u obtenidas de secuenciaciones masivas a partir de clones no cultivados.

Por todo ello, la elección de una secuencia diana para la detección de *Psychrobacter* no ha sido una tarea sencilla. La búsqueda se ha centrado en secuencias de proteínas, ya que permiten mayor especificidad de detección, además de poder relacionarse con una característica fenotípica (Sachse and Frey 2003). Se ha seleccionado el gen de la lipasa

por tratarse de una proteína bien caracterizada y correspondiente a una actividad enzimática común en las cepas estudiadas.

Para el diseño de cebadores se usó la aplicación específica del programa Vector NTI, configurada para obtener amplicones de aproximadamente 400 pb. De los cebadores obtenidos se seleccionó el par finalmente utilizado por la compatibilidad entre ambos cebadores. Por último, antes de proceder a su síntesis, se realizó un análisis BLAST, que no mostró similitudes significativas con otras secuencias bacterianas.

La preparación de la muestra antes de la PCR también es importante; el objetivo principal, además de obtener una cantidad suficiente de material genético, es conseguir que la muestra esté libre de sustancias que puedan inhibir la PCR (Sachse and Frey 2003). Por esta razón se trabajó con cultivos obtenidos de caldos no selectivos, que podrían ser utilizados como medio de enriquecimiento para el análisis de alimentos y también aseguran que se detectarán células viables y no artefactos debidos a la presencia de células muertas o no viables (Wang *et al.* 1997). Se probaron dos métodos de extracción de ADN, uno largo y complejo, con ruptura con lisozima, tratamiento con proteinasa K y RNAsa y desproteinización con fenol-cloroformo y otro método rápido basado en el lavado del sedimento celular y ruptura por ebullición. En ambos casos se obtuvieron ADNs de calidad adecuada para la reacción de PCR, por lo que rutinariamente se empleó el método 2, más rápido y cómodo y que no requiere la utilización de reactivos peligrosos.

La PCR fue específica para las cepas de *Psychrobacter immobilis* y no hubo amplificación con las cepas de otros géneros utilizadas. Durante la realización de este trabajo no se utilizaron cepas de otras especies de *Psychrobacter*, ya que no estaban disponibles en el momento en que se llevaron a cabo los experimentos; otras especies de *Psychrobacter* son también lipolíticas, como *P. glacincola*, *P. luti*, *P. okhotskensis* o *P. cryohalensis* (Bakermans 2006), y sería interesante comprobar la presencia de un gen de similares características al detectado en las cepas de *P. immobilis*.

En resumen, se ha puesto a punto una técnica de PCR para la detección específica del gen de la lipasa presente en cepas de *P. immobilis* que puede ser de utilidad para la detección rápida de estas bacterias en alimentos y para la diferenciación de otros microorganismos presentes en los mismos hábitats y de similares características fenotípicas.



**Capítulo V. Desarrollo de un medio de cultivo selectivo y diferencial para el aislamiento de *Psychrobacter* spp.**



## **INTRODUCCIÓN**

Los medios de cultivo que se utilizan en el laboratorio de microbiología alimentaria son una mezcla equilibrada de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y con unas condiciones físicas y fisico-químicas óptimas, permiten un buen crecimiento de los microorganismos. Normalmente contienen una base mineral, fuente de carbono, nitrógeno y azufre y los factores de crecimiento necesarios, además de ser necesario tener en consideración la atmósfera en la que se va a llevar a cabo la incubación. Se pueden diferenciar varios tipos de medios de cultivo (Madigan *et al.* 1997; Harrigan 1998):

- Medio sintético, constituido por componentes perfectamente definidos.
- Medio complejo, se añaden sustancias o ingredientes no definidos (mezclas de proteínas, extracto de levadura, extracto de carne...) que hacen posible el desarrollo de gran variedad de bacterias.
- Medio electivo, que satisface las necesidades nutritivas de un microorganismo determinado y que tienen su mayor utilidad cuando estas necesidades no son muy comunes.
- Medio selectivo, medio básico que puede favorecer el crecimiento de diferentes tipos de bacterias, pero que incluye uno o más agentes inhibidores, impidiendo o limitando el desarrollo de bacterias no interesantes.
- Medio diferencial, aquel en el cual ciertas bacterias forman colonias típicas que se pueden reconocer fácilmente.

Es importante considerar que en un medio determinado pueden concurrir varias de estas circunstancias, por ejemplo que sea al mismo tiempo selectivo y diferencial.

El aislamiento de un microorganismo concreto en un medio se fundamenta en generar un ambiente de cultivo adecuado para favorecer el desarrollo del microorganismo de nuestro interés y que no sea favorable para el resto de microorganismos presentes en la muestra que se analiza. Existen de forma comercial medios de cultivo preparados por diversos fabricantes que cubren las necesidades de aislamiento de la mayoría de microorganismos de interés en los diversos campos de la microbiología; sin embargo, cuando la investigación se centra en microorganismos novedosos o poco conocidos, no

siempre se encuentran los medios más adecuados para su aislamiento y es necesario proceder al diseño de nuevas formulas.

El diseño de un medio de cultivo tiene que realizarse de una forma progresiva y sistemática (Bolton 1998). En primer lugar, hay que considerar las características del microorganismo de nuestro interés y de otros microorganismos “no de interés” o “competidores”, seleccionando un número adecuado de cepas de referencia, tanto procedentes de colecciones de cultivo como aislamientos naturales, si es posible, que representen los dos tipos de poblaciones microbianas (de interés y de “no interés”). También hay que tener presente las características que queremos que tenga el medio (selectivo, diferencial, electivo o combinaciones de estos tipos) y el uso previsto que se le va a dar (cualitativo para la detección de un microorganismo o cuantitativo para su recuento) así como el formato de uso (medio sólido, medio líquido, posible uso para la técnica del NMP).

Con estas consideraciones en mente, se pasaría a la fase de diseño propiamente dicha, en la que hay que seleccionar el medio base, las adiciones que se le van a hacer (diferenciales, selectivas) y el método o los métodos de validación de su eficacia.

El aislamiento de *Psychrobacter* a partir de alimentos o de otras muestras naturales es difícil, ya que representan una fracción menor de la microbiota total. Por ello, aunque algunos autores recomiendan el uso de medios nutritivos con una concentración de NaCl de 0,5-1M para el aislamiento de cepas de ambientes naturales (Bowman 2006), la ausencia de caracteres fenotípicos que permitan su diferenciación no hace aconsejable el uso de estos medios para su aislamiento a partir de alimentos (Gennari *et al.* 1992). Debido a la baja eficacia de los medios nutritivos, Gennari *et al.* (1992) utilizaron medios basales a los que adicionaban sales biliares y cristal violeta (medio M, cuya base era agar nutritivo, y medio B, con una base mineral estándar), inicialmente pensados para el estudio de *Acinetobacter*, pero que permitieron aumentar la eficacia de aislamiento de *Psychrobacter*, aunque en el trabajo citado no se dan las cifras concretas. Estos medios, sin embargo, no fueron evaluados con una metodología específica para el diseño de medios de cultivo, enfrentándolos a cepas de otros microorganismos que pudieran interferir con la detección de *Psychrobacter*.

También se ha comprobado que cepas de *Psychrobacter* spp. pueden crecer en un medio mineral con la adición de lactato sódico y/o glutamato monosódico como fuente

de carbono y sales de amonio como fuente de nitrógeno. Precisamente esta capacidad se ha aprovechado para formular los medios definidos que se utilizan para el ensayo de transformación, M9A y P96 (Juni 1991), pero, en nuestra experiencia, en estos medios las bacterias crecen muy lentamente y además no presentan ninguna característica diferencial.

Precisamente, en la realización de esta memoria, una de las etapas más dificultosas fue el aislamiento y diferenciación de microorganismos sospechosos de pertenecer al género *Psychrobacter*, ya que hubo que recurrir al uso de medios no selectivos ni diferenciales, lo que implica el aislamiento de un gran número de cepas que tienen que ser estudiadas posteriormente, teniendo que descartar la mayor parte de ellas.

Por ello, teniendo en cuenta estos antecedentes y los datos acumulados en los apartados previos de este trabajo, en este capítulo se aborda el diseño de un medio de cultivo sólido que facilite el recuento y diferenciación de colonias de *Psychrobacter*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Microorganismos, medios y reactivos*

Como microorganismo de interés se ha seleccionado la especie *Psychrobacter immobilis*, empleando 4 de las cepas de colección de esta especie (7062, 1071, 5008, 5372) y 4 de las aisladas a partir de muestras de alimentos (RM1, RM4 y RM6 de carne de conejo y SLL4 de moluscos bivalvos). Como microorganismos “competidores” o “de no interés” se utilizaron 7 cepas patrón de referencia de otros microorganismos que comparten características fenotípicas con los microorganismos del género *Psychrobacter* y también pueden estar presentes en los mismos hábitats: *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lundensis*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*.

Los microorganismos se mantenían en glicerol a -40 °C. La recuperación se hizo rutinariamente en caldo TSB a 25 °C durante 24 h, empleando este cultivo como cultivo madre.

Los medios de cultivo empleados se citan en la Tabla V.1

**Tabla V.1.** Medios de cultivo, abreviatura y casa comercial.

Medio de cultivo	Abreviatura	Casa comercial
Tryptona Soja,	TS	Oxoid
Blue Base	BB	Oxoid
Heart Infusion	HI	Oxoid
LB	LB	Oxoid
M9CA*	M9CA	Formulación
P96	P96	Formulación

\* El medio M9CA es similar a la formulación del medio M9A (Juni and Heym 1980), sustituyendo el hidrolizado de caseína por una concentración similar de casaminoácidos.

Los reactivos químicos de calidad analítica fueron adquiridos a las casas Merck, Sigma-Aldrich y Panreac.

### *Elección del medio base*

El medio base tiene que ser un medio de cultivo en el que la productividad del microorganismo sea elevada. Aunque nuestra experiencia indica que las bacterias del género *Psychrobacter* crecen bien en medios nutritivos, para obtener una evidencia cuantitativa se probaron los diversos medios que se indican en la Tabla V.1, tanto en

formato líquido como sólido (por la adición de agar al 1 % final): HI, LB-broth, TSB, BB-broth, P96-broth, M9CA-broth y HIA, LB agar, TSA, BAB, P96, M9CA

Los ensayos de crecimiento en medio líquido se llevaron a cabo con el equipo Bioscreen de forma similar a los experimentos explicados en el Capítulo I. Los diferentes caldos a ensayar se inocularon (por quintuplicado) con 10  $\mu$ l del cultivo madre de las cepas de *Psychrobacter*. El sistema se programó para incubar a 25 °C, tomando medidas de la densidad óptica a 600 nm cada 20 minutos durante 28 h.

En los medios sólidos, en primer lugar se realizaron diluciones decimales del cultivo madre y a continuación se hizo un recuento del número de microorganismos presentes mediante dos métodos de inoculación diferentes:

- Siembra por gotas en superficie: la placa se dividió en tres sectores y en cada uno de ellos se inocularon tres gotas de 20  $\mu$ l cada una de las diferentes diluciones decimales.
- Siembra en espiral. Se usó un equipo de siembra en espiral (Interscience) para inocular las diferentes diluciones decimales, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Con los resultados obtenidos se hizo un análisis de varianza univariante y se tomó la diferencia entre medias y su significación al 95 %. Se analizaron los datos y se eligió el medio base más adecuado, entendiendo en el caso del medio sólido aquél en el que se obtuvo el recuento más elevado y en el medio líquido en el que se obtuvo la fase de latencia más corta y la mayor densidad de crecimiento.

### ***Elección de los promotores de crecimiento***

Como sustancias promotoras del crecimiento se ensayaron los compuestos sugeridos por Juni (1991) para estimular el crecimiento de *Psychrobacter*, es decir, lactato sódico, glutamato monosódico y cloruro amónico, en las concentraciones finales del medio P96, que se sabe que permite el crecimiento eficaz de *Psychrobacter* (Juni 1991). Estas concentraciones son 4 mM de lactato sódico, 27 mM de glutamato monosódico y 10 mM de cloruro amónico.

El medio base seleccionado (caldo) se adicionó con las 7 combinaciones posibles de promotores (un solo promotor, dos promotores y tres promotores) y cada uno de los

medios se inoculó y analizó en el Bioscreen de la forma explicada para la elección del medio base, comparando el crecimiento con el obtenido en el medio base.

Una vez definida la mezcla de promotores más eficaz, se realizó un recuento de los microorganismos de interés en medio sólido, tanto en medio base sólido sin adiciones como en el medio base con la adición de la mezcla de promotores más eficaz, empleando el método de recuento por siembra en espiral.

### ***Elección de los compuestos inhibidores***

Como compuestos inhibidores se probaron el feniletanol y el NaCl en las siguientes concentraciones:

- Feniletanol al 0,25, 0,5 y 1 %.
- NaCl al 5, 6, 7, 8 y 9 %

En el caso del medio líquido, se utilizó el Bioscreen. Para ello se sembraron en cada pocillo que contenía el medio base con el inhibidor correspondiente, 10 µl de cultivo madre de *Psychrobacter* y de los microorganismos “competidores”. Se sembraron 4 réplicas de cada concentración y se programó el equipo para incubar durante 24 h a 25 °C, midiendo la absorbancia a 600 nm cada 10 minutos.

En medio sólido se comparó el crecimiento en medio base sin inhibidor y con inhibidor, sembrando los microorganismos e incubando a 25 °C durante 24 h.. Al final del período de incubación las placas se valoraron visualmente.

### ***Elección de agentes diferenciales***

Se tuvieron en consideración los resultados obtenidos en el capítulo II y se seleccionaron para su ensayo los siguientes agentes diferenciales:

- Tributirina 1 %
- Rojo Congo 0,03 %

Los agentes diferenciales se añadieron al medio base y a distintas formulaciones del medio base con promotores e inhibidores, en función de los resultados que se iban obteniendo. Se preparó medio sólido los microorganismos se inocularon a partir del cultivo madre, incubándose a 25 °C durante 48 h. Las placas se valoraron visualmente al final del período de incubación.

### ***Evaluación y validación***

Una vez definida la fórmula óptima del medio de cultivo se procedió a su evaluación. Para esta etapa se seleccionaron tres cepas de microorganismos: dos cepas de *Psychrobacter immobilis* que presentaban el mayor (cepa RM4) y el menor crecimiento (cepa 7062) en el medio base después de incubar a 25 °C durante 24 h y la cepa de *Pseudomonas fragi* Ps 10.

La normalización de los cultivos se llevó a cabo inoculando tubos con 6 ml de caldo TSB con una colonia aislada procedente de placas de TSA e incubando durante 8 horas a 25 °C para posteriormente transferir 40 µl de estos caldos a tubos con 6 ml de caldo HI que se incubaron durante 15h a 25 °C. De estos tubos de caldo HI se tomó una alícuota de 1 ml. y se midió la absorbancia a 600 nm, realizando los cálculos de los volúmenes necesarios para obtener una densidad óptica de 0,6. Esta concentración final se consiguió mediante la adición de caldo HI estéril.

Una vez normalizados los cultivos a una densidad óptica a 600 nm de 0,6, se realizaron diluciones decimales en solución de peptona al 0,1 % y se procedió al recuento por siembra de alícuotas de 0,1 ml en la superficie de placas de medio HIA y del medio formulado para *Psychrobacter*, que se incubaron a 25 °C durante 24 h.

Para la validación se utilizaron cuatro tipos de alimentos:

1. Leche UHT
2. Trucha fileteada
3. Mejillón
4. Carne de ternera

En todos los alimentos se simulaban tres condiciones diferentes (Tabla V.2): presencia de *Psychrobacter* como microorganismo mayoritario, presencia de *Psychrobacter* y *Pseudomonas* en concentraciones similares y presencia de *Psychrobacter* y *Pseudomonas* en una concentración dominante del segundo microorganismo.

**Tabla V.2.** Condiciones de incubación (concentraciones de *Psychrobacter* y *Pseudomonas* inoculadas en los distintos alimentos).

	<i>Psychrobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
Condición I	10 <sup>2</sup> ufc/ml	
Condición II	10 <sup>2</sup> ufc/ml	10 <sup>2</sup> ufc/ml
Condición III	10 <sup>2</sup> ufc/ml	10 <sup>4</sup> ufc/ml

En el caso de la leche, se utilizó leche UHT entera comercial, tomando fracciones de 100 ml, que se inoculaban con los volúmenes necesarios de cultivo para conseguir las distintas condiciones. Como control se utilizan botes con 100 ml de caldo HI. Después de inocular los botes se dejaban reposar 15 minutos a refrigeración y se realizaba el recuento mediante siembra de alícuotas en la superficie del medio HIA y del medio formulado, incubando 24 h a 25 °C.

Para los alimentos sólidos (trucha, mejillón y carne de ternera) se prepararon muestras asépticamente. Los alimentos se compraron en un supermercado (ejemplares enteros de trucha, mejillones vivos y trozos grandes de carne de ternera) y se transportaron refrigerados al laboratorio, donde se procesaron en condiciones asépticas para conseguir porciones estériles (trozos internos de músculo en el caso de la trucha y la carne de ternera y trozos de la parte comestible de mejillón) de 10 g. Estas porciones se almacenaron a -40 °C en recipientes estériles hasta su uso.

Los experimentos se realizaban tomando tantas porciones de alimento como eran necesarias y se dejaban a 4 °C durante 12 horas para su descongelación parcial. Los 10 g de muestra se homogeneizaban con 90 ml de solución de peptona al 0,1 % en un Stomacher y los homogeneizados se inoculaban y procesaban de igual forma a la descrita para la leche.

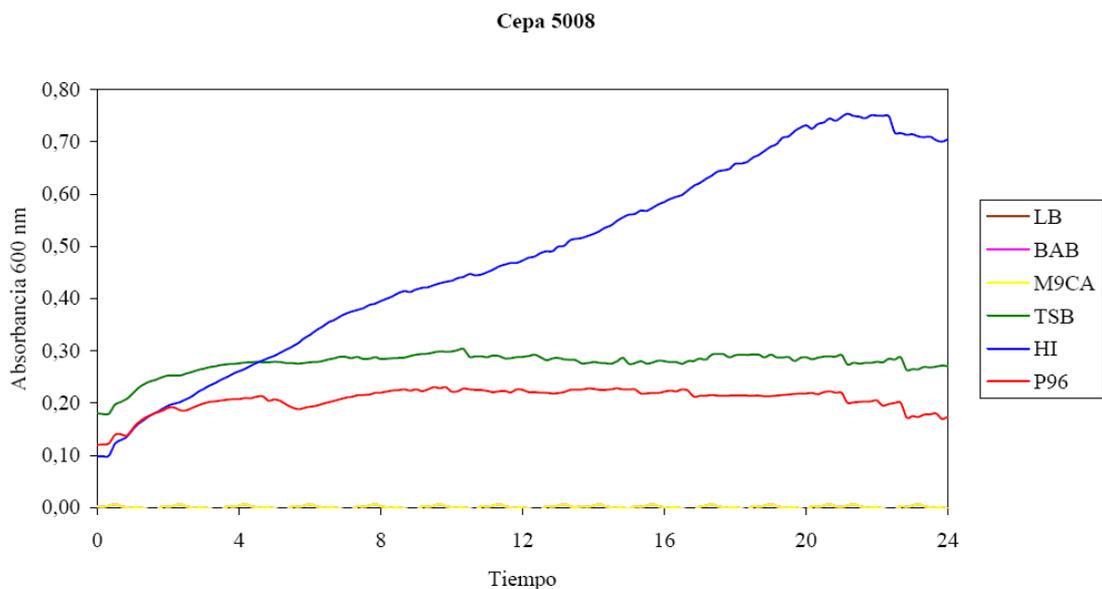
Los datos de recuento se analizaron estadísticamente por medio del software SPSS (SPSS Inc., Chicago).

Para confirmar la identidad de las cepas que crecían en las placas de los medios sólidos se tomaron colonias aisladas que se resuspendían en 100 µl de agua estéril. Las células se rompían por ebullición y este preparado se procesaba por PCR para amplificar el fragmento del gen *lip1*, como se explicó en el Capítulo IV.

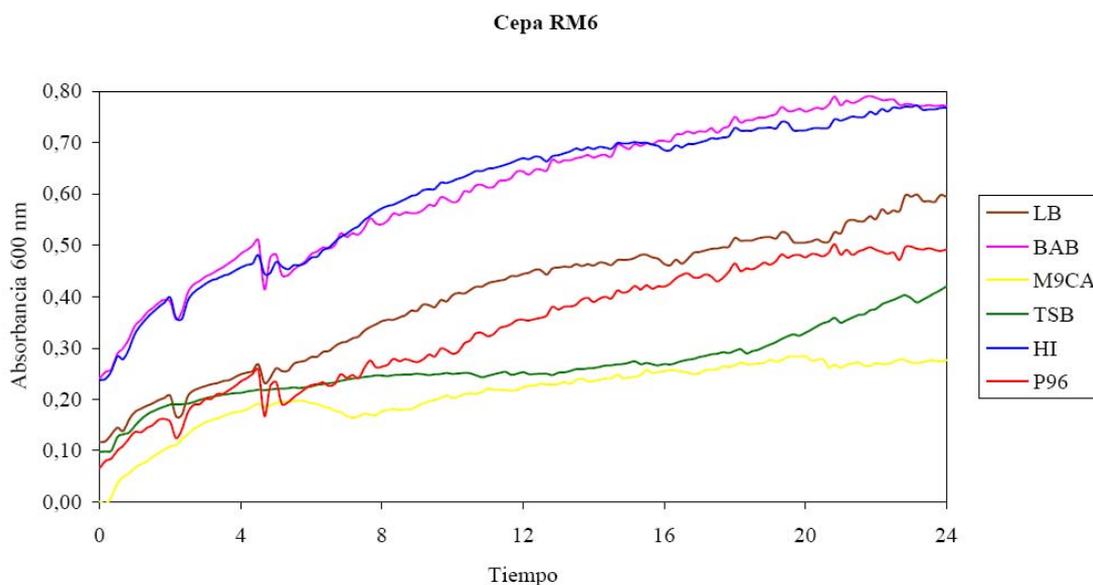
## RESULTADOS

De los 6 medios ensayados, el medio HI (tanto el caldo como el medio sólido) fue en el que se producía mayor recuento de bacterias tras 24 horas de incubación a su temperatura óptima en 4 de las 8 cepas utilizadas para el ensayo (7062, 5372, RM1 y 5008); 2 cepas crecían mejor en el medio P96 (1071 y SLL4), y otras 2 en BAB (RM6 y RM4). En los casos donde el medio más eficaz resultó ser otro distinto al HI o al HIA, este se encontraba en segundo lugar sin muchas diferencias.

En las Figuras V.1 y V.2 se puede observar cómo varía el crecimiento de una cepa de colección (5008) y otra aislada de alimentos en el curso de este trabajo (RM6) en los 6 medios ensayados en cultivo líquido.



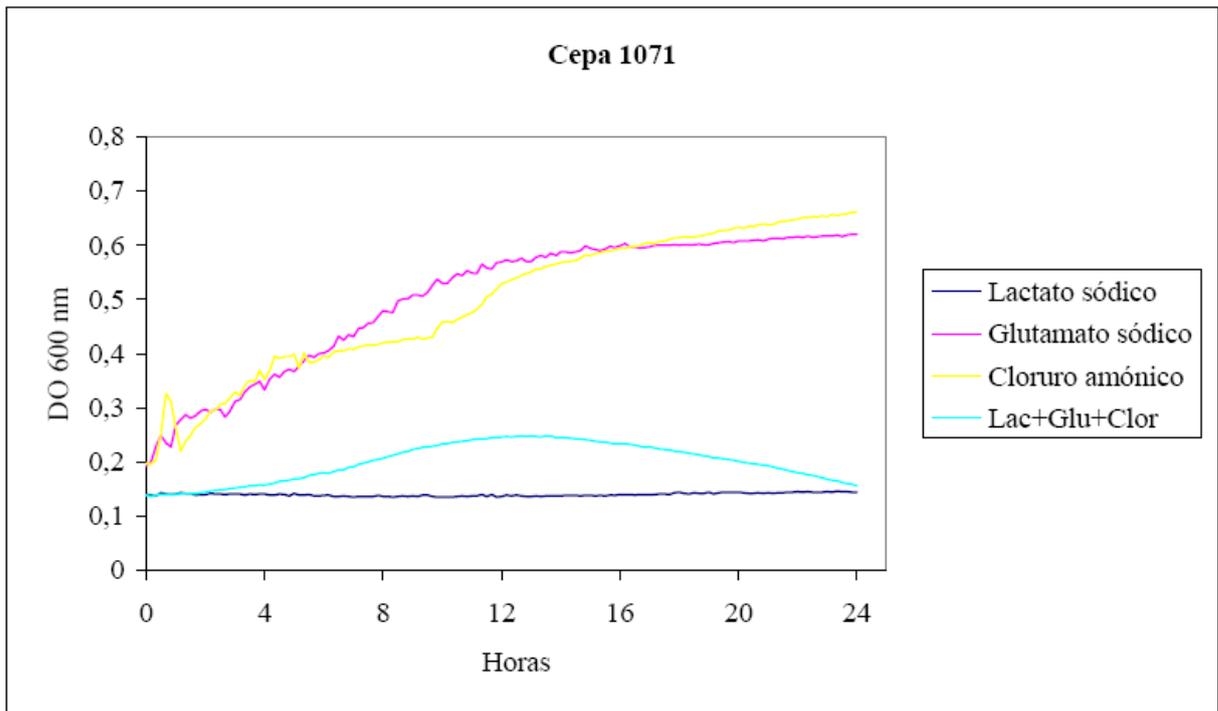
**Figura V.1.** Crecimiento (medida de la absorbancia a 600 nm) de la cepa 5008 en los medios de cultivo ensayados.



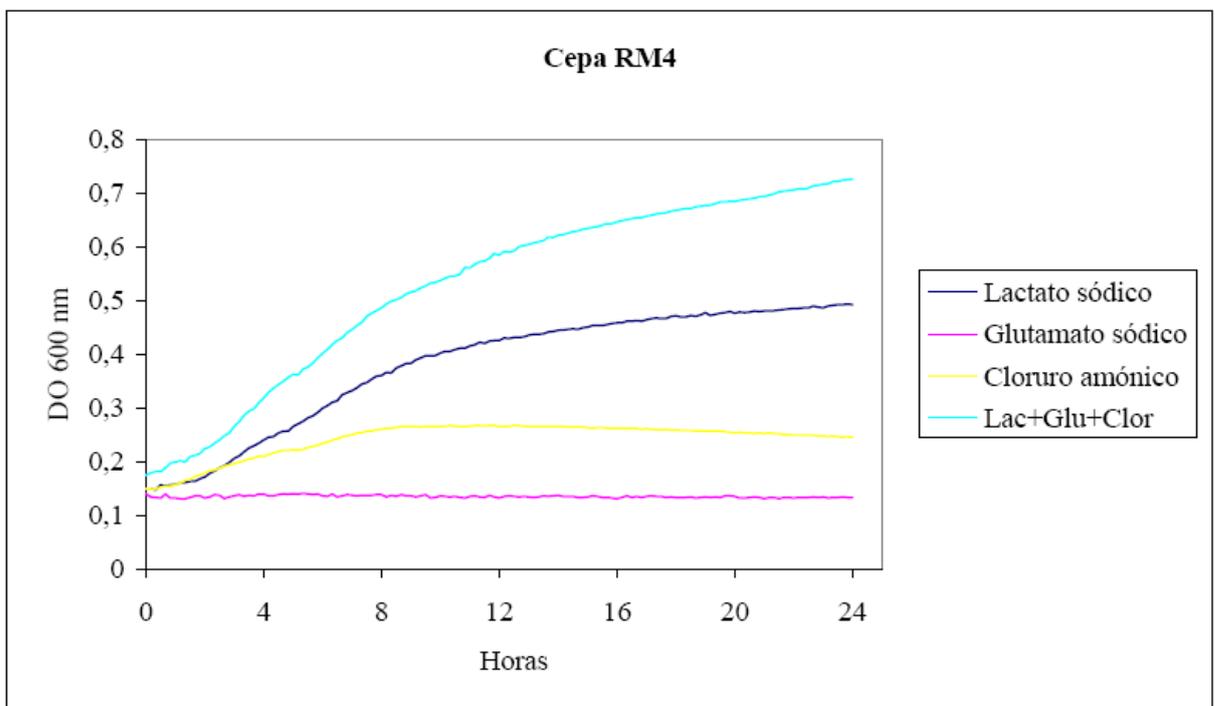
**Figura V.2.** Crecimiento (medida de la absorbancia a 600 nm) de la cepa RM6 en los medios de cultivo ensayados

El medio HI fue seleccionado como medio base y todos los experimentos posteriores se realizaron a partir de modificaciones de este medio y tomando como referencia el crecimiento de los microorganismos en él.

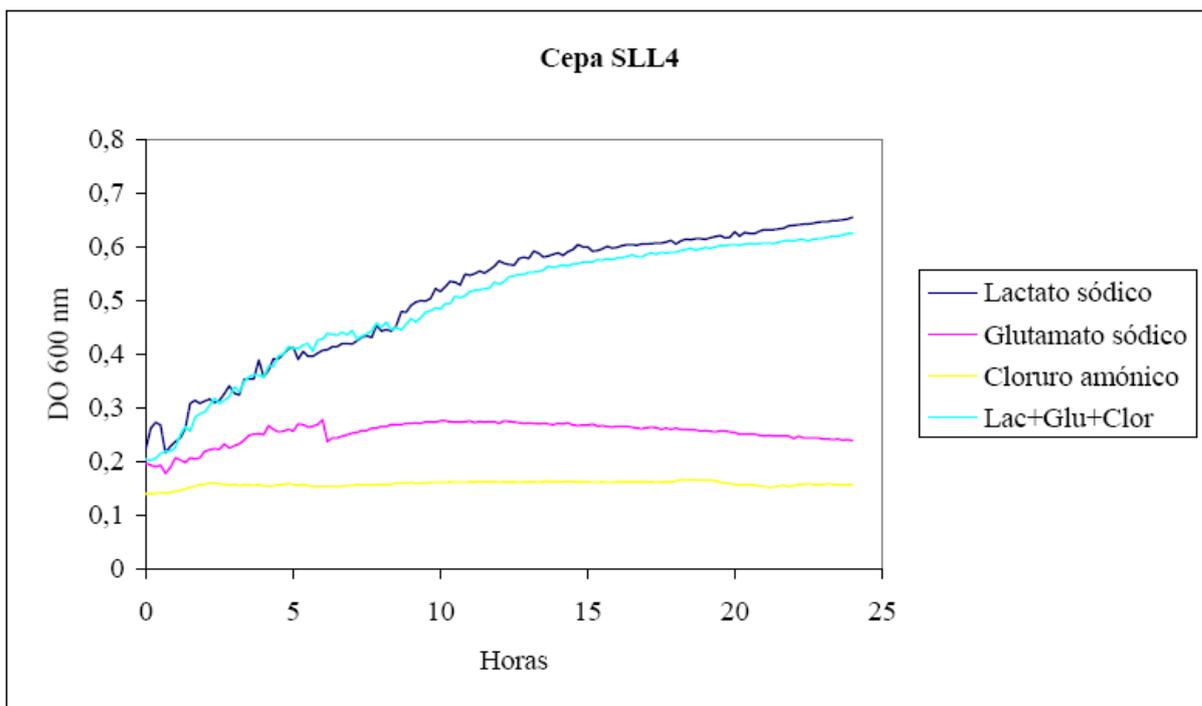
Entre los compuestos analizados como promotores del crecimiento, el cloruro amónico como resultó ser el más eficaz en 5 de las 8 cepas analizadas (5008, 5372, RM6, 7062, 1071), en otras 2 (RM1 y RM4) fue una combinación de los tres promotores ensayados y para 1 cepa (SLL4) los máximos resultados de crecimiento se obtenían con el lactato sódico, aunque no había diferencias significativas entre este promotor y la mezcla de los tres promotores. En las Figuras V.3, V.4 y V.5 se muestran ejemplos de estos resultados, una vez descontados los datos de crecimiento en el medio base.



**Figura V.3.** Crecimiento de la cepa 1071 en medio HI con la adición de los diferentes promotores.

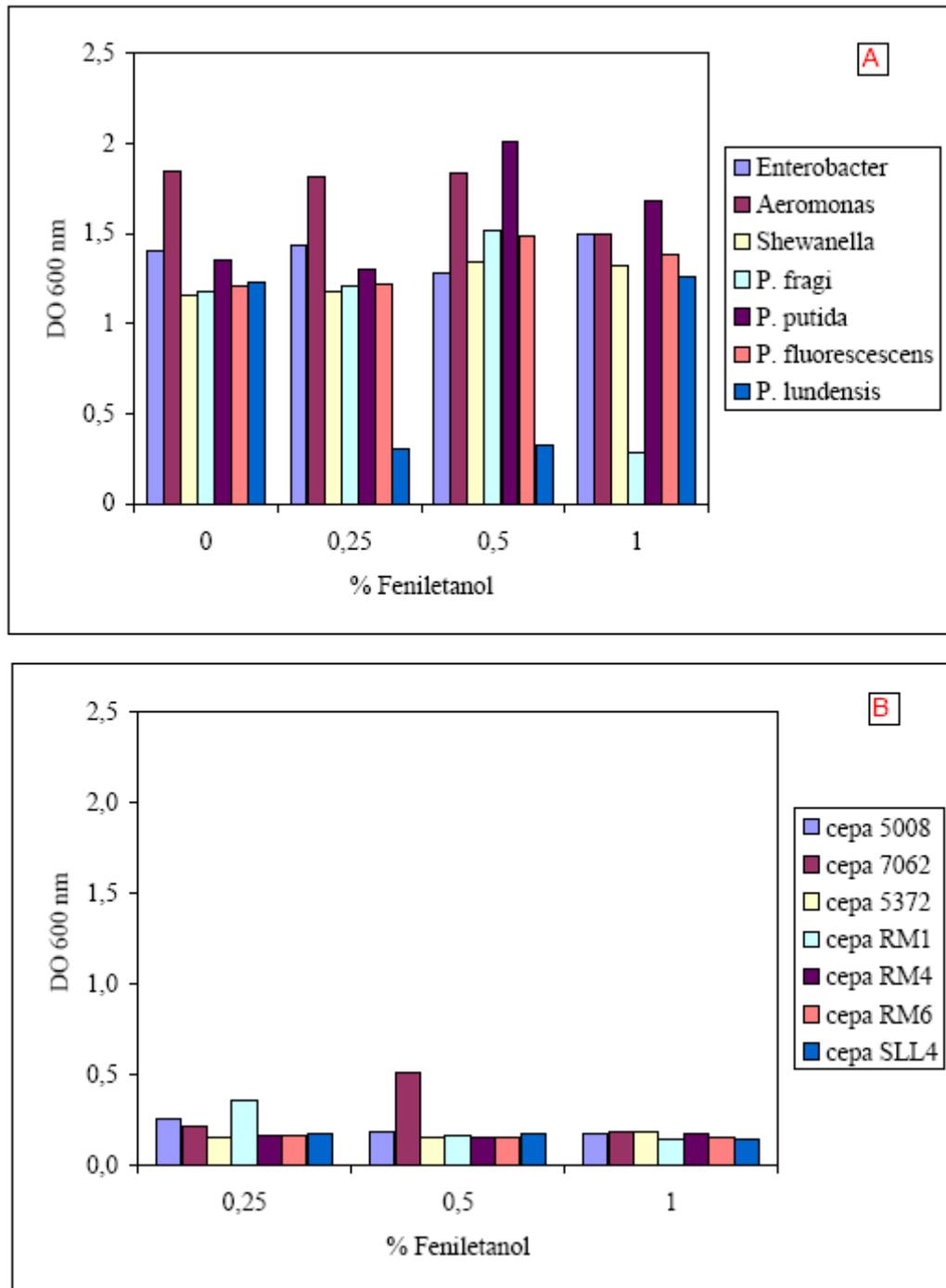


**Figura V.4.** Crecimiento de la cepa RM4 en medio HI con la adición de los diferentes promotores.

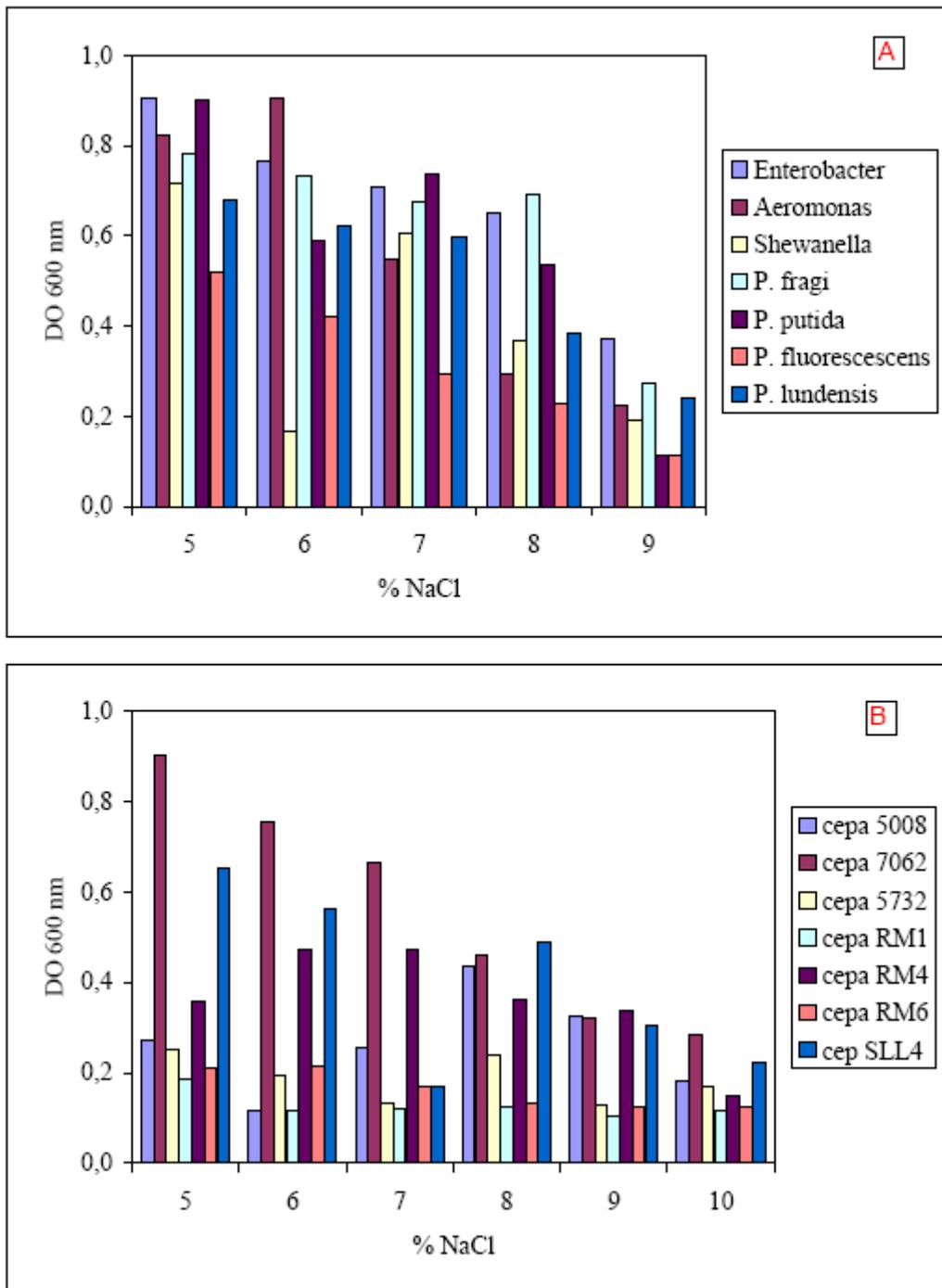


**Figura V.5.** Crecimiento de la cepa SLL4 en medio HI con la adición de los diferentes promotores.

En cuanto a la utilización de inhibidores, ninguna de los dos compuestos analizados cumplió el objetivo de selectividad para la inhibición de los microorganismos competidores. El feniletanol inhibía parcialmente a alguno de los microorganismos competidores, pero el efecto inhibitor era mucho mayor sobre las cepas de *Psychrobacter* (Figura V.6). Por su parte todas las cepas ensayadas eran resistentes a concentraciones bajas de NaCl y se necesitaban concentraciones superiores al 5 % para lograr la inhibición (Figura V.7). Las cepas de *Psychrobacter* eran moderadamente resistentes al NaCl (en general, las concentraciones bacterianas que se alcanzaban con concentraciones elevadas de NaCl no eran altas, pero las cepas de *Psychrobacter* se multiplicaban en medios que contenían hasta un 10 % de NaCl; Figura V.7 B) por lo que este compuesto fue el seleccionado como agente inhibitor (a una concentración del 5 %) para la formulación del medio de aislamiento.



**Figura V.6.** Efecto del feniletanol en el crecimiento de los microorganismos competidores (A) y de las cepas de *Psychrobacter* (B)



**Figura V.7.** Efecto del NaCl en el crecimiento de los microorganismos competidores (A) y de las cepas de *Psychrobacter* (B)

Los dos agentes diferenciales utilizados permitían observar un crecimiento característico en las cepas de *Psychrobacter*, pero la tributirina era utilizada por varios de los microorganismos competidores, manifestando una reacción muy similar a la de las cepas de *Psychrobacter*. El Rojo Congo era incorporado por las cepas de *Psychrobacter* en 48 horas, dando lugar a colonias con el centro teñido de rojo, fácilmente observable. En este período de incubación de 48 horas los microorganismos competidores no incorporaban el Rojo Congo o lo hacían de forma poco eficaz, dando lugar a colonias no coloreadas.

Con todos los datos obtenidos, la formulación del medio de cultivo sería la siguiente:

- Heart Infusion (HI).....25 g
- Agar bacteriológico ..... 15 g
- NH<sub>4</sub>Cl.....0,5 g
- NaCl.....50 g
- Rojo Congo.....0,03g
- Agua destilada ..... 1 l
- pH.....7,4

Para la preparación del medio se pesan y disuelven todos los componentes en el agua destilada y se lleva a ebullición para la fusión del agar. El medio se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y posteriormente se vierte en placas de Petri para su uso.

En la Figura V.8 se puede ver que las bacterias del género *Psychrobacter* crecen como colonias de 2 mm de diámetro, incoloras a las 24 horas y con el centro rojo intenso por la incorporación del rojo Congo a las 48 h. El resto de especies bacterianas probadas crecen a las 48 h como colonias pequeñas e incoloras.

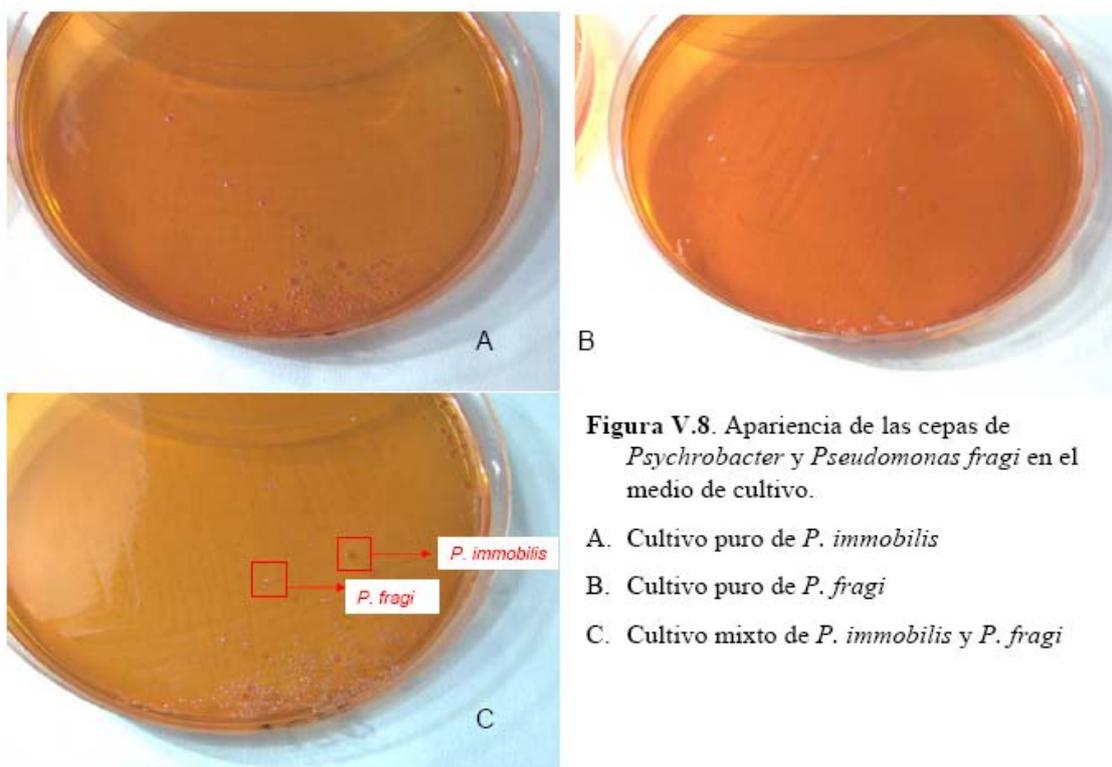


Figura V.8. Apariencia de las cepas de *Psychrobacter* y *Pseudomonas fragi* en el medio de cultivo.

- A. Cultivo puro de *P. immobilis*
- B. Cultivo puro de *P. fragi*
- C. Cultivo mixto de *P. immobilis* y *P. fragi*

La evaluación del medio se realizó comparando en primer lugar los recuentos obtenidos sobre placas de HIA y sobre placas del medio formulado, no observándose diferencias significativas (comparación de medias mediante la “t de Student”) en los resultados obtenidos en los dos medios en las distintas condiciones ensayadas.

En la Tabla V.3 se muestran los resultados del recuento de *Psychrobacter* obtenido en la validación en alimentos para las diferentes condiciones ensayadas. En color rojo se indican las diferencias significativas entre las medias de log ufc/g, aunque hay que considerar que los datos referidos al recuento en el medio HIA incluyen tanto las colonias de *Psychrobacter* como las de *Pseudomonas*, ya que en este medio ambos microorganismos son indistinguibles.

**Tabla V.3.** Media de los recuentos obtenidos para las diferentes condiciones ensayadas en los alimentos inoculados y comparación entre las medias obtenidas en placas de medio HIA y en el medio formulado (en color rojo se indican las diferencias significativas entre las medias de la misma fila)

	Leche				Trucha			
	HIA		Medio		HIA		Medio	
	Media	Desv	Media	Desv	Media	Desv	Media	Desv
7062 10 <sup>2</sup>	2,08	0,24	2,00	0,28	2,14	1,34	1,73	0,36
7062 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>2</sup>	1,95	0,51	1,64	0,46	2,15	1,08	2,10	0,43
7062 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>4</sup>	3,59	0,18	2,73	0,82	2,96	1,51	2,74	0,93
RM4 10 <sup>2</sup>	2,09	0,36	1,56	1,06	1,78	0,88	2,63	0,81
RM4 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>2</sup>	2,33	0,26	1,98	0,66	2,22	1,14	2,02	0,45
RM4 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>4</sup>	3,59	0,19	2,46	1,65	3,16	1,56	2,57	0,87

(Tabla V.3. Continuación)

	Mejillón				Ternera			
	HIA		Medio		HIA		Medio	
	Media	Desv	Media	Desv	Media	Desv	Media	Desv
7062 10 <sup>2</sup>	2,91	0,34	2,52	1,47	4,16	0,15	3,43	0,30
7062 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>2</sup>	3,01	0,60	2,68	1,54	3,20	0,40	3,32	0,35
7062 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>4</sup>	3,30	0,37	2,58	1,63	4,09	0,34	3,28	0,46
RM4 10 <sup>2</sup>	2,87	0,52	2,40	1,42	4,00	0,27	3,63	0,56
RM4 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>2</sup>	3,34	0,49	2,74	1,61	4,13	0,25	3,06	0,96
RM4 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>4</sup>	2,01	1,85	2,56	1,60	3,91	0,26	3,87	0,46

El análisis estadístico también proporcionó el grado de significación en la comparación de las medias mediante la “t de Student” y observándose diferencias significativas en trucha (en 4 casos) y en carne de ternera (en 3 casos), aunque como se muestra en la Tabla las diferencias no son grandes (Tabla V. 4).

**Tabla V.4.** Grado de significación de la capacidad de recuperación de varias muestras de diferentes alimentos.

	<b>LECHE</b>	<b>TRUCHA</b>	<b>MEJILLÓN</b>	<b>TERNERA</b>
7062 10 <sup>2</sup> Alim	0,679889	0,477391	0,582451	<b>0,001350</b>
7062 10 <sup>2</sup> HI	0,996187	<b>0,002323</b>	0,346927	0,796908
7062 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>2</sup> Alim	0,395418	0,907980	0,668614	0,640441
7062 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>2</sup> HI	0,090759	0,068823	0,806998	0,343403
7062 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>4</sup> Alim	0,085066	0,767212	0,363177	<b>0,013499</b>
7062 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>4</sup> HI	0,115426	<b>0,053911</b>	0,271127	0,659368
RM4 10 <sup>2</sup> Alim	0,379164	0,114664	0,507712	0,219397
RM4 10 <sup>2</sup> HI	0,064461	<b>0,028668</b>	0,440409	0,265993
RM4 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>2</sup> Alim	0,371219	0,709285	0,442640	<b>0,041471</b>
RM410 <sup>2</sup> Ps10 <sup>2</sup> HI	0,383150	0,439161	0,191466	0,987947
RM410 <sup>2</sup> Ps10 <sup>4</sup> Alim	0,221474	0,439161	0,625718	0,851892
RM4 10 <sup>2</sup> Ps10 <sup>4</sup> HI	0,310733	<b>0,000667</b>	0,644895	0,196784

Todas las colonias con la apariencia típica de *Psychrobacter* que fueron analizadas por PCR dieron un resultado positivo para la amplificación del gen *lip1*, mientras que aquellas que no presentaban la apariencia típica fueron negativas.

## DISCUSIÓN

Aunque se pueden encontrar en la bibliografía bastantes referencias sobre el aislamiento de bacterias del género *Psychrobacter* a partir de muestras de alimentos, la mayor parte de estos trabajos se llevaron a cabo empleando medios de cultivo nutritivos, que permitían el crecimiento de prácticamente cualquier microorganismo presente en las muestras, realizando con posterioridad una trabajosa tarea de selección e identificación de las cepas aisladas (Shaw and Latty 1988; Prieto *et al.* 1992; Gennari *et al.* 1999; González *et al.* 2000; Pacova *et al.* 2001; Sakala *et al.* 2002; Björkevoll *et al.* 2003). En muy contadas excepciones se hace uso de medios de aislamiento selectivo (Gennari *et al.* 1992), aunque éstos no estaban formulados específicamente para *Psychrobacter*.

La experiencia adquirida en el aislamiento de cepas de *Psychrobacter* a partir de muestras de alimentos nos indica que el uso de medios sin características selectivas y/o diferenciales hace muy difícil la detección rutinaria de esta bacteria y es necesario procesar un número elevado de cepas para aislar bacterias de este género.

Se considera que las bacterias del género *Psychrobacter* crecen bien en medios de cultivo nutritivos (sobre todo si se les añade 0,5-1 M de NaCl) a temperatura ambiente (20-25 °C) (Bowman 2006). La experiencia en nuestro laboratorio indica que, aunque en general se pueden cultivar en cualquier medio nutritivo, hay diferencias en la tasa de crecimiento y el medio HIA es el que ofrece mejores resultados (Figuras V1 y V.2). Precisamente este medio es el que se utiliza de forma rutinaria para cultivar las cepas para el ensayo de transformación (Juni and Heym 1980), aunque no se indica ninguna razón particular para ello.

El medio base seleccionado es un medio muy rico, que cubre las necesidades nutritivas de la mayoría de los microorganismos presentes en los alimentos y en otros tipos de muestras, siempre que no presenten ningún requisito especial. Por esta razón, no es necesario añadir ninguna sustancia nutritiva para el cultivo rutinario de *Psychrobacter*; sin embargo, cuando se utilizan medios definidos, se pueden añadir otros compuestos que actúen como promotores del crecimiento, como en el caso del medio propuesto por Juni (1991), en donde se utiliza glutamato lactato y cloruro amónico como promotores del crecimiento de estas bacterias, nuevamente sin indicar

las razones por las que se seleccionan los mismos. Como se puede comprobar en las Figuras V.3, V.4 y V.5, las diferentes adiciones de estos compuestos permitieron, en general, un mayor crecimiento de las cepas de *Psychrobacter*, aunque en algunos casos el efecto fue inapreciable. El cloruro amónico fue el compuesto que resultó eficaz en un mayor número de cepas y por esta razón se seleccionó como promotor. Las razones por las que estimula el crecimiento no están claras, ya que el medio base tiene un contenido en nitrógeno alto (superior al 12 % de acuerdo con los datos del fabricante), por lo que el suplemento adicional que supone el cloruro amónico no justificaría el efecto observado; asimismo, el medio tiene un pH neutro, sin que el compuesto añadido modifique sustancialmente la acidez.

La tributirina y el rojo Congo como agentes diferenciales dan un resultado satisfactorio con las cepas de *Psychrobacter*, pero la tributirina es también usada por otros microorganismos “competidores”, mientras que la utilización del rojo Congo no es tan frecuente. Por esta razón se seleccionó el rojo Congo como agente diferencial, con la precaución de no prolongar el tiempo de incubación más allá de 48 horas.

El uso de compuestos inhibidores es difícil de abordar, ya que el número y la diversidad potencial de microorganismos que pueden encontrarse en los alimentos junto con *Psychrobacter* es muy grande. Así, por ejemplo, los resultados de caracterización inicial de las cepas de *P. immobilis* (Capítulo I) indicaban que el sulfato de colistina podría ser un buen agente selectivo, ya que inhibía a las cepas de *Pseudomonas fragi*, mientras que permitía el crecimiento de las de *Psychrobacter*; sin embargo, al ampliar el espectro de microorganismos de interés, esta selectividad desaparece, ya que muchos de ellos son resistentes a este compuesto, como ocurre con algunas especies de los géneros *Aeromonas* (Chang and Bolton 1987; Fosse *et al.* 2003), *Vibrio* (Lesmana *et al.* 2001) y, en general, de otras bacterias Gram negativas comunes en muestras de alimentos, como algunas especies de los géneros *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus* o *Serratia* (Gales *et al.* 2001). Por este motivo, no se consideró adecuado el empleo de este antibiótico como compuesto inhibidor en la formulación del medio.

Del mismo modo, el feniletanol ya había mostrado un carácter inhibidor de las cepas de *P. immobilis*, aunque de forma no homogénea entre las distintas cepas y más intenso a concentraciones bajas, mientras que las cepas de *Pseudomonas fragi* no se veían afectadas (Capítulo I). Al incrementar las concentraciones de feniletanol ensayadas se

puede observar que las cepas de *P. immobilis* se ven fuertemente inhibidas, al igual que algunas especies del género *Pseudomonas*, pero otras especies de este género (*P. putida* o *P. lundensis*) y otras bacterias Gram negativas no se ven afectadas por este compuesto (Figura V.6).

Finalmente se decidió el uso del NaCl como agente selectivo en la formulación del medio porque era el que mostraba una actividad más uniforme sobre todos los microorganismos ensayados. Las cepas de *P. immobilis* también se veían inhibidas por las concentraciones elevadas de NaCl, disminuyendo significativamente su tasa de crecimiento, pero en conjunto eran las más resistentes, tolerando concentraciones superiores al resto de las bacterias empleadas. Tras probar diferentes concentraciones en la formulación del medio, se concluyó que la presencia de NaCl al 5 % permitía alcanzar el objetivo de selectividad deseado.

El medio diseñado ofrece un rendimiento muy bueno en la recuperación de las cepas de *P. immobilis*, sin que se observen diferencias significativas con el medio HIA. Al utilizar el medio en el análisis de alimentos contaminados en el laboratorio, también se obtienen buenos resultados en la diferenciación de las cepas de *Psychrobacter* de las de *Pseudomonas fragi*, ya que la mayoría de las diferencias que se reflejan en la Tabla V.3 se deben a la incapacidad de diferenciar entre ambos microorganismos en el medio HIA, lo que da lugar a recuentos significativamente más elevados en este medio que el medio específico diseñado.

En la Tabla V.4 se aprecian diferencias significativas en la recuperación de los inóculos en muestras de trucha y carne de ternera, mientras que en leche y en mejillón no se observan diferencias. Esto puede estar relacionado con la dificultad de realizar estudios de contaminación artificial de alimentos, ya que existen muchos factores que pueden afectar al comportamiento de los microorganismos que no se pueden controlar, como se ha visto en experimentos de inoculación llevados a cabo con otras bacterias, como *Listeria monocytogenes* o *Salmonella* (Dalgaard and Jørgensen 1998; Gawande and Bhagwat 2002; Uyttendaele *et al.* 2004) y que también se había observado en nuestro laboratorio (Llanos *et al.* 2002).

En suma, el trabajo realizado en este capítulo ha permitido formular un medio de cultivo nutritivo, con un carácter diferencial y selectivo (aunque también se puede considerar electivo) para el aislamiento de *Psychrobacter* spp. a partir de muestras de

alimentos y su efectividad se ha demostrado sobre muestras de alimentos proteicos contaminados intencionadamente en el laboratorio

## **Conclusiones**



1. La incidencia de bacterias pertenecientes al género *Psychrobacter*, demostrada mediante un ensayo de transformación genética, en muestras de carne de conejo y de moluscos bivalvos encontrada en este trabajo es del 10,2 %. Estas bacterias no son identificadas por el sistema API 20NE, pero el uso de galerías comerciales permite obtener, de forma sencilla, múltiples resultados de interés fenotípico relacionados con la actividad enzimática y la producción de ácido a partir de azúcares.
2. Las cepas de *Psychrobacter immobilis* son, con carácter general, resistentes a lincomicina, oxacilina, tobramicina y clindomicina y parcialmente resistentes al sulfato de colistina. Además, la adición de 25 µg/ml y 100 µg/ml de este último compuesto, inhibe completamente a las cepas de *Pseudomonas fragi*.
3. Los microorganismos pertenecientes al género *Psychrobacter* ensayados en este trabajo muestran actividad lipolítica sobre la tributirina y el Tween 80 a 25 °C, mientras que a 4,5 °C su actividad sobre este último compuesto se ve considerablemente disminuida. Asimismo, también son proteolíticas y hemolíticas, siendo la caseína y la sangre de oveja respectivamente, los sustratos más adecuados para observar estas actividades, y poseen mecanismos relacionados con la captación de hierro, como la producción de sideróforos y la capacidad de incorporar Rojo Congo.
4. El análisis de la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S demuestra que las cepas incluidas en este estudio pertenecen al género *Psychrobacter*, pero que este método no es adecuado para realizar la adscripción a especie de las cepas. La tipificación molecular mediante RAPD y ribotipado revela la diversidad genética del género *Psychrobacter*; sin embargo, mientras que el ribotipado permite establecer relaciones filogenéticas entre las cepas, las condiciones de RAPD utilizadas en este trabajo no permiten el agrupamiento de las cepas estudiadas.
5. Se ha desarrollado una técnica de PCR basada en la amplificación del gen de la lipasa *lip1* que permite la amplificación específica de un fragmento de 420 pb en bacterias del género *Psychrobacter*, sin obtener amplificación cuando se utilizan microorganismos de otras especies que pueden causar confusión, como *Pseudomonas fragi* o que presentan actividad lipolítica, como *Aeromonas hydrophila*.

6. Se ha formulado un medio de cultivo sólido, con una base nutritiva y la adición de cloruro amónico, cloruro sódico y Rojo Congo, que permite la diferenciación fácil de los microorganismos del género *Psychrobacter*, de otros con los que comparten hábitat y características, principalmente del género *Pseudomonas*. La utilidad de este medio se ha puesto de manifiesto mediante el análisis de muestras de alimentos proteicos de origen animal (leche, pescado, moluscos y carne) inoculadas intencionadamente con diversas concentraciones de microorganismos pertenecientes a los dos géneros citados.

## **Bibliografía**



1. Altschul, S.F., Gish, W., and Miller, W. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
2. Arpigny, J.L., Feller, G., and Gerday, C. (1993) Cloning, sequence and structural features of a lipase from the Antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. *Biochim Biophys Acta* **1171**, 331-333.
3. Bakermans, C. (2006) *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int J System Evol Microbiol* **56**, 1285-1291.
4. Barghouti, S., Young, R., Olson, M.O.J., Arceneaux, J.E.L., Clem, L.W., and Byers, B.R. (1989) Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol* **171**, 1811-1816.
5. Baumann, P. (1968) Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J Bacteriol* **96**, 39-42.
6. Baumann, P., Doudoroff, M., and Stanier, R.Y. (1968) A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol* **95**, 1520-1541.
7. Bingen, E.H., Denamur, E., and Elion, J. (1994) Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev* **7**, 311-327.
8. Björkevoll, I., Olsen, R.L., and Skjerdal, O.T. (2003) Origin and spoilage potential of the microbiota dominating genus *Psychrobacter* in sterile rehydrated salt-cured and dried salt-cured cod (*Gadus morhua*). *Int J Food Microbiol* **84**, 175-187.
9. Bolton, F.J. (1998) Strategies in the development of media for the detection of food-borne pathogens. *Int J Food Microbiol* **45**, 29-34.
10. Bowman, J.P. (2006) The Genus *Psychrobacter*. In *The Prokaryotes*. Eds. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. pp. 920-930. Heidelberg: Springer.
11. Bowman, J.P., Cavanagh, J., Austin, J.J., and Sanderson, K. (1996) Novel *Psychrobacter* species from antarctic ornithogenic soils. *Int J System Bacteriol* **46**, 841-848.
12. Bowman, J.P., Nichols, D.S., and McMeekin, T.A. (1997) *Psychrobacter glacincola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice. *System Appl Microbiol* **20**, 209-215.
13. Bozal, N., Montes, M.J., Tudela, E., and Guinea, J. (2003) Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. *Int J System Evol Microbiol* **53**, 1093-1100.

14. Brisou, J. and Prevot, A.R. (1954) Etudes de systematique bacterienne. X. Revision des especes reunies dans le genre *Achromobacter*. *Ann Inst Pasteur* **86**, 722-728.
15. Chang, B.J. and Bolton, S.M. (1987) Plasmids and resistance to antimicrobial agents in *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 1281-1282.
16. Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., and Tiedje, J.M. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl Acids Res* **37**, D141-D145.
17. Collins, C.H. and Lyne, P.M. (1984) *Microbiological methods*. London: Butterworths.
18. Cowan, S.T. and Steel, K.J. (1974) *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.
19. Dalgaard, P. and Jørgensen, L.V. (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol* **40**, 105-115.
20. Denner, E.B., Mark, B., Busse, H.J., Turkiewicz, M., and Lubitz, W. (2001) *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *System Appl Microbiol* **24**, 44-53.
21. Euzéby, J.P. (2009) *List of Prokaryotic names with standing in nomenclature*. <http://www.bacterio.cict.fr/>.
22. Feller, G., Sonnet, P., and Gerday, C. (1995) The beta-lactamase secreted by the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A8. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4474-4476.
23. Finlay, B.B. and Falkow, S. (1989) Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev* **53**, 210-230.
24. Fosse, T., Giraud-Morin, C., and Madinier, I. (2003) Induced colistin resistance as an identifying marker for *Aeromonas* phenospecies groups. *Lett Appl Microbiol* **36**, 25-29.
25. Fraud, S., Rees, E.L., Mahenthalingam, E., Russell, A.D., and Maillard, J.Y. (2003) Aromatic alcohols and their effect on Gram-negative bacteria, cocci and mycobacteria. *J Antimicrob Chemother* **51**, 1435-1436.
26. Gales, A.C., Reis, A.O., and Jones, R.N. (2001) Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* **39**, 183-190.

27. García-López, I., Otero, A., García-López, M.L., and Santos, J.A. (2004) Molecular and phenotypic characterization of nonmotile Gram-negative bacteria associated with spoilage of freshwater fish. *J Appl Microbiol* **96**, 878-886.
28. García-López, M.L. and Prieto, M. (1999) Psychrobacter. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. Eds. Robinson, R.K., Batt, C.A., and Patel, P. pp. 1875-1882. London: Academic Press.
29. García-López, M.L., Prieto, M., and Otero, A. (1998) The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. In *The Microbiology of Meat and Poultry*. Eds. Davies, A. and Board, R. pp. 1-34. London: Blackie Academic and Professional.
30. Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn, T.G. (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. Release 5.0. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (<http://www.bergeys.org/outlines.html>).
31. Gawande, P.V. and Bhagwat, A.A. (2002) Inoculation onto solid surfaces protects *Salmonella* spp. during acid challenge: a model study using polyethersulfone membranes. *Appl Environ Microbiol* **68**, 86-92.
32. Gennari, M., Parini, M., Volpon, D., and Serio, M. (1992) Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformation of *Psychrobacter* and *Acinetobacter* from fresh and spoiled meat, milk and cheese. *Int J Food Microbiol* **15**, 61-75.
33. Gennari, M. and Tomaselli, S. (1988) Changes in aerobic microflora of skin and gills of Mediterranean sardines (*Sardina pilchardus*) during storage in ice. *Int J Food Microbiol* **6**, 341-347.
34. Gennari, M., Tomaselli, S., and Cotrona, V. (1999) The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored in ice. *Food Microbiol* **16**, 15-28.
35. Gini, G.A. (1990) Ocular infection caused by *Psychrobacter immobilis* acquired in the hospital. *J Clin Microbiol* **28**, 400-401.
36. Goguen, J.D., Hoe, N.P., and Subrahmanyam, Y.V. (1995) Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches. *Infect Agents Dis* **4**, 47-54.
37. González, C.J., Santos, J.A., García-López, M.L., and Otero, A. (2000) Psychrobacters and related bacteria in freshwater fish. *J Food Protect* **63**, 315-321.
38. González-Rodríguez, N., Santos, J.A., Otero, A., and García-López, M.L. (2007) Cell-associated hemolytic activity in environmental strains of *Plesiomonas shigelloides* expressing cell-free, iron-influenced extracellular hemolysin. *J Food Protect* **70**, 885-890.
39. Gray, P.A. and Stewart, D.J. (1980) Numerical taxonomy of some marine pseudomonads and alteromonads. *J Appl Bacteriol* **49**, 375-383.

40. Grimont, F. and Grimont, P.A.D. (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Res Microbiol* **137**, 165-175.
41. Guttigoli, A. and Zaman, M.M. (2000) Bacteremia and possible endocarditis caused by *Moraxella phenylpyruvica*. *South Med J* **93**, 708-709.
42. Harmsen, D., Rothganger, J., Frosch, M., and Albert, J. (2002) RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database. *Nucl Acids Res* **30**, 416-417.
43. Harrigan, W.F. (1998) *Laboratory Methods in Food Microbiology*. London: Academic Press.
44. Harshman, S. (1988) *Microbial Toxins: Tools in Enzymology*. San Diego: Academic Press.
45. Hedberg, M. (1969) Acetamide agar medium selective for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* **17**, 481-
46. Heuchert, A., Glockner, F.O., Amann, R., and Fischer, U. (2004) *Psychrobacter nivimaris* sp. nov., a heterotrophic bacterium attached to organic particles isolated from the South Atlantic (Antarctica). *System Appl Microbiol* **27**, 399-406.
47. Hill, W.E. (1996) The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit Rev Food Sci Nutr* **36**, 123-
48. Hudson, M.J., Hollis, D.G., Weaver, R.E., and Galvis, C.G. (1987) Relationship of CDC group EO-2 and *Psychrobacter immobilis*. *J Clin Microbiol* **25**, 1907-1910.
49. Hutson, R.A., Thompson, D.E., and Collins, M.D. (1993) Genetic interrelationships of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related clostridia as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* **108**, 103-110.
50. ICMSF (2005) *Microorganisms in foods. 6. Microbial ecology of food commodities*. New York: Kluwer Academic.
51. Janda, J.M. and Abbott, S.L. (2002) Bacterial identification for publication: when is enough enough?. *J Clin Microbiol* **40**, 1887-1891.
52. Jeon, Y.S., Chung, H., Park, S., Hur, I., Lee, J.H., and Chun, J. (2005) jPHYDIT: a JAVA-based integrated environment for molecular phylogeny of ribosomal RNA sequences. *Bioinformatics* **21**, 3171-3173.
53. Jung, S.Y., Lee, M.H., Oh, T.K., Park, Y.H., and Yoon, J.H. (2005) *Psychrobacter cibarius* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J System Evol Microbiol* **55**, 577-582.

- 
54. Juni, E. (1991) The genus *Psychrobacter*. In *The Prokaryotes, 2nd Edition*. Eds. Balow, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. pp. 3241-3246. New York: Springer-Verlag.
  55. Juni, E. (2005) Genus III. *Psychrobacter*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. Volume Two, part B*. Eds. Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Stanley, J.R. pp. 437-441. New York: Springer.
  56. Juni, E. and Heym, G.A. (1980) Transformation assay for identification of psychrotrophic achromobacters. *Appl Environ Microbiol* **40**, 1106-1114.
  57. Juni, E. and Heym, G.A. (1986) *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: Genospecies composed of gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *Int J System Bacteriol* **36**, 388-391.
  58. Kämpfer, P., Albrecht, A., Buczolits, S., and Busse, H.J. (2002) *Psychrobacter faecalis* sp. nov., a new species from a bioaerosol originating from pigeon faeces. *System Appl Microbiol* **25**, 31-36.
  59. Kirov, S.M., Ardestani, E.K., and Hayward, L.J. (1993) The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. *Int J Food Microbiol* **20**, 159-168.
  60. Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T., and Esaki, N. (2004) Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly--> Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim Biophys Acta* **1696**, 59-65.
  61. Lantz, M.S. (1997) Are bacterial proteases important virulence factors?. *J Periodontal Res* **32**, 126-132.
  62. Lantz, P.G., Tjerneld, F., Borch, E., Hahn-Hagerdal, B., and Radstrom, P. (1994) Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3416-3418.
  63. Lesmana, M., Subekti, D., Simanjuntak, C.H., Tjaniadi, P., Campbell, J.R., and Oyoyo, B.A. (2001) *Vibrio parahaemolyticus* associated with cholera-like diarrhea among patients in North Jakarta, Indonesia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **39**, 71-75.
  64. Lessel, E.F. (1971) Minutes of the International Committee on Nomenclature of Bacteria subcommittee on the taxonomy of *Moraxella* and allied bacteria. *Int J System Bacteriol* **21**, 213-214.
  65. Leung, W.K., Chow, V.C.Y., Chan, M.C.W., Ling, J.M.L., and Sung, J.J.Y. (2006) *Psychrobacter* bacteraemia in a cirrhotic patient after the consumption of raw geoduck clam. *J Infect* **52**, 169-171.
  66. Llanos, A., Santos, J.A., Otero, A., and García-López, M.L. (2002) Desarrollo de una técnica de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en

- productos cárnicos curados cocidos .*XIII Congreso de Microbiología de los Alimentos de la SEM Libro de Ponencias, Comunicaciones y Pósters*, 144.
67. Lloyd-Puryear, M., Wallace, D., Baldwin, T., and Hollis, D.G. (1991) Meningitis caused by *Psychrobacter immobilis* in an infant. *J Clin Microbiol* **29**, 2041-2042.
  68. Lowe, A.J., Hanotte, O., and Garino, L. (1996) Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collection: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter* **107**, 50-54.
  69. Lozano, F., Florez, C., Recio, F.J., Gamboa, F., Gomez-Mateas, J.M., and Martin, E. (1994) Fatal *Psychrobacter immobilis* infection in a patient with AIDS. *AIDS* **8**, 1189-1190.
  70. Madigan, M.T., Martinho, J.M., and Parker, J. (1997) *Brock Biología de los Microorganismos*. Madrid: Prentice-Hall Iberia.
  71. Maeda, H. (1996) Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol Immunol* **40**, 685-699.
  72. Malorny, B., Tassios, P.T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M., and Hoorfar, J. (2003) Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* **83**, 39-48.
  73. Maruyama, A., Honda, D., Yamamoto, H., Kitamura, K., and Higashihara, T. (2000) Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. *Int J System Evol Microbiol* **50**, 835-846.
  74. Mithieux, S.M. and Weiss, A.S. (2005) Elastin. In *Advances in Protein Chemistry Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers*. Ed. David, A.D.P. pp. 437-461. London: Academic Press.
  75. Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B., and Baird, R.M. (1995) *Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies*. Chichester, England: John Wiley & Sons.
  76. Mossel, D.A.A., Moreno, B., and Struijk, C.B. (2003) *Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
  77. Munthali, M., Ford-Lloyd, B.V., and Newbury, H.J. (1992) The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Methods Appl* **1**, 274-276.
  78. Musaad, S., Smith, N.D., English, A., Gascoyne-Binzi, D., Glaser, A., Phillips, R., and Young, N. (2007) P719 First reported case of human infection with *Psychrobacter submarinus*. *Int J Antimicrob Agents* **29**, 175.

79. Pacova, Z., Urbanova, E., and Durnova, E. (2001) *Psychrobacter immobilis* isolated from foods: characteristics and identification. *Veterinarni Medicina-UZPI (Czech Republic)* **46**, 95-100.
80. Patel, P.D. (1994) *Rapid analysis techniques in food microbiology*. London: Blackie Academic & Professional.
81. Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., and White, T.J. (1993) *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington, DC: ASM Press.
82. Power, E.G.M. (1996) RAPD typing in microbiology—a technical review. *J Hosp Infect* **34**, 247-265.
83. Prieto, M., García-Armesto, M.R., García-López, M.L., Otero, A., and Moreno, B. (1992) Numerical taxonomy of gram-negative, nonmotile, nonfermentative bacteria isolated during chilled storage of lamb carcasses. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2245-2249.
84. Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glockner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucl Acids Res* **35**, 7188-7196.
85. Rademaker, J.L.W. and Savelkoul, P. (2004) PCR amplification-based microbial typing. In *Molecular Microbiology. Diagnostic principles and practice*. Eds. Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y.W., Unger, E.R., Relman, D.A., and White, T.J. pp. 197-221. Washington, D.C.: ASM Press.
86. Revell, P.A. and Miller, V.L. (2001) *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 159-164.
87. Rodríguez-Calleja, J.M., García-López, I., García-López, M.L., Santos, J.A., and Otero, A. (2006) Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens. *J Food Protect* **69**, 1106-1112.
88. Rodríguez-Calleja, J.M., Patterson, M.F., García-López, I., Santos, J.A., Otero, A., and García-López, M.L. (2005) Incidence, radioresistance, and behavior of *Psychrobacter* spp. in rabbit meat. *J Food Protect* **68**, 538-543.
89. Romanenko, L.A., Lysenko, A.M., Rohde, M., Mikhailov, V.V., and Stackebrandt, E. (2004) *Psychrobacter maritimus* sp. nov. and *Psychrobacter arenosus* sp. nov., isolated from coastal sea ice and sediments of the Sea of Japan. *Int J System Evol Microbiol* **54**, 1741-1745.
90. Romanenko, L.A., Schumann, P., Rohde, M., Lysenko, A.M., Mikhailov, V.V., and Stackebrandt, E. (2002) *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. *Int J System Evol Microbiol* **52**, 1291-1297.
91. Roselló-Mora, R. and Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 39-67.

92. Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., and DeLey, J. (1991) Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J System Bacteriol* **41**, 310-
93. Roth, J.A. (1988) *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. Washington, D.C.: ASM Press.
94. Sachse, K. and Frey, J. (2003) *PCR Detection of Microbial Pathogens*. New Jersey: Humana Press.
95. Sakala, R.M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C., and Ogawa, M. (2002) Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *Int J Food Microbiol* **74**, 87-99.
96. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
97. Santos, J.A., González, C.J., López, T.M., Otero, A., and García-López, M.L. (1999) Hemolytic and elastolytic activities influenced by iron in *Plesiomonas shigelloides*. *J Food Protect* **62**, 1475-1477.
98. Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47-56.
99. Shaw, B.G. and Latty, J.B. (1988) A numerical taxonomic study of non-motile non-fermentative Gram-negative bacteria from foods. *J Appl Microbiol* **65**, 7-21.
100. Shaw, B.G. and Shewan, J.M. (1968) Psychrophilic spoilage bacteria of fish. *J Appl Bacteriol* **31**, 89-96.
101. Shivaji, S., Reddy, G.S.N., Raghavan, P.U.M., Sarita, N.B., and Delille, D. (2004) *Psychrobacter salsus* sp. nov. and *Psychrobacter adeliensis* sp. nov. Isolated from Fast Ice from Adelie Land, Antarctica. *System Appl Microbiol* **27**, 628-635.
102. Shivaji, S., Reddy, G.S.N., Suresh, K., Gupta, P., Chintalapati, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., and Matsumoto, G.I. (2005) *Psychrobacter vallis* sp. nov. and *Psychrobacter aquaticus* sp. nov., from Antarctica. *Int J System Evol Microbiol* **55**, 757-762.
103. Soutourina, O.A., Semenova, E.A., Parfenova, V.V., Danchin, A., and Bertin, P. (2001) Control of bacterial motility by environmental factors in polarly flagellated and peritrichous bacteria isolated from Lake Baikal. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3852-3859.
104. Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kämpfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., and Whitman, W.B. (2002) Report of the ad hoc

- committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J System Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
105. Stepanovic, S., Vukovic, D., Bedora-Faure, M., K'ouas, G., Djukic, S., Svabic-Vlahovic, M., and Carlier, J.P. (2007) Surgical wound infection associated with *Psychrobacter phenylpyruvicus*-like organism. *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**, 217-219.
  106. Stone, G.G., Oberst, R.D., Hays, M.P., McVey, S., and Chengappa, M.M. (1994) Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J Clin Microbiol* **32**, 1742-1749.
  107. Surgalla, M.J. and Beesley, E.D. (1969) Congo Red-Agar plating medium for detecting pigmentation in *Pasteurella pestis*. *Appl Microbiol* **18**, 834-837.
  108. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Bio Evol* **24**, 1596-1599.
  109. Tiwari, R.P., Deol, K., Rishi, P., and Grewal, J.S. (2002) Factors affecting haemolysin production and Congo red binding in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 98. *J Med Microbiol* **51**, 503-509.
  110. Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., Frantois, K., Devlieghere, F., and Debevere, J. (2004) Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **90**, 219-236.
  111. Vela, A.I., Collins, M.D., Latre, M.V., Mateos, A., Moreno, M.A., Hutson, R., Dominguez, L., and Fernandez-Garayzabal, J.F. (2003) *Psychrobacter pulmonis* sp. nov., isolated from the lungs of lambs. *Int J System Evol Microbiol* **53**, 415-419.
  112. Wang, R.F., Cao, W.W., and Cerniglia, C.E. (1997) A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J Appl Microbiol* **83**, 727-736.
  113. Welch, A.B. and Maxcy, R.B. (1975) Characterization of radiation-resistant vegetative bacteria in beef. *Appl Microbiol* **30**, 242-250.
  114. Welsh, J. and McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**, 7213-7218.
  115. Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.
  116. Yoon, J.H., Kang, K.H., and Park, Y.H. (2003) *Psychrobacter jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J System Evol Microbiol* **53**, 449-454.
  117. Yoon, J.H., Lee, C.H., Kang, S.J., and Oh, T.K. (2005a) *Psychrobacter celer* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *Int J System Evol Microbiol* **55**, 1885-1890.

118. Yoon, J.H., Lee, C.H., Yeo, S.H., and Oh, T.K. (2005b) *Psychrobacter aquimaris* sp. nov. and *Psychrobacter namhaensis* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *Int J System Evol Microbiol* **55**, 1007-1013.
119. Yoon, J.H., Yeo, S.H., Oh, T.K., and Park, Y.H. (2005c) *Psychrobacter alimentarius* sp. nov., isolated from squid jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J System Evol Microbiol* **55**, 171-176.
120. Yumoto, I., Hirota, K., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Yokota, Y., and Hoshino, T. (2003) *Psychrobacter okhotskensis* sp. nov., a lipase-producing facultative psychrophile isolated from the coast of the Okhotsk Sea. *Int J System Evol Microbiol* **53**, 1985-1989.
121. Zhang, J., Lin, S., and Zeng, R. (2007) Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep-sea psychrotrophic bacterium, *Psychrobacter* sp. 7195. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 604-610.