

# Genómica y metagenómica en taxonomía y diversidad bacterianas: aportaciones desde Baleares

**A. Bennasar, R. Bergueiro, R. Bosch, I. Brunet-Galmés, A. Busquets, A. Cifuentes, S. Díaz, E. García-Valdés, M. Gomila, J. Lalucat, A. López-López, M. Mas-Lladó, M. Mulet, B. Nogales, A. Peña, J.M. Piña-Villalonga, C. Prince, C. Ramón, R. Rosselló-Móra, D. Sánchez, C. Scotta, L.Y. Suárez-Suárez y M. Urdiain.**

Departamentos de Biología y Química, Universitat de les Illes Balears e Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (IMEDEA CSIC-UIB)

## INTRODUCCIÓN

El Grupo de Investigación en Microbiología está reconocido como competitivo por la Dirección General de Universidades e Investigación de la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares y recibió en 2012 el Premio Jaume II del Consell Insular por su labor investigadora. Pertenecen a él investigadores de la UIB (Departamentos de Biología y Química), del IMEDEA (centro mixto entre la UIB y el CSIC) y de la FISIB (Fundación de Investigación Sanitaria de les Illes Balears). Está constituido en estos momentos por todas las personas relacionadas como autores del artículo.

Los intereses científicos del grupo se centran en la diversidad y taxonomía de los microorganismos, su papel en los ecosistemas y su relevancia en la lucha contra la contaminación. En la bibliografía se indican publicaciones científicas representativas de los distintos microorganismos objeto de estudio, así como el marco ecológico en los que éstos desarrollan sus actividades y las metodologías empleadas.

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación desarrolladas en los últimos 5 años están permitiendo la secuenciación masiva de DNA y suponen una innovación importantísima en los estudios taxonómicos y de biodiversidad. Ello ha permitido grandes avances en el desarrollo de aspectos teórico-prácticos de la Taxonomía Bacteriana, tales como la reevaluación de conceptos y definiciones de taxones, la aplicación de nuevas técnicas en taxonomía, como son los análisis multigénicos («Multilocus Sequence analysis», MLSA) y también la comparación de genomas. Los miembros del grupo aplican estas metodologías al estudio de una serie de microorganismos modelo y hábitats característicos, sobre todo acuáticos.

El grupo mantiene activo un Máster en Microbiología Avanzada (UIB), ligado a un Doctorado con la mención hacia

la excelencia en Microbiología Ambiental y Biomédica cuya docencia viene vertebrada por las líneas de investigación.

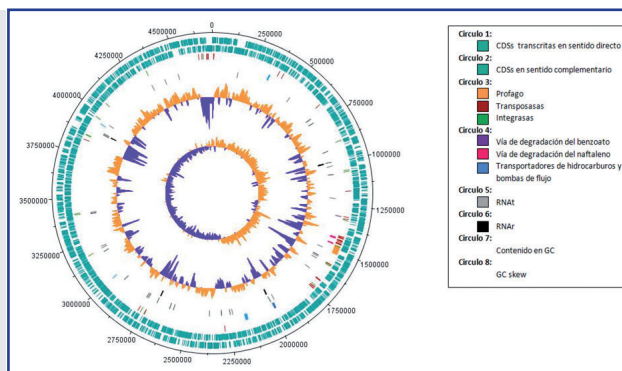
## MICROORGANISMOS OBJETO DE ESTUDIO Y SUS CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS

Se estudian poblaciones y comunidades microbianas, así como su función en diversos ecosistemas (sedimentos marinos, columna de agua, salinas, salares y aguas puras), empleando metodologías tradicionales de cultivo y metodologías moleculares (genómica, metagenómica, proteómica y metabolómica). Los géneros *Pseudomonas*, *Salinibacter* y los del grupo de *Roseobacter* son los estudiados prioritariamente por los diferentes equipos que conforman el grupo. En todos los casos es imprescindible conocer el marco ambiental (condicionantes físicos y químicos) que determinan la presencia y actividad de los microorganismos en los ecosistemas.

### *Pseudomonas*

Es un género de gran versatilidad fisiológica, relevancia ecológica y de aplicación biotecnológica. La definición del género ha ido evolucionando a la par que las técnicas empleadas en taxonomía. En la actualidad es el género de bacterias Gram negativas con mayor número de especies reconocidas (130). La aproximación por MLSA permite establecer el marco idóneo en la discriminación entre especies. Por otra parte, los análisis genómicos están corroborando en gran medida la clasificación actual y permite también confirmar grupos sub-específicos, como son las genomovares en *P. stutzeri*. Se ha descrito el genoma de 3 de ellas. Su presencia en ambientes contaminados y su papel como degradadores de contaminantes

Atlas genómico de *Pseudomonas stutzeri* CCUG 29243 (AN10). Los círculos 1 y 2 constituyen las secuencias codificantes (CDSs) en sentido directo y complementario respectivamente. El círculo 3 presenta diferentes zonas relacionadas con el moviloma de este genoma. El círculo 4 representa diferentes regiones relacionadas con el transporte y la degradación de hidrocarburos. Los círculos 5 y 6 están formados por los RNAs de transferencia y ribosómicos, y los círculos 7 y 8 muestran el contenido en GC, así como el «GC skew».



o fijadores de nitrógeno se estudia mediante técnicas de cultivo y otras independientes de cultivo. Ambas son necesarias y complementarias. Su presencia en aguas puras hospitalarias, junto a la de micobacterias ambientales, constituye un nuevo hábitat muy particular abordado por el grupo.

### Clado *Roseobacter*

Los *roseobacter* constituyen un grupo de bacterias marinas mayoritarias (hasta un 25%) en algunas aguas marinas costeras, contribuyendo significativamente a los ciclos del carbono y del azufre. Muchas de ellas se encuentran de forma simbiótica con otros miembros del fitoplancton. Es un grupo muy diverso dentro de las alfa-proteobacterias (familia de las *Rhodobacteriaceae*). No se han conocido bien hasta entrados los años 90. Miembros del grupo estudian sobre todo su papel en ecosistemas marinos costeros en relación con la degradación de contaminantes. Se ha descrito el genoma de un aislado de este clado, *Citricella aestuarii* 357.



Célula flagelada de *Pseudomonas stutzeri* observada al microscopio electrónico de transmisión (tinción negativa con ácido fosfotúngstico).

### Halófilos extremos (*Salinibacter*)

Este género de halófilos del dominio *Bacteria* fue el primero al que se le reconoció una relevancia ecológica importante en ambientes hipersalinos. De hecho, su descubrimiento fue casual al aplicar las técnicas de ecología molecular a salmueras mediterráneas. Junto con Josefa Antón de la Universidad de Alicante, se ha estudiado tanto la genómica de varios aislados, como su biogeografía mediante una aproximación metabolómica. Estos estudios (junto con la UA) fueron en su tiempo los análisis comparativos más cercanos entre dos genomas. También fueron pioneros en mostrar que la composición metabolómica de los organismos permite visualizar una especiación alopatrida incipiente.

### HERRAMIENTAS

Para que estas técnicas novedosas de secuenciación sean útiles, es necesario disponer de las herramientas bioinformáticas imprescindibles y también de bases de datos controladas, taxonómicamente correctas y puestas al día periódicamente. Los miembros del grupo han colabora-



Colonias características de *Pseudomonas stutzeri* en placas de agar sangre.

do en el desarrollo de dos bases de datos genéticas de aplicación en taxonomía, así como en el diseño de programas útiles, como son los proyectos LTP, JSpecies y PseudoMLSA.

### «The All-Species Living Tree» Project (LTP; [www.arb-silva.de/projects/living-tree/](http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/))

Cinco grupos internacionales, junto con la publicación Systematic and Applied Microbiology (SAM) están colaborando en este proyecto con el objetivo de proporcionar una base de datos útil para los taxónomos que contenga secuencias bien controladas, de calidad, de los genes ribosómicos 16S y 23S de *Archaea* y *Bacteria* de todas las cepas tipo descritas.

### PseudoMLSA

[www.uib.es/microbiologiaBD/Welcme.html](http://www.uib.es/microbiologiaBD/Welcme.html)

Es una base de datos que almacena secuencias y características de las especies del género *Pseudomonas*, con una especial referencia a *P. stutzeri*. Es una herramienta muy útil para la identificación y análisis filogenómicos de este género. Incluye también la posibilidad de analizar genomas.

### JSpecies

[www.imedeia.uib.es/jspecies](http://www.imedeia.uib.es/jspecies)

Es un programa de manejo sencillo diseñado con un enfoque biológico que pretende medir la probabilidad de que dos genomas pertenezcan o no a individuos de la misma especie bacteriana.

## PROYECTOS VIGENTES

Dentro del grupo se han ido definiendo a lo largo de los años diversos equipos de investigación para la consecución de proyectos concretos. La enumeración de los actualmente vigentes muestra las líneas de investigación. En la actualidad se participa en dos grandes proyectos del programa Consolider del MINECO: «The microbial metagenome of the Iberian península» (CSD2007-0005; 2007-2012) y Microbial comparative genomics (MICROGEN; CSD2009-00006; 2009-2014). Los proyectos vigentes del Plan Nacional son:

Degradadores emergentes de hidrocarburos en ambientes marinos: proteogenómica y metagenómica del grupo bacteriano *Roseobacter* (2012-2014).

*Pseudomonas* y biopelículas en aguas puras (2012-2014).

Genómica comparada de las micobacterias ambientales: implicaciones ecológicas y clínicas (2013-2015).

Estructura, dinámica y sistemática de comunidades procarionóticas en ambientes hipersalinos (2013-2015).

## COLABORACIONES

El grupo tiene una clara vocación de colaboración con otros grupos nacionales e internacionales, tal como consta en las publicaciones.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) la mayor parte de la financiación obtenida para los proyectos de investigación y también a la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares. Ambos suponen una cofinanciación con Fondos FEDER.

## BIBLIOGRAFÍA RECIENTE

- Bennasar A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E (2010).** PseudoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. *BMC Microbiol* 10: 118-123.
- Brunet-Galmés I, Busquets A, Peña A, Gomila M, Nogales B, García-Valdés E, Lalucat J, Bennasar A, Bosch R (2012).** Complete genome sequence of the naphthalene-degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* AN10 (CCUG 29243). *J Bacteriol* 194: 6642-6643.
- Christie-Oleza JA, Fernandez B, Nogales B, Bosch R, Armengaud J (2012).** Proteomic insights into the lifestyle of an environmentally relevant marine bacterium. *ISME J* 6: 124-135.
- Gomila M, Ramirez A, Lalucat J (2007).** Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *Appl Environ Microbiol* 73: 3787-3797.
- Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ (2006).** Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 510-547.
- Mulet M, David Z, Nogales B, Bosch R, Lalucat J, García-Valdés E (2011).** *Pseudomonas* diversity in crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the Prestige oil spill. *Appl Environ Microbiol* 77: 1076-1085.
- Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E (2010).** DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* 12: 1513-1530.
- Nogales B, Lanfranconi MP, Piña-Villalonga JM, Bosch R (2011).** Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 35: 275-298.
- Richter M, Rosselló-Móra R (2009).** Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 19126-19131.
- Rosselló-Móra R, Lucio M, Peña A, Brito-Echeverría J, López-López A, Valens-Vadell M, Frommberger M, Antón J, Schmitt-Kopplin P (2008).** Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *ISME J* 2: 242-253.
- Rosselló-Móra R (2012).** Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories. *Environ Microbiol* 14: 318-334.
- Suárez-Suárez A, López-López A, Tovar-Sánchez A, Yarla P, Orfila A, Terrados J, Arnds J, Marqués S, Niemann H, Schmitt-Kopplin P, Amman R, Rosselló-Móra R (2011).** Response of sulfate-reducing bacteria to an artificial oil-spill in a coastal marine sediment. *Environ Microbiol* 13: 1488-1499.
- Tamames J y Rosselló-Móra R (2012).** On the fitness of microbial taxonomy. *Trends Microbiol*. 20: 514-516.
- Yarla P, Ludwig W, Euzéby J, Amann R, Schleifer K-H, Glöckner FO, Rosselló-Móra R. (2010).** Update of the All-Species Living-Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *System Appl Microbiol* 33: 291-299.