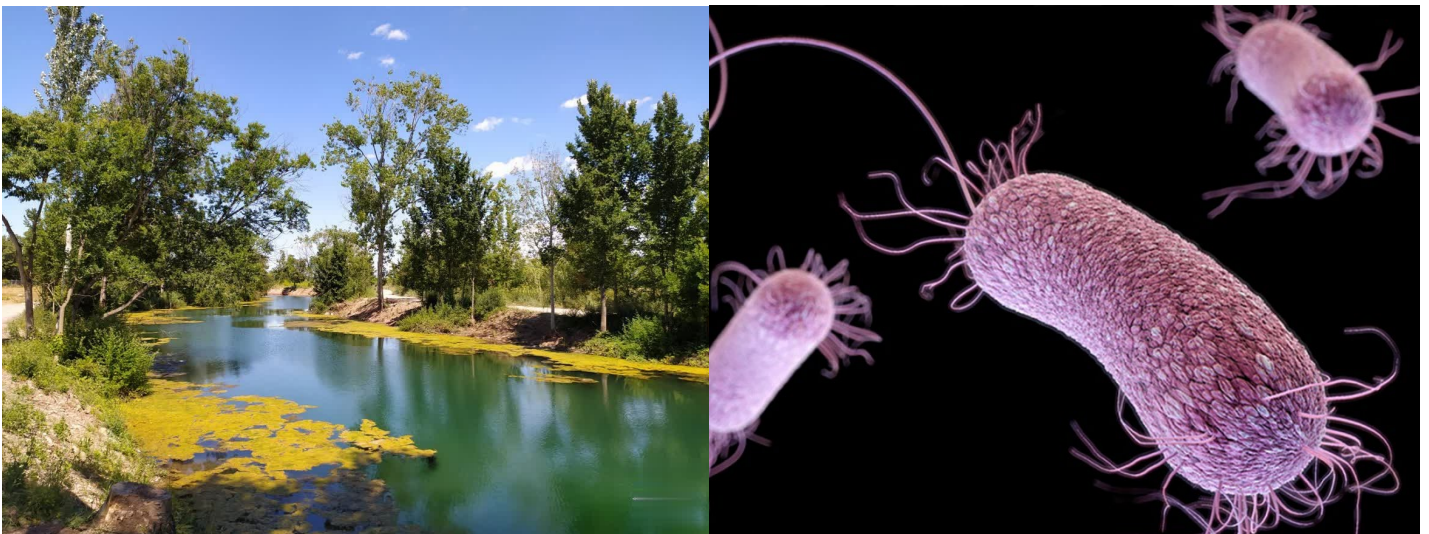


Presencia del género *Aeromonas* en el paraje natural “El Clot de la Mare de Déu” y estudio del posible riesgo biosanitario

Francisco Damián Maleno González

TRABAJO DE FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



Tutora académica: Cristina Reguant Miranda, Facultad de Enología,
cristina.reguant@urv.cat

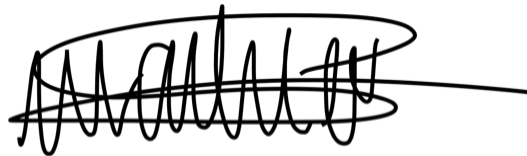
En cooperación con: Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV)

Supervisora: Dra. Ana Fernández Bravo, Facultad de Medicina y Ciencias de la
Salud, ana.fernandez@urv.cat

7 de junio de 2021

Yo, Francisco Damián Maleno González, con DNI 53247460E, soy conocedor de la guía de prevención de plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio de 2017) (<https://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 7 de junio de 2021

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke extending to the right.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todo el personal de la Unidad de Micología y Microbiología Ambiental del IISPV y en especial a la Dra. Ana Fernández Bravo por haberme brindado la oportunidad de poder realizar este trabajo con ella, hacer de esta una experiencia enriquecedora y haberme hecho descubrir el mundo de la investigación científica. Sin su dedicación, atención y esfuerzo, la realización de este trabajo hubiese sido imposible, por lo que le estoy enormemente agradecido.

A mi familia por haber estado y a los que ya no están.

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	DATOS DEL CENTRO.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
3.1	El género <i>Aeromonas</i> y su historia.....	3
3.2	Taxonomía y métodos de identificación.....	5
3.2.1	Identificación fenotípica.....	5
3.2.2	Identificación molecular.....	5
3.2.2.1	Identificación basada en el gen 16S rRNA.....	5
3.2.2.2	Identificación basada en genes de mantenimiento o housekeeping..	6
3.2.3	Métodos de genotipado.....	8
3.3	Ecología del género <i>Aeromonas</i>	8
3.4	Infecciones en humanos.....	11
3.5	Virulencia del género <i>Aeromonas</i>	12
3.6	Resistencia antimicrobiana de <i>Aeromonas</i>	13
4.	INTERÉS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1	Lugar de muestreo.....	16
5.2	Cuantificación de <i>Aeromonas</i>	16
5.2.1	Cuantificación por conteo de placas.....	17
5.2.2	Cuantificación por “Número más probable”.....	17
5.2.3	Cuantificación por qPCR.....	17
5.3	Cultivo, conservación y aislamiento.....	17
5.4	Extracción de DNA, identificación molecular y genotipado.....	18
5.4.1	Identificación a nivel de género en base al gen <i>gcat</i>	18
5.4.2	Identificación molecular a nivel de especie en base al gen <i>rpoD</i>	18
5.4.3	Genotipado de las cepas de <i>Aeromonas</i>	18
5.5	Perfil de susceptibilidad antimicrobiana.....	19
5.6	Detección de genes de virulencia.....	19
5.7	Estudios <i>in vitro</i>	19
5.7.1	Línea celular y condiciones de crecimiento.....	19
5.7.2	Infección de células.....	20
5.7.3	Ensayo de supervivencia intracelular.....	20
5.7.4	Ensayo de daño celular.....	20
5.8	Estadística.....	20

6.	RESULTADOS.....	21
6.1	Cuantificación de <i>Aeromonas</i>	21
6.2	Prevalencia de <i>Aeromonas</i> respecto a otros géneros bacterianos.....	21
6.3	Genotipado de las cepas de <i>Aeromonas</i> mediante ERIC-PCR.....	23
6.4	Estudio de filogenia en base al gen <i>rpoD</i>	24
6.5	Sensibilidad a los antibióticos.....	26
6.6	Identificación de factores de virulencia.....	27
6.7	Daño celular en macrófagos J774A.1.....	27
6.8	Supervivencia intracelular.....	28
7.	DISCUSIÓN.....	29
8.	CONCLUSIÓN.....	34
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	36
10.	AUTOEVALUACIÓN.....	41
11.	ANEXOS.....	42
11.1	Anexo 1: Tabla de cebadores.....	42
11.2	Anexo 2: Tabla de halos de inhibición.....	42

1. RESUMEN

El género *Aeromonas* está ampliamente distribuido en el medio acuático y es reconocido como un potencial patógeno para humanos. Las *Aeromonas* causan un amplio espectro de enfermedades, principalmente gastroenteritis, infecciones de heridas y bacteremia. En la actualidad, el agua es un recurso limitado, por lo que aguas de ríos, embalses o aguas regeneradas están siendo utilizadas para riego agrícola. Previos estudios han reportado el aislamiento de las mismas cepas de *Aeromonas* en aguas de regadío y en los vegetales regados con estas, así como en las zonas cercanas a estas fuentes de aguas, representando un problema de salud pública. Por otro lado, se han reportado casos de infección por bacterias de este género tras realizar actividades recreativas en ríos, llegando a causar infecciones graves como la fascitis necrotizante. Es por esto que existe un gran interés en el estudio de ambientes acuáticos en los que puede haber presencia de bacterias del género *Aeromonas* para poder dilucidar su impacto en la salud. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la presencia de *Aeromonas* en el paraje natural “El Clot de la Mare de Déu”, así como evaluar el posible riesgo biosanitario. Los resultados mostraron que el 100% de las muestras fueron positivas para la presencia de *Aeromonas* con diferentes métodos de detección y que existían cepas con el mismo genotipo (ERIC-PCR) entre muestras. El 35% de todos los aislados fueron identificados como *Aeromonas*, siendo *Aeromonas popoffi* la especie más prevalente. Por otro lado, se obtuvieron nuevas cepas de la especie *Aeromonas paramedia* que se encuentra en proceso de descripción y una posible nueva especie *Aeromonas burrianensis* sp. nov. Varias de las cepas estudiadas mostraron un alto nivel de daño celular y supervivencia intracelular en macrófagos, así como la presencia de diversos factores de virulencia con importancia en infecciones humanas. Además, estas cepas mostraron resistencia a un amplio número de antibióticos. Estos resultados demuestran que la presencia de este género bacteriano en aguas de río, así como en zonas cercanas puede causar un riesgo biosanitario de gran importancia.

Palabras clave: *Aeromonas*, epidemiología, taxonomía, ERIC-PCR, virulencia.

2. DATOS DEL CENTRO

Este estudio está basado en las prácticas curriculares realizadas en el grupo de investigación Micología y Microbiología Ambiental del Institut de Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) situado en la facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili en Reus. Esta fundación fue creada en 2004 en el marco de un convenio de colaboración científica interinstitucional en la provincia de Tarragona entre el Institut Català de la Salut (Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona y Hospital de Tortosa Verge de la Cinta), el Hospital Universitario Sant Joan de Reus, el Instituto Pere Mata y la Universidad Rovira i Virgili. La misión de este instituto es la de gestionar de manera eficiente los recursos propios y ajenos y dar el mejor servicio a los profesionales de la Salud, para que, mejore la salud de la población mediante la promoción, la consolidación y la translación de la investigación en el ámbito biomédico.

Las 4 principales áreas de investigación a las que se dedica el IISPV son: Nutrición y Metabolismo, Salud y Medio Ambiente, Neurociencias y Salud Mental, y Grupos Clínicos. Este estudio se llevó a cabo en el área de Salud y Medio Ambiente, más precisamente en el grupo de Investigación Micología y Microbiología Ambiental el cual posee 3 principales líneas de investigación: micología médica, biodiversidad fúngica y microbiología ambiental. Aunque la mayor parte de este grupo de investigación se dedica al estudio de los hongos, mi tutora la Dra. Ana Fernández-Bravo y el personal a su cargo se centran en el estudio del género bacteriano *Aeromonas*, género en el cual está especializada la anterior jefa de grupo y actual rectora de la universidad, María José Figueras.

Para la realización de este estudio se utilizaron todos los medios disponibles de los laboratorios de Microbiología, Biología Molecular y Cultivos Celulares del IISPV, pudiendo así conocer su instrumentación y funcionamiento.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 El género *Aeromonas* y su historia

El género *Aeromonas* pertenece a la clase *Gammaproteobacteria*, orden *Aeromonadales* y comparte la familia *Aeromonadaceae* con otros dos géneros: *Tolomonas* y *Oceanonimonas* (Martin-Carnaham y Joseph, 2015). Las *Aeromonas* se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos, oxidasa y catalasa positivos, capaces de degradar nitratos a nitritos, ser fermentadores de la glucosa y resistentes al factor vibriostático O/129. El género se compone actualmente de 32 especies descritas y 4 pendientes de descripción (Fernández-Bravo y Figueras, 2020), aisladas de un gran número de ambientes (Vega-Sánchez et al., 2014). Aunque son microorganismos autóctonos del medio acuático, también se aíslan con frecuencia en alimentos humanos, peces y otros procesos infecciosos en humanos, incluidas personas inmunosuprimidas e inmunocompetentes (Janda y Abbott, 2010). En humanos las principales enfermedades asociadas con estos microorganismos son la gastroenteritis, las infecciones de heridas y la bacteremia/septicemia (infección del torrente circulatorio por microorganismos). La gastroenteritis es producida generalmente por la ingesta de agua o alimentos contaminados por *Aeromonas*, mientras que las infecciones de heridas suelen ser el resultado de su exposición a aguas contaminadas (Janda, 1991).

En 1891 se reportaron los primeros aislamientos de *Aeromonas* por Sanarelli et al., identificándolos como *Bacillus hydrophylus fuscus*. Sin embargo, no fue hasta 1943 cuando el Comité Internacional de Bacteriología atribuyó la autoría del género a Stainer. El género *Aeromonas* perteneció a la familia *Vibrionaceae* desde 1965, junto a los géneros *Vibrio* y *Plesiomonas* (Martin-Carnaham y Joseph, 2015). Además en la década de 1970, el género se dividió en base a sus condiciones de crecimiento y a sus características bioquímicas en dos grupos: el grupo psicrófilo, compuesto de bacterias inmóviles de crecimiento óptimo entre 22 y 25 °C principalmente involucradas en enfermedades de peces e identificadas como *Aeromonas salmonicida*; y el grupo mesófilo, compuesto de aislados móviles con flagelo polar único, cuyo crecimiento óptimo se encuentra entre 35 y 37 °C, responsables de varios procesos infecciosos en humanos e identificadas como *Aeromonas hydrophila*. En 1986, Colwell et al., demostraron que las *Aeromonas* formaban una rama filogenética distinta, gracias al análisis de las secuencias de los genes 16S rRNA y 5S rRNA y a estudios de hibridación DNA-DNA, formando la familia *Aeromonadaceae*. Actualmente las 40 especies que componen el género son las siguientes: *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas aquatica*, *Aeromonas aqualitis*, *Aeromonas australiensis*, *Aeromonas bestiarum*,

Aeromonas bivalvium, Aeromonas caverniceola, Aeromonas caviae, Aeromonas crassostreae, Aeromonas dhakensis, Aeromonas diversa, Aeromonas encheleia, Aeromonas entérica, Aeromonas eucrenophila, Aeromonas finlandiensis, Aeromonas fluviales, A. hydrophila, Aeromonas intestinales, Aeromonas jandaei, Aeromonas media, Aeromonas molluscorum, Aeromonas lacus, Aeromonas lusitana, Aeromonas piscicola, Aeromonas popoffii, Aeromonas rivipollensis, Aeromonas rivuli, A. salmonicida, Aeromonas sanarellii, Aeromonas scubertii, Aeromonas simiae, Aeromonas sobria, Aeromonas taiwanensis, Aeromonas tecta, Aeromonas trota y Aeromonas veronii (Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

Tabla 1. Especies de Aeromonas (Obtenida de Fernández-Bravo, 2019).

Species	Type strain	Source	References
<i>A. hydrophila</i>	CECT 839 ^T	Milk	Stainer, 1943
<i>A. salmonicida</i>	CECT 894 ^T	Salmon	Griffin et al., 1953
<i>A. sobria</i>	CECT 4245 ^T	Fish	Popoff and Veron, 1981
<i>A. media</i>	CECT 4232 ^T	Fisheries water	Allen et al., 1983
<i>A. veronii</i>	CECT 4257 ^T	Sputum	Hickman-Brenner et al., 1987
<i>A. caviae</i>	CECT 838 ^T	Guinea pig	Schubert and Hegazi, 1988
<i>A. eucrenophila</i>	CECT 4224 ^T	Fresh water fish	Schubert and Hegazi, 1988
<i>A. schubertii</i>	CECT 4240 ^T	Skin abscess	Hickman-Brenner et al., 1988
<i>A. jandaei</i>	CECT 4228 ^T	Human feces	Carnahan et al., 1991
<i>A. trota</i>	CECT 4255 ^T	Human feces	Carnahan et al., 1991
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199 ^T	Eel	Martínez-Murcia et al., 1992
<i>A. encheleia</i>	CECT 4342 ^T	Eel	Esteve et al., 1995
<i>A. bestiarum</i>	CECT 4227 ^T	Sick fish	Ali et al., 1996
<i>A. popoffii</i>	CECT 5176 ^T	Drinking water	Huys et al., 1997
<i>A. simiae</i>	IBS 5-6874 ^T	Monkey feces	Harf-Monteil et al., 2004
<i>A. molluscorum</i>	CECT 5864 ^T	Shellfish	Miñana-Galbis et al., 2004
<i>A. bivalvium</i>	CECT 7113 ^T	Shellfish	Miñana-Galbis et al., 2007
<i>A. tecta</i>	CECT 7082 ^T	Children feces	Demarta et al., 2008
<i>A. piscicola</i>	CECT 7443 ^T	Sick fish	Beaz-Hidalgo et al., 2009
<i>A. fluvialis</i>	CECT 7401 ^T	River water	Alperi et al., 2010
<i>A. taiwanensis</i>	CECT 7403 ^T	Wound infection	Alperi et al., 2010
<i>A. sanarellii</i>	CECT 7402 ^T	Wound infection	Alperi et al., 2010
<i>A. diversa</i>	CECT 4254 ^T	Wound infection	Miñana-Galbis et al., 2010
<i>A. rivuli</i>	CECT 7518 ^T	River water	Figueras et al., 2011
<i>A. cavernicola</i>	CECT 7862 ^T	Cavern creek water	Martínez-Murcia et al., 2012
<i>A. australiensis</i>	CECT 8023 ^T	Irrigation water	Aravena-Román et al., 2013
<i>A. dhakensis</i>	CECT 5744 ^T	Children feces	Beaz-Hidalgo et al., 2013
<i>A. finlandensis</i>	CECT 8028 ^T	Cyanobacterial bloom	Beaz-Hidalgo et al., 2015
<i>A. aquatica</i>	CECT 8025 ^T	Cyanobacterial bloom	Beaz-Hidalgo et al., 2015
<i>A. lacus</i>	CECT 8024 ^T	Cyanobacterial bloom	Beaz-Hidalgo et al., 2015
<i>A. rivipollensis</i>	LMG 26323 ^T	River water	Martí and Balcazar, 2016
<i>A. lusitana</i>	CECT 7828 ^T	Untreated water	Martínez-Murcia et al., 2016
<i>A. intestinalis</i>	CECT 8980 ^T	Human feces	Figueras et al., 2017
<i>A. enterica</i>	CECT 8981 ^T	Human feces	Figueras et al., 2017
<i>A. crassostreae</i>	CECT 8982 ^T	Shellfish	Figueras et al., 2017
<i>A. aquarilis</i>	CECT 8026 ^T	Lake water	Figueras et al., 2017

3.2 Taxonomía y métodos de identificación

En 2002, Stackebrandt et al. sugirió como miembro del Comité Internacional de Sistemática Procariota, que la definición de nuevas especies procariotas debe incluir un estudio que incluya la diferenciación fenotípica y filogenética.

3.2.1 Identificación fenotípica

La identificación fenotípica se basa en características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas del género, incluyendo entre otras, la presencia de citocromo oxidasa normalmente positiva y la imposibilidad de crecimiento en caldo nutritivo en presencia del factor vibriostático O/129 (Janda y Abbott, 2010). Pese a esto, la identificación de especies del género *Aeromonas* basada en las diferencias fenotípicas, muestra limitaciones. En 2010 Beaz-Hidalgo et. al, reidentificaron mediante métodos moleculares, 119 cepas previamente identificadas mediante estudios fenotípicos. Los resultados demostraron que solo 35,5% de las cepas fueron identificadas correctamente a nivel de especie inicialmente, demostrando que los métodos fenotípicos proporcionan poca información para la identificación y diferenciación del género *Aeromonas* (Fernández-Bravo, 2019).

3.2.2 Identificación molecular

3.2.2.1 Identificación basada en el gen 16S rRNA

EL ARN ribosomal 16S es el componente de la subunidad menor (30S). El gen 16S rRNA se considera un marcador molecular estable para la para la identificación de especies bacterianas ya que su distribución es universal y debido a sus bajas tasas de evolución (Figueras et al., 2011; Martínez-Murcia et al., 2015). Sin embargo, la presencia de mutaciones o microheterogeneidades (mutaciones en posiciones específicas) descritas en el gen 16S rRNA de algunas especies y la excesiva similitud interespecie en el género *Aeromonas* (entre 96,7% y 100%), conllevó a que se produjeran algunas identificaciones erróneas (Alperi et al., 2008). Por ello, se considera que en el género *Aeromonas*, este gen es útil para la identificación a nivel de género, sin embargo, no se considera fiable para la identificación de especies del género (Alperi et al., 2008, Martínez-Murcia y Lamy, 2015).

3.2.2.2 Identificación basada en genes de mantenimiento o housekeeping

Los genes de mantenimiento o *housekeeping* (HKG) codifican proteínas con funciones esenciales para la supervivencia de la bacteria. Para que los genes de mantenimiento sean útiles para el análisis taxonómico, han de tener las siguientes características: (1) no han de estar influenciados por la transferencia horizontal de genes, (2) han de estar presentes en todas las bacterias, (3) han de ser genes únicos en el genoma de la bacteria, y (4) han de presentar como mínimo 2 regiones conservadas para el diseño de cebadores (Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

Los primeros HKG estudiados en el género *Aeromonas* fueron *gyrB* y *rpoD*, responsables de codificar la subunidad β de la ADN girasa (Latif-Eugenín, 2015) y codificar el factor sigma S70 (que confiere una iniciación de la transcripción específica de promotor a la ARN polimerasa) respectivamente. Ambos genes mostraron una filogenia similar al ser estudiados, por lo que fueron utilizados para reconocer y describir multitud de especies en los últimos años (Demarta et al., 2008; Martínez-Murcia et al., 2013; Figueras et al., 2017). Sin embargo, la secuenciación de un solo HKG puede no ofrecer suficiente resolución para mostrar las posiciones filogenéticas de especies estrechamente relacionadas y por ende no ser conclusiva, como mostró Latif-Eugenín en su tesis doctoral al reidentificar 422 aislados clínicos en base a la secuencia del gen *rpoD*, y solo obtener 41,6% de identificaciones correctas a nivel de especie.

Esta limitación puede resolverse al utilizar la concatenación de secuencias de varios HKG proporcionando una mayor resolución y diferenciación filogenética. Es por ello que los HKG fueron introducidos para la descripción de nuevas especies utilizando un MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) ya que su resolución es mayor que la del gen 16S rRNA (Stackebrandt et al., 2002). En 2011 Martínez-Murcia et al. describió el primer MLPA del género utilizando las secuencias concatenadas de 7 genes (*rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *atpD*, *recD*, *dnaJ*, y *dnaX*) (Figura 1).

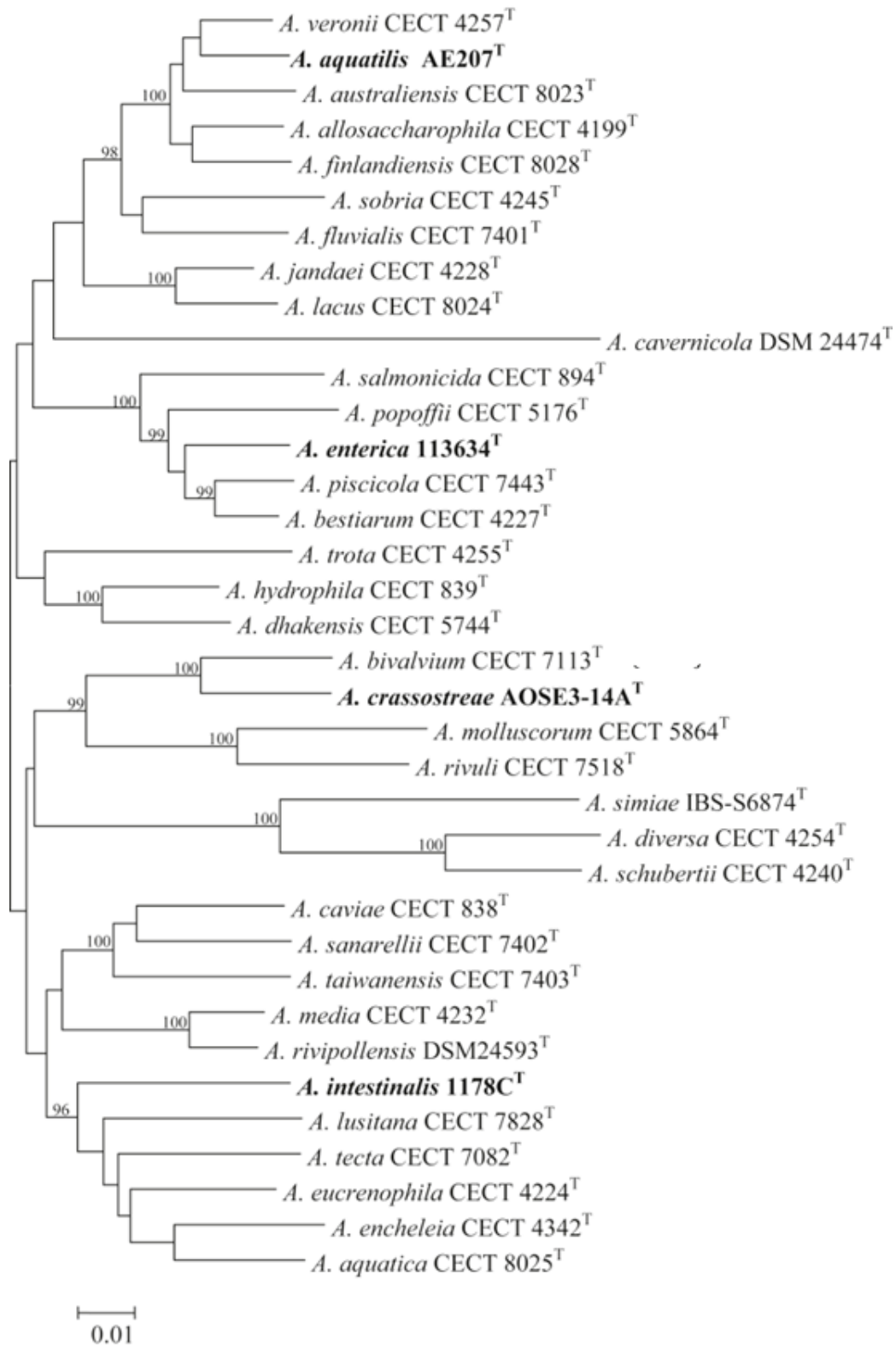


Figura 1. Árbol filogenético basado en la concatenación de las secuencias de los genes (*rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *recA*, *dnaJ* y *dnaX*) (3558 pb) (obtenida de Figueras et al., 2017)

3.2.3 Métodos de genotipado

Multitud de métodos moleculares han sido empleados para determinar si dos aislados de *Aeromonas* pertenecen o no a un mismo clon y, por ende, comparten una relación epidemiológica. Estos métodos son: (1) *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR), (2) *randomly amplified polymorphic DNA-PCR* (RAPD-PCR), (3) *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), (4) *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), y (5) *multilocus sequence typing* (MLST) (Fernández-Bravo, 2019; Martínez-Murcia y Lamy, 2015).

Las ERIC son secuencias palindrómicas imperfectas de 127 pares de bases que aparecen en varias copias en los genomas de bacterias entéricas y otros géneros bacterianos (Wilson y Sharp, 2016), permitiéndonos determinar relaciones entre cepas al mostrar el mismo patrón de genotipado. La ERIC-PCR es uno de los métodos más populares para el genotipado de *Aeromonas* gracias a su sencillez, reducido coste y alta reproducibilidad, por ello, ha sido utilizada en multitud de estudios epidemiológicos. De hecho, en 2016, Latif-Eugenín et al., utilizaron esta técnica de genotipado para determinar si existían clones de *Aeromonas* entre muestras de agua de regadío y los vegetales regados con estas, dilucidando así si podía existir una contaminación cruzada de *Aeromonas* spp., demostrando que existían clones de *A. caviae* y *A. sanarelli* en el agua y en las hortalizas.

3.3 Ecología del género *Aeromonas*

Las bacterias del género *Aeromonas*, autóctonas del medio acuático, se encuentran ampliamente distribuidas en numerosos ecosistemas y pueden ser aisladas de multitud de muestras clínicas y ambientales (Janda and Abbott, 2010). Estudios previos que han descrito las características del género justifican su amplia distribución (Borrell et al., 1998; Figueras y Ashbolt, 2019), destacando entre otras cosas el amplio espectro de temperaturas en las que estas bacterias pueden crecer (desde 4° C hasta 45° C). Las fuentes ambientales de *Aeromonas* que pueden llegar a causar infecciones en humanos son numerosas como se muestra en la Figura 2.

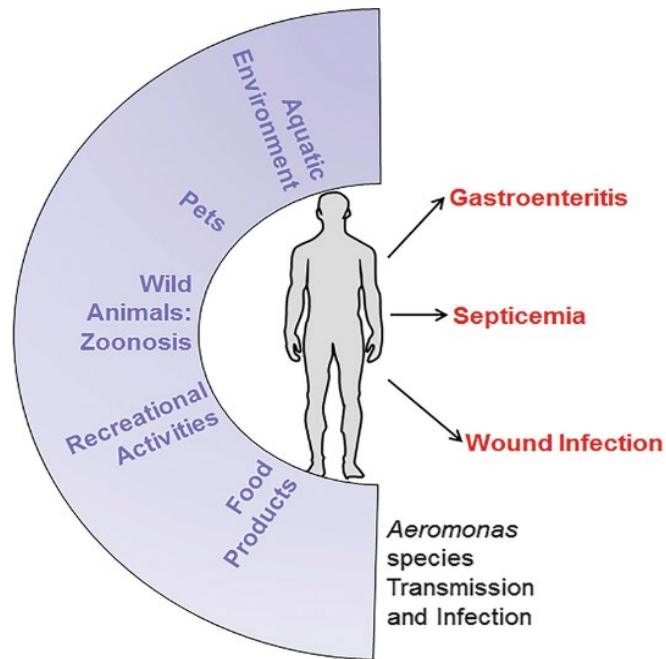


Figura 2. Fuentes de contaminación asociadas con la infección en humanos (obtenida de A.K. Bhunia, 2018)

Este género propio del medio acuático ha sido encontrado en multitud de muestras de agua provenientes de diferentes tipos tales como: aguas de superficie, subterráneas, potables, embotelladas, fluviales, de mar, de irrigación y residuales (Latif-Eugenín, 2015).

Previos estudios muestran que las aguas de superficie albergan una importante concentración de *Aeromonas*, así como una mayor diversidad que otros tipos aguas. De hecho, en 1998, Borrell et al. detectaron la presencia de *Aeromonas* en el 88% y 96% de las muestras analizadas de ríos y lagos catalanes, respectivamente. Además, varias especies descritas en los últimos años han sido aisladas de este tipo de aguas (*A. aquatica*, *A. finlandensis*, *A. lacus* y *A. rivipollensis*) (Beaz-Hidalgo et al., 2015). En cambio, en aguas subterráneas, la prevalencia de este género es generalmente inferior, y la presencia de estas bacterias suele estar relacionada con la contaminación por heces (Figueras y Ashbolt, 2019). Existen numerosos estudios en los cuales se detectó la presencia de *Aeromonas* en sistemas de agua potable e incluso en aguas embotelladas, esta presencia se debe a su habilidad para volver a crecer en dichos sistemas (Holmes et al., 1996; Figueras y Ashbolt, 2019). La concentración de *Aeromonas* en aguas potables puede variar en función de los nutrientes, la temperatura y la concentración de cloro residual (Sisti et al., 1998), aunque se ha observado que la concentración varía en función de la estación, obteniendo mayores concentraciones de *Aeromonas* durante los meses más fríos (Fernández-Bravo, 2019). El género *Aeromonas* también ha sido aislado de agua de mar (Borrell et al., 1998), aunque la concentración está asociada a

la contribución de las aguas de superficie o residuales que se vierten en el mar (Araujo et al., 1990). Estudios metagenómicos de aguas residuales revelaron que las *Aeromonas* son unas de las bacterias predominantes debido a su capacidad de volver a crecer en los sistemas de alcantarillado (McLellan et al., 2010). Debido al aumento de la población, la alteración de los patrones de precipitaciones y la contaminación de las reservas de agua naturales, el agua cada día es un recurso más limitado, lo que ha hecho que se desarrollen técnicas de tratamiento de aguas residuales para poder darles una segunda vida. La incidencia de este género en aguas residuales es alta, ya que los tratamientos convencionales para el tratamiento de aguas residuales como los tratamientos primarios, secundarios y biológicos no reducen efectivamente la concentración de *Aeromonas* (Figueras y Ashbolt, 2019). Sin embargo, los tratamientos terciarios adicionales como los procesos químicos (ozono, cloración) y físicos (radiación ultravioleta) pueden eliminar estos microorganismos completamente (Latif-Eugenín et al., 2016). Existen evidencias epidemiológicas de que el agua actúa como un vehículo de diseminación para estas bacterias. Dependiendo de la calidad microbiológica de las aguas recuperadas, estas pueden usarse para la irrigación, por ello existe la posibilidad de que las *Aeromonas* acaben contaminando frutas y vegetales (Latif-Eugenín et al., 2016).

Las *Aeromonas* se han aislado de una amplia variedad de alimentos, incluidos productos lácteos, carnes, pescados y mariscos (Abbott et al., 2003; Janda and Abbott, 2010). En el caso de los pescados, la especie más aislada es *A. salmonicida*. Sin embargo, estudios previos mostraron que en embutidos las especies más prevalentes son *A. hydrophila* y *A. caviae*. Además, se encontró el mismo aislado en el suelo de un matadero y en la carne de cerdo, sugiriendo que existía un rol directo de las heces en la contaminación de la carne (Fontes et al., 2011). Por otro lado, otros trabajos han demostrado que las frutas junto con el agua contaminada son las mayores fuentes de infección con *Aeromonas* en procesos diarreicos (Latif-Eugenín, 2015; Fernández-Bravo, 2019). La presencia de esta bacteria en alimentos, entre otras cosas, es debido a que es capaz de sobrevivir a condiciones usadas para preservar alimentos, incluso llegando a multiplicarse.

Finalmente, el género *Aeromonas* es considerado como un patógeno de animales desde su primer aislamiento en septicemias de ranas y peces enfermos. Las especies patógenas de peces más importantes son *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, que afectan en mayor medida a salmónidos causándoles úlceras, hemorragias, forunculosis, y septicemia (Beaz-Hidalgo et al., 2010), provocando importantes pérdidas económicas en la industria acuícola (Janda y Abbott, 2010).

3.4 Infecciones en humanos

Podemos considerar las *Aeromonas* como patógenos oportunistas emergentes responsables de un amplio rango de enfermedades humanas como la gastroenteritis, la septicemia e infecciones de heridas, y estas son capaces de infectar tanto pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes (Fernández-Bravo, 2019). La incidencia de estos microorganismos en infecciones humanas es desconocida, pero los estudios llevados a cabo muestran que la incidencia de enfermedades causadas por *Aeromonas* varía geográficamente y puede relacionarse con los malos hábitos de higiene en las regiones subdesarrolladas (Figueras et al., 2005). Los estudios sobre *Aeromonas* que han sido aisladas como agentes etiológicos en procesos infecciosos en humanos hasta la fecha, mostraron que cuatro especies únicas representan el 95,4% (1766 de 1852 cepas identificadas) de los casos, siendo las siguientes: *A. caviae* (37,26%), *A. veronii* (23,49%), *A. dhakensis* (21,54%), y *A. hydrophila* (13,07%) (Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

Por otro lado, se ha observado que en las infecciones por *Aeromonas* en humanos, suelen estar implicadas más de un tipo de bacteria en una misma muestra clínica, lo que puede ser definido como una infección polimicrobiana o mixta, y en estos casos la bacteria dominante depende del tipo de infección. Estas infecciones pueden ocurrir en cualquier superficie mucosa o de piel, aunque las extremidades son las más afectadas. La mayoría de los casos afectan a personas sanas y están mayoritariamente asociados con eventos traumáticos y quemaduras relacionados con aguas y tierras contaminadas (Figueras et al., 2005). En el caso de infecciones de heridas, las infecciones polimicrobianas representan un 60% de los casos y la combinación que prevalece es la de *Aeromonas* con *Staphylococcus aureus* (Janda y Abbott, 2010). Las infecciones de heridas debidas a *Aeromonas* pueden progresar hasta provocar fascitis necrotizante (FN) en pacientes inmunocomprometidos. La FN es comúnmente conocida como una enfermedad carnívora que puede causar hipotensión, fiebre, necrosis y gangrena, pudiendo llegar a ser una infección mortal (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015; Spadaro et al., 2014). *A. hydrophila* es la especie de *Aeromonas* asociada a la FN más frecuente, y en algunos casos el agua fue considerada como el foco de infección (Grim et al., 2014). Múltiples cepas de *A. hydrophila* fueron aisladas de una joven paciente inmunocompetente que desarrolló FN, resultando en la amputación de casi todas sus extremidades (Ponnusamy et al., 2016; Fernández-Bravo et al., 2019). El caso evolucionó a partir de la exposición de una herida abierta al agua de un río en el que cayó la joven. En un principio se consideró como una infección por una única bacteria, aunque finalmente fueron aisladas 2 cepas de *A. hydrophila*.

3.5 Virulencia del género *Aeromonas*

Las infecciones de *Aeromonas* presentan una gran variedad de manifestaciones clínicas y son consideradas multifactoriales. Varios factores de virulencia permiten a las *Aeromonas* evadir la respuesta inmune del huésped y causar infecciones (Tomás, 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). La virulencia del género está relacionada con la expresión de genes que codifican para diferentes componentes estructurales, proteínas extracelulares, sistemas de secreción y proteínas asociadas a metales (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

Adherirse a los tejidos y a las células del huésped es un paso crucial en la infección de la mayoría de los microorganismos, es por ello por lo que con la adhesión de la bacteria comienza la colonización, alterando los mecanismos de defensa del huésped (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Los componentes estructurales implicados en la adhesión y colonización de las bacterias son: el pili, el flagelo, la cápsula, los lipopolisacáridos (LPS) y la capa S. Una de las estructuras características del género *Aeromonas* son el flagelo polar y lateral, lo que le facilita la colonización al conferir a la bacteria una rápida movilidad pudiéndose desplazar en superficies sólidas y formar biofilms (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

La interacción entre la bacteria patogénica y las células huésped se produce como dictan sus componentes extracelulares y gracias a las toxinas que son secretadas al espacio extracelular como las proteasas, lipasas, enterotoxinas, hemolisinas y toxinas tipo Shiga entre otras (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Enterotoxinas citotónicas y citotóxicas han sido descritas en *Aeromonas*, existen dos grupos de citotónicas: termolábiles (Alt) que no reaccionan con la antitoxina del cólera, y termoestables (Ast) que si reaccionan con la antitoxina de cólera (Chopra y Houston, 1999). La función de la toxina Shiga es la inactivación de los ribosomas (arresto de la síntesis de proteínas) de las células vasculares endoteliales, conduciendo a la muerte celular. También pueden estar codificadas en bacteriófagos que durante el ciclo lítico son capaces de infectar otras bacterias actuando como vectores de transmisión horizontal de los genes *stx* (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). Hasta este momento, solamente se ha detectado la toxina Shiga en cepas de *Aeromonas* aisladas de alimentos (Palma-Martínez et al., 2016).

En la actualidad, seis sistemas de secreción han sido descritos en bacterias Gram-negativas, todos involucrados en el transporte de factores de virulencia al medio extracelular o directamente a la célula huésped y especializados en el transporte de diferentes tipos de biomoléculas, estos son importantes en bacterias Gram-negativas

debido a la estructura didérmica dada por su envoltura celular. El sistema de secreción tipo 3 (T3SS) o inyectosoma es uno de los sistemas de secreción por los cuales proteínas pueden ser inyectadas directamente desde el protoplasma bacteriano al citoplasma de la célula huésped o al espacio extracelular (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). Estudios de infección llevados a cabo en cepas de *A. salmonicida* y *A. hydrophila* con mutaciones en el T3SS mostraron una menor virulencia que en cepas no mutadas (Yu et al., 2004).

Es gracias a la combinación de diferentes factores de virulencia que microorganismos como las *Aeromonas* pueden llevar a cabo una infección. Es la suma de estos factores lo que les permite adherirse (v. g. el flagelo), invadir (v. g. T3SS) y destruir (v. g. toxinas) el organismo huésped, superando su respuesta inmune y acarreado una infección que genera enfermedad (Janda y Abbott, 2010).

3.6 Resistencia antimicrobiana de *Aeromonas*

La resistencia a antibióticos es una respuesta genético-evolucionaria mediada por la presencia de genes que se encuentran en el genoma de la bacteria, integrones o plásmidos (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). El papel de los agentes antimicrobianos es el de matar o imposibilitar la reproducción de las bacterias. Los antibióticos al inhibir, por ejemplo, la síntesis de la pared celular, la síntesis de péptidos o el despliegue del ADN, imposibilitan el desarrollo de actividades celulares esenciales para la supervivencia de los patógenos, quienes ven reducida su capacidad de crecimiento y reproducción.

Recientemente, los estudios sobre los perfiles antimicrobianos en *Aeromonas* han aumentado debido al preocupante incremento en la resistencia de las bacterias a estos agentes, haciendo una necesidad hacer un uso responsable de los antibióticos. Literatura previa mostró que estas bacterias son resistentes a antibióticos como algunas penicilinas y a cefalosporinas de primera generación, aunque siguen siendo sensibles a monobactámicos, carbapenémicos, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Janda y Abbott, 2010; Ndi y Barton, 2011; Aravena-Román et al., 2012; Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Esta resistencia reside en la capacidad de las bacterias para defenderse de estos agentes, y es mediante mecanismos de destrucción y excreción de fármacos, así como estrategias de sustitución de dianas a los que están dirigidos, que las bacterias consiguen eludir el efecto de los antibióticos (Walsh y Wright, 2005). En 2009, Sanchez-Cespedes et al. reportaron el caso de un paciente afectado de colangitis por una infección de *A. veronii*

resistente al tratamiento con imipenem (antibiótico carbapenémico), probablemente resultado de un tratamiento previo fallido con dicho antibiótico.

En 2011, Ndi y Barton reportaron un aumento en la resistencia a antibióticos betalactámicos (penicilinas y derivados, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos) gracias a la presencia de genes que codifican para la producción de beta-lactamasas, de las cuales se han descrito 3 en *Aeromonas*: clase B metalo- β -lactamasas, clase C cefalosporinasa y clase D penicilasa (Dias et al., 2014). En un estudio realizado por Pitowska et al. en 2017, se observó que los diferentes genes que codifican para las beta-lactamasas presentes en las especies de *Aeromonas* aisladas de aguas residuales, se encuentran mayoritariamente en plásmidos. Esto sugirió que la resistencia a antibióticos en cepas de *Aeromonas* podría diseminarse desde aguas residuales a otros medios, aumentando así el posible riesgo biosanitario que supone la resistencia a antibióticos.

4. INTERÉS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las *Aeromonas* son consideradas como patógenos emergentes autóctonos del medio acuático y que podemos encontrar en una gran variedad de ambientes. Hoy en día el agua es un recurso limitado, por lo que actualmente diferentes tipos de agua tales como aguas regeneradas o aguas de río están siendo utilizadas para regar. Literatura previa mostró la presencia de las mismas cepas de *Aeromonas* en aguas de regadío y en los vegetales irrigados con estas, así como en zonas cercanas a las fuentes de agua, lo que puede representar un riesgo para la salud humana (Latif-Eugenín et al., 2016). Por otro lado, también se han reportado casos de infección grave por *Aeromonas* tras realizar actividades recreativas en aguas de río. Ponnusamy et al., 2016 describió un caso de fascitis necrotizante, debida a una infección por *Aeromonas*, en una joven estadounidense inmunocompetente, la cual tras caer al agua realizando tirolesa tuvo que ser hospitalizada y se le amputaron gran parte de sus extremidades.

Diferentes especies de este género son reconocidas como patógenos oportunistas para los humanos pudiendo afectar tanto a individuos inmunocomprometidos como inmunocompetentes, siendo la gastroenteritis seguida de la infección de heridas y la bacteremia las patologías más frecuentes. Al desconocerse la mayoría de los mecanismos de interacción de estos patógenos con el huésped y su sistema inmune, así como las vías de transmisión en el ambiente, existe una necesidad de seguir estudiando el género.

La **hipótesis** que ha motivado la realización de los estudios que se presentan en este trabajo es que las bacterias del género *Aeromonas* presentes en ambientes acuáticos pueden causar un importante problema para la salud humana.

El **objetivo principal** de este trabajo es el estudio de la presencia de *Aeromonas* en las muestras obtenidas del paraje natural “El Clot de la Mare de Déu” (Castellón) y la caracterización patogénica para poder determinar si existe un posible riesgo biosanitario. Para resolver este objetivo, se han planteado los siguientes **objetivos secundarios**:

1. Cuantificar la presencia de *Aeromonas* en diferentes muestras del “Clot de la Mare de Déu” (agua, tierra, material vegetal) mediante diferentes técnicas.
2. Genotipar las cepas de *Aeromonas* para determinar la presencia de clones.
3. Identificar las especies de *Aeromonas* presentes en el paraje natural “El Clot de la Mare de Déu”.
4. Determinar el posible riesgo biosanitario que representa la presencia de *Aeromonas* en las muestras.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de muestreo

Todas las muestras se recogieron del paraje natural “El Clot de la Mare de Déu”, en Burriana. El Clot de la Mare de Déu es un Paraje Natural Municipal con una superficie de 17,84 ha que se localiza en el término municipal de Burriana, en la provincia de Castellón (España). Se trata de un cauce que se adscribe al complejo fluvial del río Mijares y que se abastece de agua por la presencia de un manantial de cierta importancia que presenta una vegetación de macrófitos bien conservada, con restos de vegetación típica de bosque de ribera, que es aprovechada por la avifauna acuática como zona de descanso.



Figura 3. Fotografías del paraje natural “El Clot de la Mare de Déu” (Burriana, España).

La muestra de agua fue colectada en una botella de polipropileno de 2 litros, mientras que las muestras de tierra y material vegetal fueron colectadas en bolsas de polietileno, todas estas fueron transportadas en frío al laboratorio donde fueron procesadas el mismo día del muestreo.

5.2 Cuantificación de *Aeromonas*

En primer lugar, la muestra de agua fue concentrada mediante la filtración de 100 mL y de 200 mL de muestra, utilizando el equipo proporcionado por el laboratorio de Micología y Microbiología Ambiental (URV). Posteriormente se prepararon 3 bancos de diluciones seriadas (directa, filtrado 100 mL y filtrado 200 mL). Paralelamente, las muestras de tierra y material vegetal fueron mezcladas con agua destilada y vorteadas intensamente para seguidamente realizar diluciones seriadas. Todas las diluciones seriadas fueron sembradas en medio de cultivo agar dextrina ampicilina (ADA), selectivo para el género *Aeromonas*.

5.2.1 Cuantificación por conteo de placas

Todas las diluciones seriadas fueron sembradas (100 µl) en medio de cultivo agar dextrina ampicilina (ADA, HiMedia, India), selectivo para el género *Aeromonas* e incubadas a 37° C durante 24 horas. Tras la incubación se contaron todas las unidades formadoras de colonias (UFC). Para llevar a cabo el conteo de forma correcta, se observó la morfología de las colonias, debido a que otros géneros son capaces de crecer en el medio selectivo ADA.

5.2.2 Cuantificación por “Número más probable”

De todas las muestras directas, 500 µl de las diluciones seriadas fueron inoculados en tubos con 2,5 mL de APA-A (Buffered Peptone Water + Ampicilina), 3 veces para cada muestra. Tras 24 horas a 37° C, el número de positivos (tubos que presentaban turbidez amarilla/naranja) fue contado y se obtuvo el número más probable con la herramienta informática “Most Probable Number Calculator” (<https://mostprobablenumbercalculator.epa.gov/mpnForm>).

5.2.3 Cuantificación por qPCR

Para todas las muestras (tierra, material vegetal y agua) se extrajo ADN mediante el kit Easy-DNA™ (Invitrogen CA, E.E.U.U). Se realizó la PCR cuantitativa en tiempo real con el DNA purificado con el kit DNA TargetSpecies dtec-qPCR para especies de *Aeromonas* (Genetic PCR solutions, Orihuela, España), y el sistema SteponePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems). El número de copias fue calculado en base a la recta patrón y el correspondiente umbral de ciclo de amplificación (Ct).

5.3 Cultivo, conservación y aislamiento

Durante el presente estudio se trabajó con diversos medios de cultivo para la identificación, conservación, recuperación y crecimientos de las cepas. Para la conservación de las cepas aisladas se mantuvieron en “Trypic Soy Broth” (TSB, Difco, Francia) más glicerol al 15% a -80° C. Para los diferentes experimentos, las bacterias fueron rutinariamente crecidas en “Tryptone Soya Agar” (TSA, Difco, Francia) y ADA, a 30° C durante 24 horas.

5.4 Extracción de DNA, identificación molecular y genotipado

El ADN genómico de las cepas bacterianas se extrajo de cultivos puros crecidos en TSA mediante la matriz de purificación ADN InstaGene™ (Bio-Rad Hercules, CA, E.E.U.U) y siguiendo las instrucciones del fabricante (Fernández-Bravo, 2019).

5.4.1 Identificación a nivel de género en base al gen *gcat*

Cada aislado fue identificado como perteneciente al género *Aeromonas* mediante la detección del gen *gcat*, que codifica un glicerofosfolípido colesterol acil transferasa específico de este género, utilizando los cebadores y condiciones descritas por Soler et al., en 2004 (Tabla cebadores). Los productos de PCR, fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los geles fueron teñidos usando RedSafe™ nucleic acid staining solution (iNtRON biotechnology) y visualizados empleando un transiluminador (Molecular Imager® Gel Doc™ XRT with Image Lab™ Software, Biorad). Los marcadores de peso molecular utilizados como referencia en este trabajo fueron 100bp DNA Ladder y 1Kb DNA Ladder (Invitrogen, E.E.U.U).

5.4.2 Identificación molecular a nivel de especie en base al gen *rpoD*

Todas las cepas identificadas como pertenecientes al género *Aeromonas* fueron identificadas a nivel de especie mediante la secuenciación del gen *rpoD*, utilizando los cebadores indicados en la tabla del Anexo 1 y las condiciones descritas por Soler et al. (2004). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con respecto a las especies de *Aeromonas* descritas hasta la fecha utilizando el algoritmo ClustalW (Larkin et al., 2007) en MEGA v6.0 (Tamura et al., 2013). El análisis filogenético se realizó con el algoritmo Neighbor-joining (NJ) con MEGA v6.0.

5.4.3 Genotipado de las cepas de *Aeromonas*

Todos los aislados identificados como pertenecientes al género *Aeromonas* fueron genotipados mediante la técnica de ERIC-PCR, empleando los cebadores ERIC 1R y ERIC 2 (Tabla de cebadores) descritos por Versalovic et al. (1991) y de acuerdo a las condiciones descritas por Houf et al. (2002). Los amplicones de diferentes tamaños generados durante la amplificación del ADN genómico fueron separados usando geles de agarosa al 2%, y tanto la tinción del gel como la visualización de las bandas se realizó de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Los patrones con al menos una banda de diferencia fueron considerados como genotipos diferentes.

5.5 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana

Para los siguientes experimentos se seleccionaron 6 cepas (A6, A7, T8, T10, MV11 y MV18) para realizar estudios más específicos. La resistencia a antibióticos fue estudiada mediante la prueba de difusión de discos, y los resultados fueron analizados en acuerdo a las pautas establecidas por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Los discos BD BBL™ Sensi-Disc™ antimicrobial susceptibility test discs (BD, Madrid, España), fueron utilizados conteniendo los siguientes antibióticos: ampicilina, estreptomicina, cefalotina, cefuroxima, fosfomicina, ceftriaxona, vancomicina, colistina, tetraciclina, clindamicina, piperacilina y amoxicilina con clavulánico.

5.6 Detección de genes de virulencia

Cinco genes de virulencia fueron seleccionados para estudiar la presencia/ausencia en las cepas 6 cepas seleccionadas (Tabla 2). Este estudio se realizó mediante PCR utilizando los cebadores y condiciones previamente descritas por diferentes estudios (Anexo 1).

Tabla 2. Genes de virulencia del género *Aeromonas* analizados en el estudio 5.6.

Gen	Referencia
<i>lafA</i>	Merino et., 2003
<i>alt</i>	Chopra et., 1996
<i>ast</i>	Aguilera-Arreola et al., 2005
<i>Stx1</i>	Wang et al., 2002
<i>ascF-G</i>	Chacón et al., 2003

5.7 Estudios *in vitro*

5.7.1 Línea celular y condiciones de crecimiento

Para los estudios *in vitro* se seleccionó la línea celular J744A.1 (monocito/macrófago de ratón BALB/c) (Rama et al., 2011). Estas se mantuvieron como células adheridas en medio “Dubelcco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM, PAA Laboratories) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, PAA Laboratories)

y 1% de solución de penicilina-estreptomicina (P/S, PAA Laboratories) a 37° C y 5% de CO₂.

5.7.2 Infección de células

Previo a la infección, las células fueron sembradas en placas de cultivo de tejidos (1×10^6 células/mL) que contenían medio DMEM libre de suero y antibióticos (condiciones de inanición sérica) durante 18 h, como describieron Murciano et al. (2015). Las células fueron infectadas con 6 cepas de *Aeromonas* cultivadas “overnight” a una multiplicidad de infección (MOI) de 10, determinada mediante diluciones en serie y espectrofotometría (longitud de onda 450 nm) como describe Fernández-Bravo en 2019.

5.7.3 Ensayo de supervivencia intracelular

Tras una hora de infección, se llevó a cabo un tratamiento con gentamicina (50 µg/ml) durante 45 min (punto temporal 0 h) para matar las bacterias extracelulares. Tras esta incubación se cambió el medio por medio sin gentamicina y se incubó durante 3 h. Para determinar el número de bacterias se llevó a cabo una dilución seriada seguida de un cultivo en placas de TSA. El porcentaje de supervivencia intracelular se calculó con el número de unidades formadoras de colonias a tiempo 0 h en relación con la dosis inicial de infección (Fernández-Bravo, 2019).

5.7.4 Ensayo de daño celular

Tras una hora de infección, se llevó a cabo un tratamiento con gentamicina (50 µg/ml) durante 45 minutos (punto temporal 0 h) para matar las bacterias extracelulares. Tras esta incubación se cambió el medio por medio sin gentamicina y se incubó durante 3 h. Para determinar el daño celular, se cuantificó la cantidad de enzima lactato deshidrogenasa en el supernadante, mediante el kit comercial Cytox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega, Wisconsin, E.E.U.U), siguiendo el protocolo especificado por el fabricante y cuantificando mediante la recta patrón proporcionada por el mismo.

5.8 Estadística

Los experimentos realizados en este trabajo se han realizado por duplicado y las diferencias significativas se han determinado con el uso del modelo *t*-test en GraphPad Prism 6.0 (Graphpad Software, CA, E.E.U.U) **p* < 0,05.

6. RESULTADOS

6.1 Cuantificación de *Aeromonas*

Los resultados de la cuantificación mostraron presencia de *Aeromonas* en todas las muestras obtenidas del “Clot de la Mare de Déu” como se muestra en la Figura 4. Aunque las muestras de tierra mostraron un mayor número de *Aeromonas* respecto a las otras muestras, no se observaron diferencias significativas entre todas las muestras (Figura 4). La técnica que cuantificó una mayor cantidad de *Aeromonas*, independientemente del tipo de muestra, fue la qPCR con una media de $9,15 \times 10^7$ ufc/100 ml, seguida del conteo de colonias en placa con $7,11 \times 10^5$ ufc/100 ml y la técnica que cuantificó un menor número de *Aeromonas* fue el NMP con una media de $2,2 \times 10^4$ ufc/100 ml. En el caso de las muestras de agua y tierra se mostró una diferencia significativa entre la qPCR respecto al método de conteo y el NMP ($p < 0,05$). Sin embargo, en las muestras de material vegetal solo se observaron diferencias significativas entre el NMP y la qPCR ($p < 0,05$) (Figura 4).

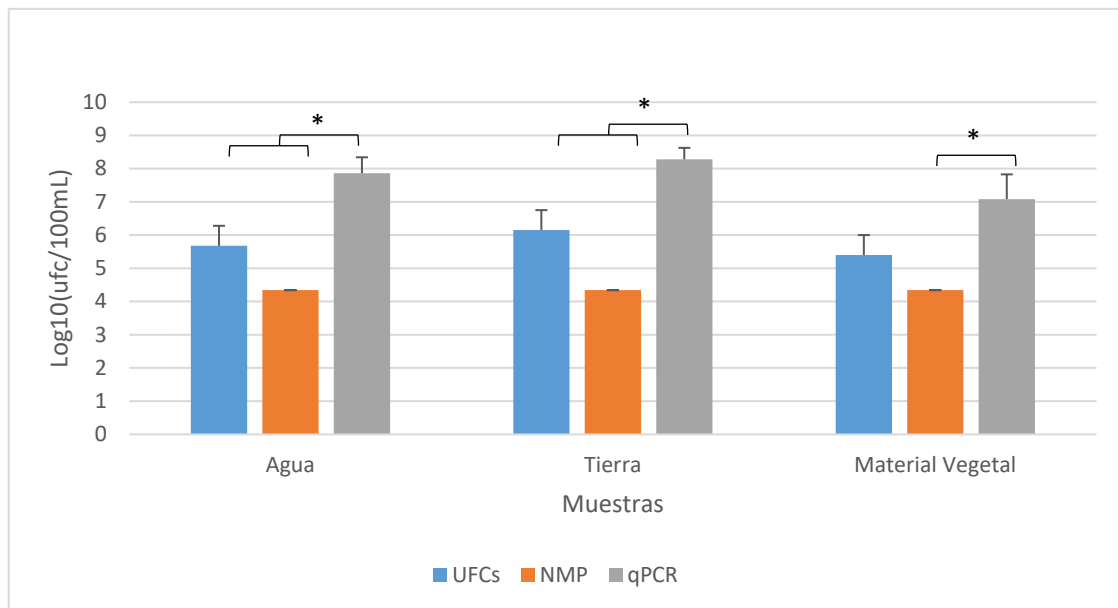


Figura 4. Cuantificación de *Aeromonas* mediante conteo de UFCs, NMP y qPCR, para los 3 tipos de muestras.

6.2 Prevalencia de *Aeromonas* respecto a otros géneros bacterianos

Tras haber sido aisladas de las diferentes muestras, 56 colonias aleatorias en medio ADA (18 de cada muestra) fueron analizadas para ver si pertenecían al género *Aeromonas* mediante la detección de la presencia del gen *gcat* como se muestra en la Figura 5.

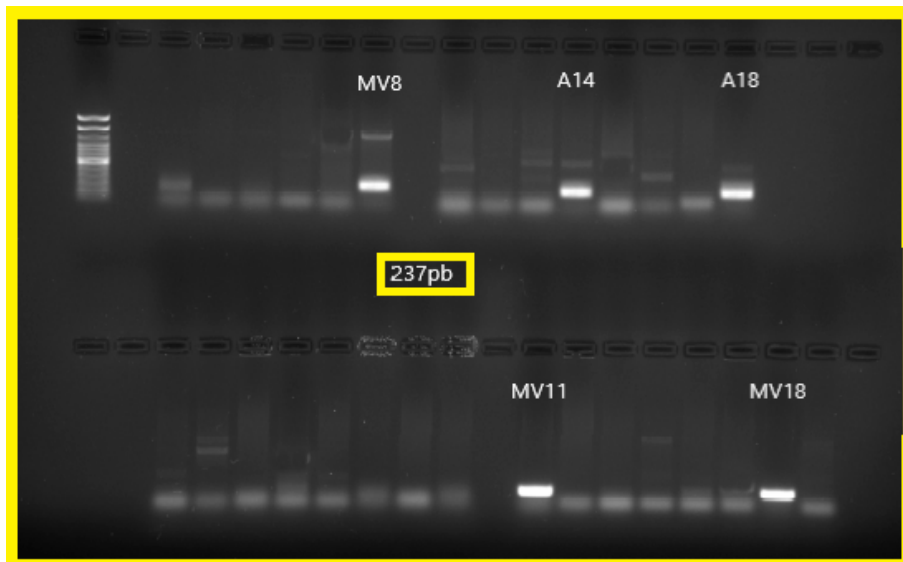
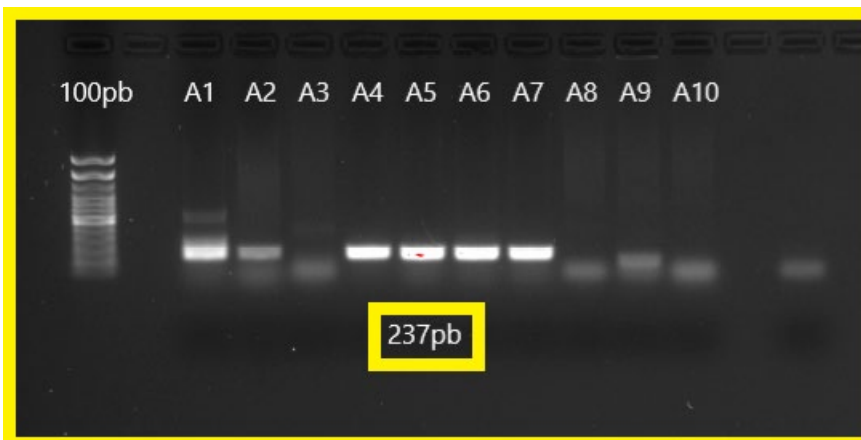
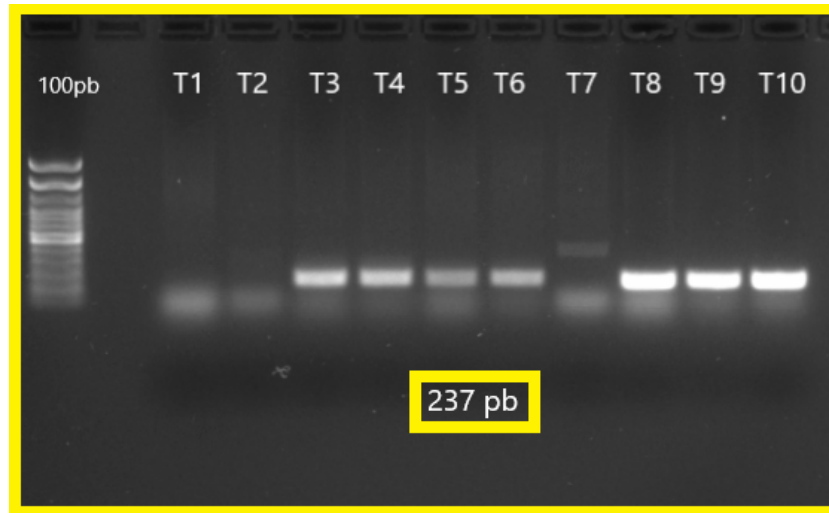


Figura 5. Resultado de PCR del gen *gcat* de diferentes cepas bacterianas de diferentes muestras revelado en gel de agarosa al 1%.

Los resultados mostraron que el 35% de las colonias recuperadas pertenecían a este género como se muestra la Figura 6, siendo un 17% de *Aeromonas* presentes en

agua (A1, A2, A4, A5, A6, A7, A9, A14 y A18), un 13% en tierra (T3, T4, T5, T6, T8, T9, T10) y un 5% en material vegetal (MV8, MV11 y MV18) (Figura 6).

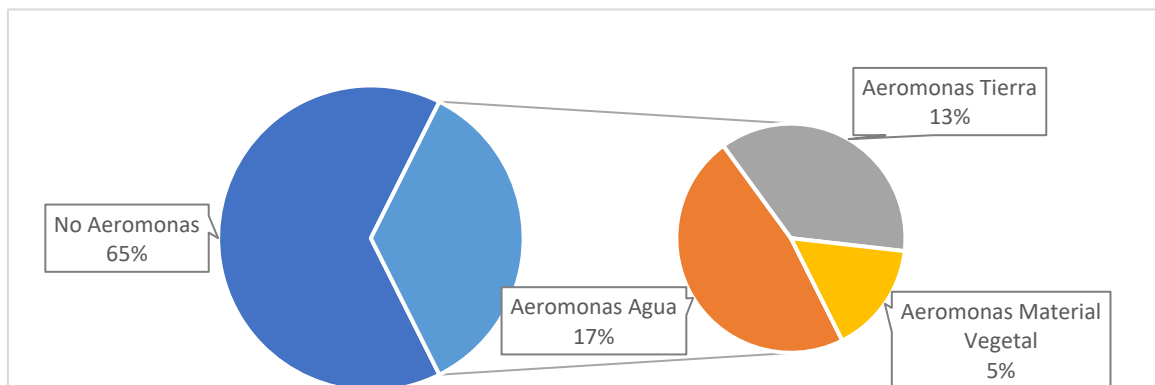


Figura 6. Proporción de *Aeromonas* y de su respectivo origen de todos los aislados crecidos en medio selectivo ADA.

6.3 Genotipado de las cepas de *Aeromonas* mediante ERIC-PCR

El genotipado de las 19 cepas mediante la técnica ERIC-PCR nos ayudó a dilucidar si existían clones entre las cepas de las distintas muestras recolectadas en el mismo lugar. Como podemos observar en la figura 7, se observaron clones en todas las muestras. Además, los resultados también mostraron que existían clones entre cepas aisladas de muestras de agua y de tierra. Sin embargo, las cepas del material vegetal no mostraron ser clones de ninguna cepa de agua y tierra, aunque si entre ellas. En el caso de los clones encontrados en diferentes muestras observamos que las cepas aisladas de agua A1 y A2 mostraron ser clones de las cepas de tierra T5, T8 y T9, y también fueron clones las cepas A6 y T3. Por otro lado, respecto a la tierra y el agua por separado observamos que las cepas T6 y T10 de tierra fueron clones entre ellas, así como las cepas A5 y A14 aisladas de agua. Finalmente, las cepas MV11 y MV18 aisladas del material vegetal también fueron clones entre ellas.

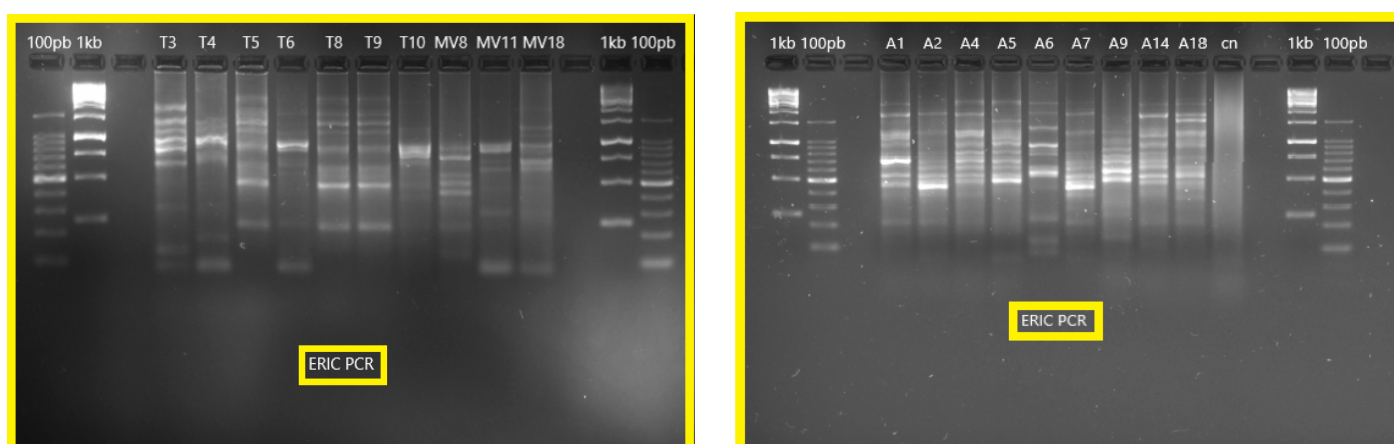


Figura 7. Resultados de la ERIC-PCR de diferentes cepas del género *Aeromonas* revelado en gel de agarosa al 2,5%.

6.4 Estudio de filogenia en base al gen *rpoD*

Tras realizar la amplificación del gen *rpoD* en los aislados, se observó que los cebadores de *rpoD* producían un amplicón del tamaño esperado para todas las cepas identificadas como pertenecientes al género *Aeromonas*. Todas las cepas amplificadas para su posterior secuenciación pueden observarse en la Figura 8.

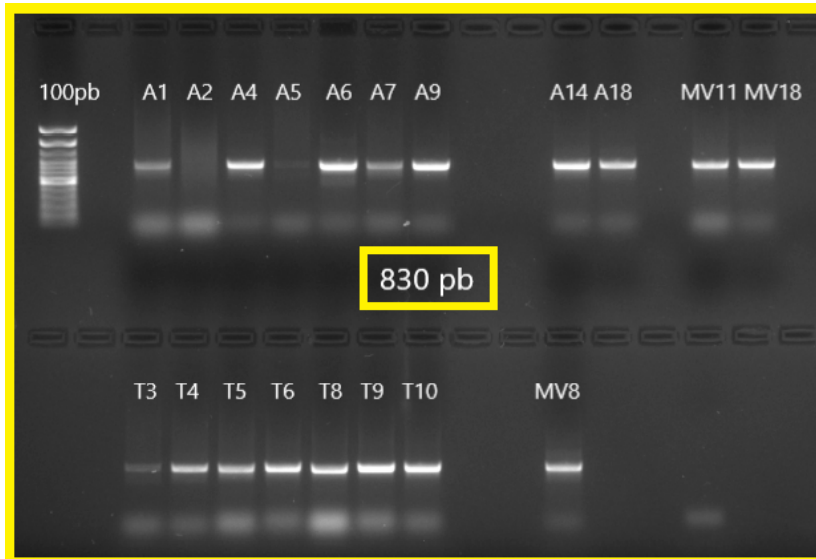


Figura 8. Resultado de PCR del gen *rpoD* de las cepas previamente identificadas como *Aeromonas* revelado en gel de agarosa al 1%. *La cepa A2 se repitió por separado y se obtuvo amplificación.

El análisis filogenético tras la secuenciación del gen *rpoD* mostró que las 19 cepas pertenecían al género *Aeromonas* (Figura 9). Los resultados muestran que 9 de las cepas pertenecen a *A. popoffi*, 2 cepas a *A. hydrophila*, 4 cepas a *A. media* y 1 a *A. rivipollensis*. En el caso de las cepas MV11 y MV18, estas se encuentran incluidas en el clado de *A. media* y *A. rivipollensis*, formando un subclado. En el caso de la A7 observamos que forma un clado totalmente distinto a las especies más cercanas, por lo que sería una *Aeromonas* sp. nov. (Figura 9). Por otro lado, los resultados corroboraron los resultados previos de genotipado, describiendo algunas de las cepas como clones.

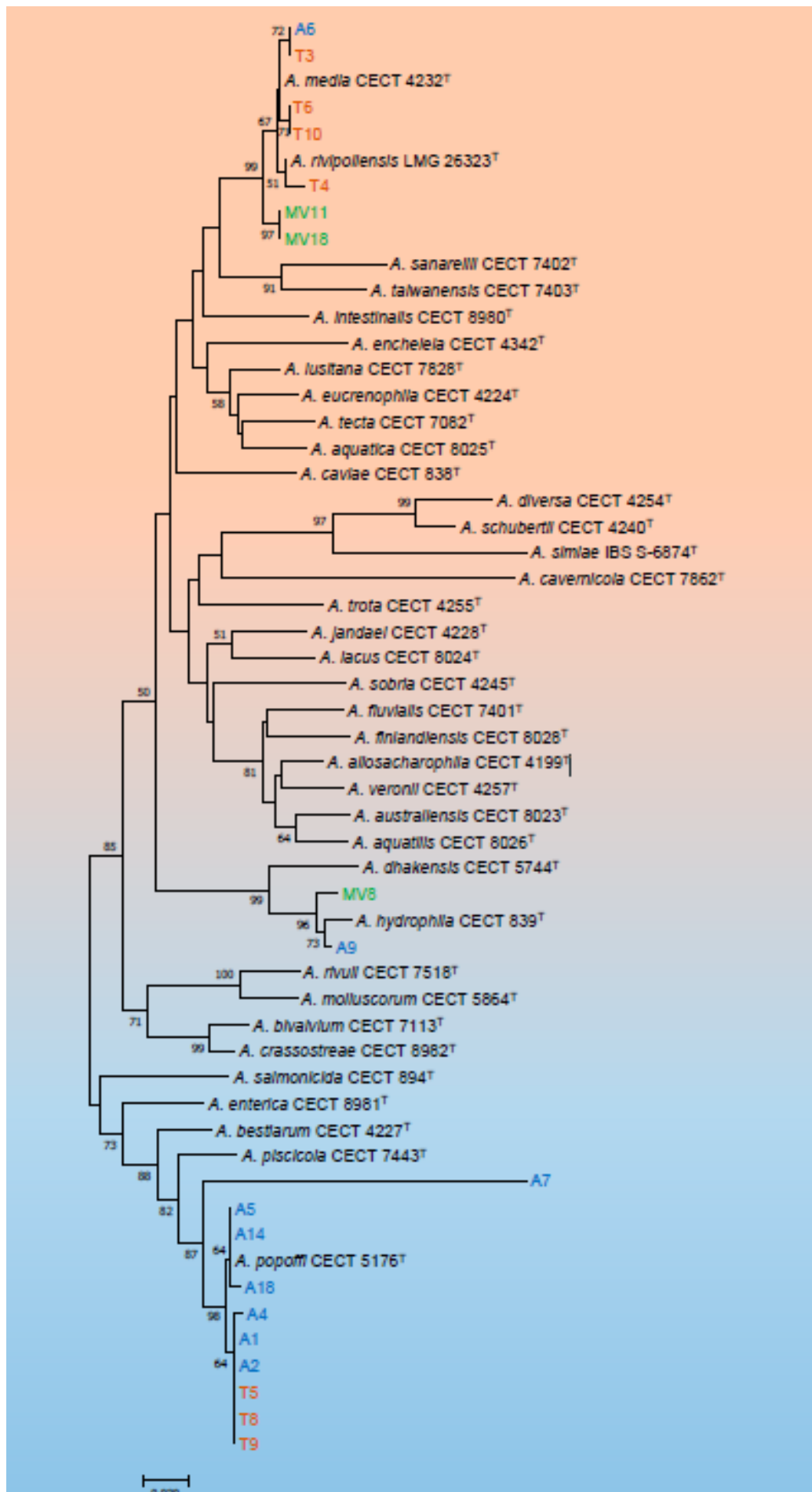


Figura 9. Árbol filogenético del género bacteriano *Aeromonas* basado en la secuencia del gen de mantenimiento *rpoD* (457 pb). Los números de los nodos indican los valores de Bootstrap (porcentaje de 1000 repeticiones). Fueron eliminados los valores de Bootstrap inferiores a 50%. Barra de 0,02 sustituciones de nucleótidos estimados por sitio.

6.5 Sensibilidad a los antibióticos

Para el análisis de la sensibilidad a los antibióticos se realizaron las medidas de los halos, que se encuentran en el Anexo 2. Las 6 (100%) cepas mostraron resistencia a ampicilina, cefalotina, vancomicina y clindamicina. Sin embargo, las 6 (100%) cepas también mostraron sensibilidad a colistina (Tabla 3). Por otro lado, los resultados mostraron que las cepas tenían diferencias en la sensibilidad de ciertos antibióticos tales como estreptomina, cefuroxima, fosfomicina, ceftriaxona, tetraciclina, piperacilina y amoxicilina/clavulánico.

Tabla 3. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las *Aeromonas* A6, A7, T8, T10, MV11 y MV18 (R resistente, I intermedio y S sensible).

	<i>Ampicilina</i>	<i>Estreptomina</i>	<i>Cefalotina</i>	<i>Cefuroxima</i>	<i>Fosfomicina</i>	<i>Ceftriaxona</i>
A6	R	S	R	I	S	S
A7	R	S	R	S	S	S
T8	R	I	R	S	S	I
T10	R	S	R	I	I	R
MV11	R	S	R	R	I	R
MV18	R	S	R	R	I	R
	<i>Vancomicina</i>	<i>Colistina</i>	<i>Tetraciclina</i>	<i>Clindamicina</i>	<i>Piperacilina</i>	<i>Amoxicilina clavulánico</i>
A6	R	S	S	R	S	R
A7	R	S	I	R	S	S
T8	R	S	I	R	R	I
T10	R	S	I	R	I	I
MV11	R	S	I	R	I	R
MV18	R	S	I	R	R	R

6.6 Identificación de factores de virulencia

Tras realizar la PCR y la electroforesis, se observó la presencia/ausencia de ciertos distintos genes de virulencia en las cepas seleccionadas como se muestra en la Tabla 4. Los resultados mostraron que las 6 (100%) cepas poseen el gen *laf* que codifica para el flagelo lateral propio a todas las *Aeromonas*, mientras que los otros genes no se encontraban presentes en todas las cepas. La enterotoxina citotónica (*alt*) se encontró presente en 4 (66,6%) de las cepas y la enterotoxina citotónica (*ast*) se encontró en 5 (83,3%) de las cepas. En el caso del gen *ascF-G* asociado con el sistema de secreción tipo III, observamos que se encontraba en 4 (66,6%) de las cepas. Finalmente la toxina Shiga no se encontró en ninguna de las cepas.

Tabla 4. Genes de virulencia de las cepas aisladas A6, A7, T8, T10, MV11 y MV18.

	<i>Flagelo lateral (laf)</i>	<i>Enterotoxinas Citotónicas (alt)</i>	<i>Enterotoxinas Citotónicas (ast)</i>	<i>Toxina tipo Shiga (stx1)</i>	<i>Sistema de Secreción Tipo 3 (ascF-G)</i>
A6	Presencia	Presencia	Presencia	-	-
A7	Presencia	Presencia	Presencia	-	Presencia
T8	Presencia	Presencia	Presencia	-	Presencia
T10	Presencia	-	Presencia	-	-
MV11	Presencia	-	-	-	Presencia
MV18	Presencia	Presencia	Presencia	-	Presencia

6.7 Daño celular en macrófagos J774A.1

La habilidad de las 6 cepas de *Aeromonas* para inducir daño celular en macrófagos fue medido mediante la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa en el supernadante. Las 6 (100%) cepas mostraron que tras la infección de los macrófagos a MOI 10, estas causaron un nivel de daño celular significativamente alto respecto a las células sin infectar ($p < 0,05$). Sin embargo, los resultados mostraron también, que las cepas A7 y T8 causaron un daño celular significativamente mayor respecto al causado por las otras cepas ($p < 0,05$) como se muestra en la Figura 10.

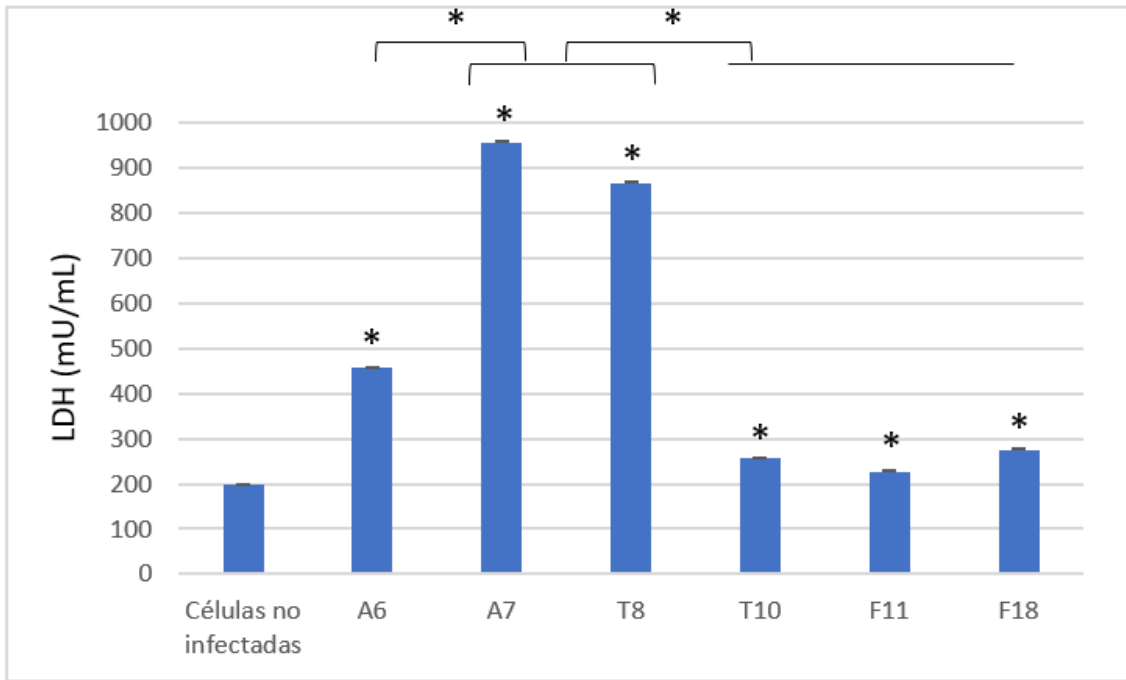


Figura 10. Daño celular inducido por las 6 cepas de *Aeromonas* después de 3 horas de infección a MOI 10 en la línea celular de macrófagos murinos J744A.1. Diferencias significativas ($p < 0,05$) indicadas con *.

6.8 Supervivencia intracelular

Como se muestra en la Figura 11, la infección a MOI 10 mostró diferencias significativas entre las cepas A7 y T8 ($p < 0,05$) respecto al resto de cepas, con porcentajes entre el 50 y el 60% de supervivencia. En el caso del resto de cepas no se observaron diferencias significativas entre ellas, siendo la supervivencia intracelular a las 3 h de aproximadamente un 20% (Figura 11).

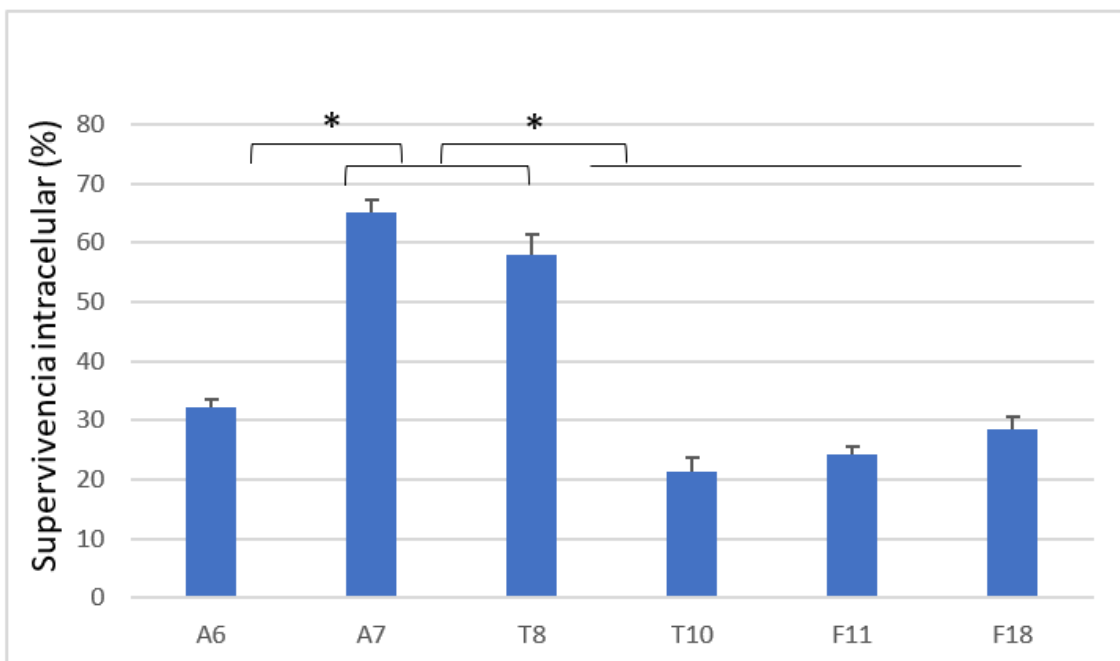


Figura 11. Promedio del porcentaje de supervivencia intracelular de 6 cepas de *Aeromonas* después de 3 horas de infección a MOI 10 (respecto al punto temporal 0 h) en la línea celular de macrófagos murinos J744A.1. Diferencias significativas ($p < 0,05$) indicadas con *.

7. DISCUSIÓN

Las *Aeromonas* son bacterias autóctonas del medio acuático con una amplia distribución (Janda y Abbott et al., 2010; Fernández-Bravo y Figueras, 2020). La mayoría de las especies de *Aeromonas* descritas hasta la fecha han sido aisladas a partir de diferentes muestras de agua (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015; Latif-Eugenín, 2015). Sin embargo, las *Aeromonas* también han sido aisladas en numerosos procesos etiológicos tanto en humanos como en animales, lo que puede conllevar tanto pérdidas humanas como pérdidas económicas en la industria de la piscicultura. Mientras que, en truchas y salmones, especies como *A. salmonicida* son capaces de provocar hemorragias y úlceras como cuadro patológico asociado a la furunculosis principalmente, en humanos especies muy prevalentes como *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. dhakensis* y *A. veronii*, son capaces de desarrollar un amplio espectro de enfermedades e incluso son capaces de desarrollar fascitis necrotizante y provocar la muerte (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). De hecho, en 2013 hubo un caso de fascitis necrotizante causada por *A. hydrophila* en una joven inmunocompetente, la cual cayó a un río mientras practicaba tirolesa y debido a esta infección perdió gran parte de sus extremidades (Ponnusamy et al., 2016). Son estas las motivaciones que hacen que este estudio tenga interés debido a que es necesario conocer la población de *Aeromonas* en diferentes tipos de agua y zonas asociadas, así como estudiar el posible riesgo que puede conllevar la presencia de estas a nivel de salud pública.

La presencia de *Aeromonas* en muestras de agua, tomadas en el paraje natural del "Clot de la Mare de Déu", evaluadas con diferentes métodos de cuantificación, mostraron ser útiles para el análisis de este género. Los resultados mostraron que las *Aeromonas* fueron detectadas en el 100% de las muestras con todas las técnicas de cuantificación, aunque la presencia de este género no es de extrañar puesto que, en 1998 Borrell et al., observaron que el 96% de los lagos y embalses, y el 88% de los ríos muestreados para su estudio albergaban *Aeromonas*. Además, en 2020 un análisis del agua del río Fluviá mostró que en todas las muestras recogidas durante todos los meses del año había presencia de *Aeromonas* (Rusiñol et al., 2020). La técnica que mostró una mayor concentración de *Aeromonas* fue la PCR cuantitativa (qPCR) respecto a las otras técnicas. Literatura previa muestra que la qPCR tiene un alto grado de sensibilidad por lo que es más fácil detectar la presencia de un microorganismo. Sin embargo, esta técnica posee una limitación ya que detecta tanto lo vivo como lo muerto. Esta limitación puede verse solventada mediante la integración de una tinción DNA-intercalante para la detección de organismos viables, esta idea ya se llevó a cabo para la cuantificación de

especies del género *Arcobacter* en muestras de marisco desarrollando una v-qPCR (PCR cuantitativa de viabilidad) utilizando como tinción intercalante monoazida de propidio (PMA) (Salas-Massó et al., 2019). La técnica de cuantificación que mostró una menor concentración de *Aeromonas* fue NMP, esto se debe a que la técnica se ve limitada al tratarse de una técnica de aproximación que no proporciona un resultado exacto, pese a ello los resultados que ofreció son coherentes con los obtenidos con el resto de los métodos de cuantificación, dando para todas las muestras un valor de concentración superior a $2,20 \times 10^4$ ufc/100 ml, una concentración ratificada por el resto de los métodos. En el caso de la técnica de conteo en placa, se observó que existía una concentración intermedia entre la obtenida con qPCR y con el NMP, sin embargo, también se debe estar alerta en el conteo con el medio de cultivo ADA, ya que se ha observado que otras bacterias son capaces de crecer en este medio selectivo para *Aeromonas*, como ocurre en trabajos previos (Latif-Eugenín, 2015). En general, nuestros resultados mostraron que existía una concentración de *Aeromonas* relativamente alta en estas aguas, estando en consonancia con la concentración encontrada normalmente en aguas de superficie como ríos, lagos y embalses (hasta $3,4 \times 10^4$ y $6,9 \times 10^3$ ufc/100 ml) (Borrell et al., 1998; Salvat y Ashbolt, 2019), y en aguas de regadío (desde $7,0 \times 10^2$ ufc/100 ml a $2,45 \times 10^4$ ufc/100ml) (Latif-Eugenín et al., 2016). La calidad de estas aguas es especialmente importante sabiendo que este paraje natural es frecuentado por humanos y animales que pueden entrar en contacto directo con ellas, además las aguas de este paraje desembocan a escasos metros en una playa del mediterráneo, lo que también puede conllevar el contacto de estas con humanos, aunque se ha observado que el crecimiento de este género se ve limitado por la presencia de cloruro de sodio NaCl en el medio, no obstante se ha visto que puede sobrevivir a bajas concentraciones de sal (Delamare et al., 2000). Las tierras aledañas a este paraje corresponden a campos de cultivo, y una mala praxis por parte de los agricultores al utilizar estas aguas para regadío de frutas y verduras que se consumen crudas podría desencadenar brotes epidémicos y tener una importante implicación en la salud pública. De hecho, en 2016, Latif-Eugenín et al., encontraron clones de *A. saranellii* en hortalizas para consumo humano y en aguas con la que cultivos estaban siendo regados, demostrando que el agua de regadío era el origen de la contaminación y confirmando el riesgo para la salud pública.

Por otro lado, también se encontró presencia de *Aeromonas* en muestras de tierra y material vegetal que se encontraba alrededor del agua del “Clot de la Mare de Déu” con todas las técnicas. En general, independientemente de la técnica utilizada, se encontró una mayor concentración de *Aeromonas* en tierras respecto a las muestras de

agua y material vegetal. La presencia de estas bacterias en las distintas muestras se puede explicar por la amplia distribución de este género en el ambiente (Janda and Abbott, 2010). Además, es posible que la subida y bajada del agua pudiera contribuir al aumento de estas bacterias en las otras muestras. La mayor concentración de *Aeromonas* en tierra puede posiblemente deberse a la preparación de la muestra, ya que en el caso de la tierra estaba más concentrada, como ocurrió previamente en un estudio con aguas residuales (Fernández-Bravo, 2019).

Para observar cual era la prevalencia de *Aeromonas* respecto a otros géneros bacterianos, se detectó la presencia del gen *gcat*, previamente utilizado en otros trabajos (Chacón et al., 2003). De todas las cepas aisladas del “Clot de la Mare de Déu” se mostró que el 35% de todas ellas pertenecían al género *Aeromonas*. Para futuros estudios podría ser interesante observar cuales pueden ser los otros géneros, y ver si pudiesen existir sinergias o antagonismos entre géneros.

Los resultados de ERIC-PCR mostraron que existían clones en las cepas de los diferentes tipos de muestra. Esto corrobora los estudios previos en los que se muestra que el agua es un vector de transmisión de *Aeromonas* a otros ambientes (Latif-Eugenin, 2015). De hecho, como se ha comentado anteriormente un estudio previo de Latif-Eugenín et al. (2016) demostró la presencia de clones en las muestras de aguas utilizadas para regar y en las hortalizas regadas con dichas aguas. Es por ello, que la detección y el genotipado de estas cepas aisladas es importante ya que pueden causar infecciones en humanos.

El análisis filogenético construido en base a las secuencias del gen *rpoD* confirmó las relaciones clonales observadas en los resultados de la ERIC-PCR. Previos estudios han demostrado que la secuenciación de este gen es una herramienta excelente para la identificación a nivel de especie de estas bacterias si se compara con los métodos fenotípicos (Fernández-bravo, 2019). Los resultados mostraron que nuestras cepas pertenecían a especies previamente descritas. En 2002, Soler y Figueras et al., determinaron la distribución de especies de *Aeromonas* en 72 muestras de ríos y embalses españoles, encontrando como especies mayoritarias: *A. veronii* (43,6%), *A. hydrophila* (13,9%), *A. caviae* (12,9%), *A. popoffii* (8,0%) y *A. bestiarum* (7,9%). Esto contrasta con la distribución observada en este estudio, puesto que el 66,6% de los aislados de las muestras de agua, 42,8% de los de tierra y ninguno de los de material vegetal fueron identificadas como *A. popoffii*, siendo la siguiente especie más prevalente *A. media*.

Durante este estudio se observó que una cepa proveniente de una muestra de agua se alejaba considerablemente de otras especies en el árbol filogenético construido en base al gen *rpoD*. Esto es un indicio de que esta cepa podría pertenecer a una especie aún no descrita de *Aeromonas*, aunque un estudio de los 6 genes restantes del MLPA sería necesario para confirmar el descubrimiento de una nueva especie, así como la realización de las pruebas bioquímicas pertinentes. Sin embargo, ya que en este estudio hemos aislado la cepa, nosotros proponemos *Aeromonas burrianesis* sp. nov. Por otro lado, se observó que dos de las cepas aisladas del material vegetal se incluían en el clado de *A. media* y *A. rivipollensis* pero la distancia filogenética era suficientemente alta como para pertenecer a otra especie. Probablemente estas cepas pertenezcan a *Aeromonas paramedia*, una especie que se encuentra en proceso de descripción. Reciente literatura mostró que este clado poseía una taxonomía compleja y que hasta el momento todo era identificado como *A. media*. Talagrand-Reboul et al., 2017 demostró que *A. media* encriptaba otras especies, una de ellas *A. rivipollensis* y la otra *A. paramedia*, no descrita en la actualidad.

Nuestro estudio de susceptibilidad a antimicrobianos mostró que todas las cepas eran resistentes a diversos antibióticos. Se sabe que las *Aeromonas* son resistentes a algunas penicilinas (Aravena-Román et al., 2012), sin embargo, generalmente son sensibles a un gran número de antibióticos. También es curioso que la ceftriaxona, una cefalosporina de tercera generación, utilizada generalmente para el tratamiento de infecciones por *Aeromonas*, no fuera efectiva contra algunas de nuestras cepas. Un problema de actualidad es el aumento de la resistencia a antibióticos por parte de las bacterias, cada día aparecen y se propagan nuevos mecanismos de resistencia por parte de estos microorganismos para eludir la acción de los agentes antimicrobianos como por ejemplo la acción de las β -lactamasas frente a antibióticos β -lactámicos (Fernández-Bravo, 2019). Esto puede ser un problema, ya que generalmente no se cree que las bacterias de origen ambiental puedan causar grandes daños y se suele pensar que la mayoría de los antibióticos pueden ser utilizados en su contra.

El análisis de la presencia de los factores de virulencia nos mostró que existía variabilidad entre cepas como previamente se ha mostrado en *Aeromonas* (Figueras y Beaz-Hidalgo., 2015). Algo interesante es la presencia del T3SS, el cual se ha visto previamente que tiene un gran papel en la virulencia de *Aeromonas*. Además, aunque la virulencia es multifactorial, en este estudio si se observó que las cepas con mayor número de presencia de factores de virulencia causaban un mayor daño celular en los macrófagos murinos y la supervivencia intracelular a las 3h era mayor que el resto de las cepas. Los resultados de la cuantificación de la LDH liberada al medio, una liberación

que es inducida por la lisis de las células mediante apoptosis o piroptosis, mostraron que después de la infección con *Aeromonas* a MOI 10 durante 3 horas existía un alto nivel de daño celular respecto a las células sin infectar. Aunque lo interesante reside en el daño causado por dos cepas, ya que generalmente las cepas ambientales no causan tanto daño (Fernández-Bravo,2019). Lo mismo ocurre con la supervivencia intracelular, la cual era mayor en estas dos cepas en comparación con el resto tras las 3h de infección. En futuros estudios sería interesante realizar más experimentos relacionados con la virulencia de estas dos cepas, ya que podrían causar daños serios en la salud humana y representar un riesgo biosanitario real.

8. CONCLUSIÓN

Como se ha podido observar en este estudio, existe una alta concentración de *Aeromonas* spp. en las muestras obtenidas del paraje natural “El Clot de la Mare de Déu”. La presencia de clones entre los diferentes tipos de muestra apoya la hipótesis de que el agua puede actuar como vector de transmisión de esta bacteria, por lo que utilizarla para regar podría causar un daño importante en la salud humana. Además, la presencia de estas bacterias nos alerta del peligro de realizar actividades recreativas en estas aguas, ya que el contacto de una herida abierta podría ser devastador. Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de daño celular y supervivencia intracelular, así como en los de presencia de factores de virulencia confirman que *Aeromonas* es un patógeno emergente y que pese a tratarse de cepas ambientales, una infección por estas cepas también podría conllevar peligro. Finalmente, los resultados obtenidos con el perfil antimicrobiano de las cepas estudiadas confirman el aumento de la resistencia a antibióticos por parte de las bacterias, poniendo en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Aunque este trabajo aumenta el conocimiento sobre el problema de la presencia de *Aeromonas* en este tipo de parajes naturales, sigue siendo necesario continuar los estudios sobre *Aeromonas* para proporcionar respuestas precisas y ahondar más el conocimiento sobre el género.

A continuación, se listan las conclusiones obtenidas del trabajo:

1. El mejor método para la cuantificación de *Aeromonas* es la qPCR, puesto que, aparte de ser más precisa, también es más rápida que las técnicas de conteo de UFCs y de NMP.
2. La presencia de *Aeromonas* en “El Clot de la Mare de Déu” podría causar problemas ya que es una zona de uso recreativo humano y animal.
3. La presencia de clones en los diferentes tipos de muestra confirma que puede existir contaminación cruzada y que una mala praxis por parte de los agricultores podría conllevar infecciones en humanos.
4. La identificación a nivel de género de *Aeromonas* mediante la técnica de amplificación del gen *gcat* es fiable, puesto que todos los aislados fueron posteriormente identificados como *Aeromonas*.
5. El gen *rpoD* ha sido resolutivo para identificar las cepas aisladas en este trabajo.
6. El análisis filogenético de las cepas encontradas en el paraje natural mostró la existencia de una posible nueva especie para la cual proponemos el nombre de *Aeromonas burrianensis* sp. nov.

7. Este estudio aporta cepas de *A. paramedia* que se encuentra actualmente en proceso de descripción.
8. El estudio de la susceptibilidad antimicrobiana muestra que cepas ambientales de *Aeromonas* pueden desarrollar resistencia a un gran número de antibióticos.
9. Los factores de virulencia son variables entre las cepas, sin embargo, las cepas con mayor número de factores de virulencia fueron A7 y T8.
10. Los estudios *in vitro* confirman que las *Aeromonas* pueden causar daños importantes en la salud humana, haciendo especial hincapié en la peligrosidad de las cepas A7 y T8, que pese a tratarse de cepas ambientales mostraron un alto grado de daño celular, así como de supervivencia intracelular.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Martin-Carnahan, A., & Joseph, S. W. (2015). *Aeromonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-44.
2. Fernández Bravo, A. (2019). *Epidemiology and pathogenic characterization of species of the genus Aeromonas* (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).
3. Vega-Sánchez, V., Latif-Eugenín, F., Soriano-Vargas, E., Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M. J., Aguilera-Arreola, M. G., & Castro-Escarpulli, G. (2014). Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β -lactamase genes. *Veterinary microbiology*, 172(3-4), 528-533.
4. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35-73.
5. Janda, J. M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical microbiology reviews*, 4(4), 397-410.
6. Fernández-Bravo, A., & Figueras, M. J. (2020). An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms*, 8(1), 129.
7. Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., ... & Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 1043-1047.
8. Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2010). Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(3), 149-153.
9. Figueras, M. J., Beaz-Hidalgo, R., Collado, L., & Martínez-Murcia, A. J. (2011). Recommendations for a new bacterial species description based on analyses of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter*. *Bull. BISMIS*, 2, 1-16.
10. Martínez-Murcia, A., & Lamy, B. (2015). Molecular diagnostics by genetic methods. *Aeromonas*; *Academic Press: Norfolk, UK*, 155-200.
11. Alperi, A., Figueras, M. J., Inza, I., & Martínez-Murcia, A. J. (2008). Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int Microbiol*, 11(3), 185-194.
12. Latif Eugenín, F. L. (2015). *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).

13. Demarta, A., K pfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., ... & Martínez-Murcia, A. (2008). *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(4), 278-286.
14. Martínez-Murcia, A., Beaz-Hidalgo, R., Svec, P., Saavedra, M. J., Figueras, M. J., & Sedlacek, I. (2013). *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Current microbiology*, 66(2), 197-204.
15. Figueras, M. J., Latif-Eugenín, F., Ballester, F., Pujol, I., Tena, D., Berg, K., ... & Liles, M. R. (2017). 'Aeromonas intestinalis' and 'Aeromonas enterica' isolated from human faeces, 'Aeromonas crassostreae' from oyster and 'Aeromonas aquatilis' isolated from lake water represent novel species. *New microbes and new infections*, 15, 74-76.
16. Latif-Eugenín, F., Beaz-Hidalgo, R., & Figueras, M. J. (2016). Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples. *Journal of applied microbiology*, 121(3), 883-891.
17. Beaz-Hidalgo, R., & Figueras, M. J. (2013). *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of fish diseases*, 36(4), 371-388.
18. Bhunia, A. K. (2018). Opportunistic and Emerging Foodborne Pathogens: *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Cronobacter sakazakii*, and *Brucella abortus*. In *Foodborne Microbial Pathogens* (pp. 343-350). Springer, New York, NY.
19. Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M. J., Liles, M. R., & Figueras, M. J. (2015). Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the GenBank database. *PloS one*, 10(1), e0115813.
20. Wilson, L. A., & Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular biology and evolution*, 23(6), 1156-1168.
21. Holmes, P. H. I. L. I. P., Niccolls, L. M., & Sartory, D. P. (1996). The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. *The Genus Aeromonas*, 127-150.
22. Fontes, M. C., Saavedra, M. J., Martins, C., & Martínez-Murcia, A. J. (2011). Phylogenetic identification of *Aeromonas* from pigs slaughtered for consumption in slaughterhouses at the North of Portugal. *International journal of food microbiology*, 146(2), 118-122.
23. Sisti, M., Albano, A., & Brandi, G. (1998). Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. *Letters in applied microbiology*, 26(5), 347-351.

24. McLellan, S. L., Huse, S. M., Mueller-Spitz, S. R., Andreishcheva, E. N., & Sogin, M. L. (2010). Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environmental microbiology*, 12(2), 378-392.
25. Salvat, M. J. F., & Ashbolt, N. (2019). *Aeromonas*. *Global Water Pathogen Project; University of Alberta: Edmonton, AB, Canada*.
26. Araujo, R. M., Pares, R., & Lucena, F. (1990). The effect of terrestrial effluents on the incidence of *Aeromonas* spp. in coastal waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(3), 439-444.
27. Abbott, S. L., Cheung, W. K., & Janda, J. M. (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2348-2357.
28. Figueras, M. J., Suarez-Franquet, A., Chacon, M. R., Soler, L., Navarro, M., Alejandre, C., ... & Guarro, J. (2005). First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 538-541.
29. Spadaro, S., Berselli, A., Marangoni, E., Romanello, A., Colamussi, M. V., Ragazzi, R., ... & Volta, C. A. (2014). *Aeromonas sobria* necrotizing fasciitis and sepsis in an immunocompromised patient: a case report and review of the literature. *Journal of medical case reports*, 8(1), 1-6.
30. Figueras, M. J., & Beaz-Hidalgo, R. (2015). *Aeromonas* infections in humans. *Aeromonas*, 65-108.
31. Grim, C. J., Kozlova, E. V., Ponnusamy, D., Fitts, E. C., Sha, J., Kirtley, M. L., ... & Chopra, A. K. (2014). Functional genomic characterization of virulence factors from necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and environmental microbiology*, 80(14), 4162-4183
32. Ponnusamy, D., Kozlova, E. V., Sha, J., Erova, T. E., Azar, S. R., Fitts, E. C., ... & Chopra, A. K. (2016). Cross-talk among flesh-eating *Aeromonas hydrophila* strains in mixed infection leading to necrotizing fasciitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(3), 722-727.
33. Fernández-Bravo, A., Kilgore, P. B., Andersson, J. A., Blears, E., Figueras, M. J., Hasan, N. A., ... & Chopra, A. K. (2019). T6SS and ExoA of flesh-eating *Aeromonas hydrophila* in peritonitis and necrotizing fasciitis during mono- and polymicrobial infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(48), 24084-24092.
34. Tomás, J. M. (2012). The main *Aeromonas* pathogenic factors. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
35. Chopra, A. K., & Houston, C. W. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*, 1(13), 1129-1137.

36. Yu, H. B., Rao, P. S., Lee, H. C., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J. M., & Leung, K. Y. (2004). A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infection and immunity*, *72*(3), 1248-1256.
37. Shrestha, N., Bahnan, W., Wiley, D. J., Barber, G., Fields, K. A., & Schesser, K. (2012). Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) signaling regulates proinflammatory cytokine expression and bacterial invasion. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(34), 28738-28744.
38. Zhang, X. T., Zhang, G. R., Shi, Z. C., Yuan, Y. J., Zheng, H., Lin, L., ... & Ji, W. (2017). Expression analysis of nine Toll-like receptors in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) responding to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish & shellfish immunology*, *63*, 384-393.
39. Walsh, C., & Wright, G. (2005). Introduction: antibiotic resistance. *Chemical reviews*, *105*(2), 391-394.
40. Dias, C., Serra, C. R., Simões, L. C., Simões, M., Martinez-Murcia, A., & Saavedra, L. (2014). Extended-spectrum-lactamase and carbapenemase-producing *Aeromonas* species in wild animals from Portugal.
41. Soler, L., Figueras, M. J., Chacón, M. R., Vila, J., Marco, F., Martinez-Murcia, A. J., & Guarro, J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *32*(3), 243-247.
42. Soler, L., Yanez, M. A., Chacon, M. R., Aguilera-Arreola, M. G., Catalán, V., Figueras, M. J., & Martinez-Murcia, A. J. (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *54*(5), 1511-1519.
43. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, *23*(21), 2947-2948.
44. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, *30*(12), 2725-2729.
45. CLSI (2015) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; 3rd edn, M45. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
46. Merino, S., Gavín, R., Vilches, S., Shaw, J. G., & Tomás, J. M. (2003). A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains. *Applied and environmental microbiology*, *69*(1), 663-667.
47. Chopra, A. K., Peterson, J. W., Xu, X. J., Coppenhaver, D. H., & Houston, C. W. (1996). Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic

- enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microbial pathogenesis*, 21(5), 357-377.
48. Aguilera-Arreola, M. G., Hernández-Rodríguez, C., Zúñiga, G., Figueras, M. J., & Castro-Escarpulli, G. (2005). *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS microbiology letters*, 242(2), 231-240.
 49. Wang, G., Clark, C. G., & Rodgers, F. G. (2002). Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), 3613-3619.
 50. Chacón, M. R., Figueras, M. J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., & Guarro, J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84(4), 269-278.
 51. Murciano, C., Hor, L. I., & Amaro, C. (2015). Host–pathogen interactions in *Vibrio vulnificus*: responses of monocytes and vascular endothelial cells to live bacteria. *Future microbiology*, 10(4), 471-487.
 52. Borrell, N., Figueras, M. J., & Guarro, J. (1998). Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(2), 103-108.
 53. Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Timoneda, N., Fernández-Cassi, X., Pérez-Cataluña, A., Fernández-Bravo, A., ... & Girones, R. (2020). Metagenomic analysis of viruses, bacteria and protozoa in irrigation water. *International journal of hygiene and environmental health*, 224, 113440.
 54. Salas-Massó, N., Linh, Q. T., Chin, W. H., Wolff, A., Andree, K. B., Furones, M. D., ... & Bang, D. D. (2019). The use of a DNA-intercalating dye for quantitative detection of viable *Arcobacter* spp. cells (v-qPCR) in shellfish. *Frontiers in microbiology*, 10, 368.
 55. Delamare, A. P. L., Costa, S. O. P., Da Silveira, M. M., & Echeverrigaray, S. (2000). Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. *Letters in applied microbiology*, 30(1), 57-60.
 56. Aravena-Román, M., Inglis, T. J., Henderson, B., Riley, T. V., & Chang, B. J. (2012). Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(2), 1110.
 57. Vincent, A. T., Fernández-Bravo, A., Sanchis, M., Mayayo, E., Figueras, M. J., & Charette, S. J. (2019). Investigation of the virulence and genomics of *Aeromonas salmonicida* strains isolated from human patients. *Infection, Genetics and Evolution*, 68, 1-9.

10. AUTOEVALUACIÓN

Antes de comenzar a realizar este Trabajo de Final de Grado basado en mi estancia de “Prácticas externas” en la Unidad de Micología y Microbiología Ambiental del IISPV, mi experiencia en el mundo de la experimentación y de la investigación estaba notablemente limitada. Sin embargo, los conocimientos que me ha brindado poder contribuir al estudio del género *Aeromonas*, que está caracterizado por su singularidad y por ser menos estudiado respecto a otros, son incalculables, puesto que esta estancia me ha sumergido en el mundo de la investigación del sector microbiológico. La pasión y la dedicación por la investigación que me ha transmitido mi tutora la Dra. Ana Fernández-Bravo han alentado mis deseos de conocimiento y perfeccionamiento en este sector, motivándome como investigador y haciendo de esta una fructífera experiencia.

El apoyo y el respaldo de mi tutora, doctorandos a su cargo y técnicos de laboratorio, me permitieron desde un principio participar de manera activa en la realización de los experimentos que comprende este estudio. Aunque, esta experiencia también me ha demostrado la dificultad que supone obtener resultados consistentes, ya al trabajar con organismos vivos existe una variabilidad en los resultados y estos pueden contradecir los resultados obtenidos en otros estudios. Con el paso del tiempo mis habilidades y criterio fueron mejorando, llegando al punto de ser capaz de interpretar los resultados obtenidos por mí mismo.

Estos tres meses de prácticas me han permitido profundizar y aplicar conocimientos adquiridos durante el grado de Biotecnología. El amplio espectro de experimentos que alberga este estudio me ha permitido aprender y reforzar técnicas de la microbiología clásica: como técnicas de cultivo bacteriano y de cultivos celulares, técnicas de biología molecular: como la secuenciación de genes y diferentes tipos de PCRs, así como la utilización de softwares bioinformáticos para el estudio filogenético de los organismos.

Finalmente, puedo afirmar que la investigación y la redacción de este trabajo me han enfrentado a situaciones en el mundo de la investigación hasta ahora desconocidas para mí, pero gracias a la ayuda de mi tutora y al razonamiento científico se han podido solventar. El balance general de esta experiencia ha sido muy positivo, conociendo por fin cómo trabaja un equipo de investigación al unísono compartiendo conocimientos, técnicas y experiencias.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1: Tabla de cebadores

Tabla 5. Cebadores utilizados en este estudio junto a sus secuencias y sus dianas

Cebador	Secuencia 5'-3'	Diana
GCAT-1	CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG	<i>gcat</i>
GCAT-2	GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT	
RpoD-Fs (forward)	GTC AATTCCGCCTGATGC	<i>rpoD</i>
RpoD-Rs (reverse)	ATCATCTCGCGCATGTTGT	
ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	<i>genoma</i>
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	
Laf1	GGTC TGC GCATCCA ACTC	<i>lafA</i>
Laf2	GCTCCAGACGGTTGATG	
alt-F	AAAGCGTCTGACAGCGAAGT	<i>alt</i>
alt-R	AGCGCATAGGCGTTCTCTT	
ast-F	ATCGTCAGCGACAGCTCTT	<i>ast</i>
ast-R	CTCATCCCTTGGCTTGT	
Stx1-a	TCTCAGTGGGCGTTCTTATG	<i>stx1</i>
Stx1-b	TACCCCTCAACTGCTAATA	
ascF-G-F	ATGAGGTCATCTGCTCGCGC	Sistema de Secreción Tipo 3
ascF-G-R	GGAGCACACCATGGCTGAT	

11.2 Anexo 2: Tabla de halos de inhibición

Tabla 6. Medidas de los halos de inhibición en milímetros creados por la susceptibilidad de las cepas a un antibiótico. Indicados con un asterisco * los halos que presentaron colonias en su interior.

	<i>Ampicilina</i>	<i>Estreptomicina</i>	<i>Cefalotina</i>	<i>Cefuroxima</i>	<i>Fosfomicina</i>	<i>Ceftriaxona</i>
A6	0	22	0	22	32	30
A7	0	18	0	25	32	30
T8	0	16	0	28	30	28
T10	0	20	0	14	30*	25*
F11	0	20	0	18*	30*	24*
F18	0	18	0	16*	30*	24*
	<i>Vancomicina</i>	<i>Colistina</i>	<i>Tetraciclina</i>	<i>Clindamicina</i>	<i>Piperacilina</i>	<i>Amoxicilina clavulánico</i>
A6	14	16	22	0	24	12
A7	12	14	20	0	28	20
T8	0	14	18	0	20*	16
T10	0	13	20	0	22*	15
F11	0	14	20	0	22*	12
F18	0	14	20	0	18*	12