

Nuevas bacterias, nuevas metodologías, nuevos servicios: la I+D en la CECT

David R. Arahál, Rosa Aznar, María J. Pujalte y Esperanza Garay.

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia

Cuando surgieron las primeras colecciones de cultivos microbianos con vocación de servicio público hace ya más de 100 años, quedaba muy claro su papel como soportes para el avance de la Ciencia y muy en particular la Microbiología. Hoy en día hay más de 600 colecciones registradas en el *Word Data Centre for Microorganisms* (www.wfcc.info/ccinfo/statistics/) repartidas en 71 países, y que difieren sustancialmente en cuanto al tipo de financiación, el campo de especialización o los servicios que ofrecen. Entre ellas un número relativamente pequeño puede considerarse un Centro de Recursos Biológicos según la definición de la OCDE (www.wfcc.info/pdf/OECD_Centres.pdf), que añade varios requisitos respecto a la labor tradicional de las Colecciones de Cultivo. Los más importantes serían el operar conforme a estándares de calidad y el llevar a cabo I+D sobre sus propios fondos.

Los más de 50 años de historia de la CECT y su trayectoria deberían ser motivo de reconocimiento para todas las personas vinculadas a ella de un modo u otro. Sus esfuerzos por alcanzar una sostenibilidad y un reconocimiento internacional como infraestructura no han acabado pero van por buen camino. Como ya se ha dicho la producción científica propia es una parte necesaria y reconocida en ese objetivo general desde hace más de dos décadas pero aquí nos detendremos en la etapa más reciente presentando las líneas que conforman la investigación actual en la Colección Española de Cultivos Tipo a través de los proyectos de I+D que han sido financiados.

¡DESCUBRIENDO BACTERIAS EN LA PLAYA DE LA MALVARROSA!

Es frecuente topar con titulares de medios públicos que anuncian descubrimientos de nuevas bacterias, algunas de lo más insólito (extraterrestres o con millones de años de antigüedad por ejemplo). En realidad, descubrir nuevas bacterias (y arqueas) es relativamente fácil teniendo en cuenta que apenas hemos catalogado una mínima fracción de la diversidad total que existe. Para un taxónomo de

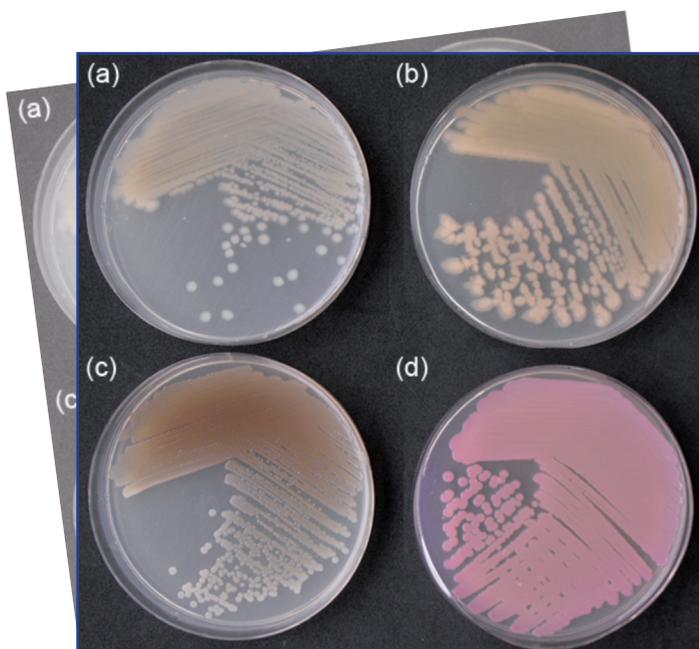


De izquierda a derecha, Rosa Aznar, María J. Pujalte, Eva Tarazona, David R. Arahál, Teresa Lucena, M. Amparo Ruvira, M. Carmen Macián y Esperanza Garay.

procariotas la meta no es sólo descubrir, sino describir bien aquello que considera nuevo. Además no puede distraerse en publicar sus resultados ya que otro grupo podría adelantarse en el hallazgo.

En el proyecto TAXPROMAR (Taxonomía, filogenia y conservación de bacterias marinas –CGL2005-02292/BOS) el titular sensacionalista podría ser el que figura arriba y no se aleja nada de la finalidad real: incrementar nuestro conocimiento de la diversidad bacteriana existente en el medio marino por medio del aislamiento, cultivo en condiciones óptimas, caracterización polifásica y conservación de cepas bacterianas de agua marina de la costa mediterránea española.

Con una estrategia encaminada a minimizar la complejidad y el coste de los muestreos (sólo hubo uno a nivel de superficie) y las condiciones de cultivo (bastante convencionales para heterótrofos), pero poniendo más hincapié en revelar lo más novedoso de forma eficiente, la fase de descubrimiento terminó de forma muy exitosa: más del 10% de las cepas aisladas garantizaban suficiente novedad en base



Cultivos de *Photobacterium* spp. en placas de Luminous Medium (28 °C, 48 h): *P. rosenbergii* CECT 7644^T (a), *P. halotolerans* CECT 5860^T (b), *P. aphoticum* CECT 7614^T (c) y *P. ganghwense* CECT 7641^T (d). Se aprecian los pigmentos difusibles de *P. aphoticum* (marrón) y *P. ganghwense* (rosa).

a su secuencia parcial de 16S rRNA como para considerarlas, al menos, nuevas especies. A ellas pudimos añadir cepas procedentes de muestreos más antiguos ejemplarizando la importancia de conservar y usar recursos microbianos.

Como ya hemos dicho no basta con descubrir sino que hay que describir y difundir, lo que exige bastante más dedicación y esfuerzo, pero también esta fase se ha dado bien. Lo atestiguan 4 nuevos géneros y 13 nuevas especies ya publicados (y aún hay algunos más en curso) pertenecientes a las alfaproteobacterias (*Rhodobacteraceae*), gammaproteobacterias (*Vibrionaceae* y *Pseudomonadaceae*) y bacteroidetes (*Flavobacteriaceae*).

Por su parte TAXPROMAR2010 (CGL2010-18134/BOS) da continuidad al trabajo anterior introduciendo como elemento de estudio el análisis de secuencias génicas multi-locus (MLSA) para la definición de especies entre las cepas objeto de estudio pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, concretamente a los clados de las especies *V. mediterranei*, *V. scophthalmi*-*V. ichthyoenteri* y *V. splendidus*, ampliamente representados en la colección de cepas obtenidas de ambientes relacionados con la acuicultura marina del Mediterráneo en proyectos previos. Además contempla la utilización de datos genómicos obtenidos por secuenciación masiva para afinar mejor estas relaciones en grupos concretos de cepas, una aproximación aún poco frecuente pero que inevitablemente crecerá en los próximos años.

EL ARCA DE NOÉ PARA MICROORGANISMOS

EMbaRC (*European Consortium of Microbial Resource Centres* –FP7-228310) es un proyecto financiado por el Séptimo Programa Marco de la Unión Europea dentro del apartado de Infraestructuras, que ha tenido como objetivos mejorar, coordinar y validar las prestaciones que los Centros de Recursos Microbianos participantes prestan a los investigadores de Europa y del resto del mundo tanto en el sector público como privado. Por su tipología, (I3, *Integrating Activities*) comprende actividades de coordinación, acceso transnacional, e investigación.

En el capítulo de investigación, EMbaRC (www.embarc.eu) ha contribuido al desarrollo de nuevos métodos de conservación de cepas y a la creación de una red Europea de Bancos de DNA microbiano (www.microdnabank.eu). Gracias a los elementos de coordinación también se ha mejorado en aspectos tan importantes como la autenticación de microorganismos o la validez de los datos asociados a las cepas. Otro bloque de objetivos de investigación ha sido la puesta a punto de nuevas técnicas de identificación de especies y de escrutinio masivo de enzimas de interés industrial. Además de las publicaciones derivadas de estos trabajos conviene destacar los recursos ofrecidos a la comunidad científica, como el portal para identificación de levaduras YeastIP (<http://genome.jouy.inra.fr/yeastip>) o la base de datos de perfiles MALDI-TOF de bacterias que puede solicitarse escribiendo a maldi_embarc@cect.org.

EL FUEGO DE PROMETEO

En la mitología griega Prometeo es considerado el protector de la civilización humana por haber introducido el fuego entre los mortales dándoles una antorcha encendida en el Olimpo. Éste es el nombre que lleva el Programa para grupos de investigación de excelencia de la Generalitat Valenciana y a cuya financiación hemos tenido acceso en 2012 (PROMETEO/2012/040). Bajo el título «Exploración de la diversidad microbiana y de su potencial biotecnológico» sirve de respaldo a los trabajos con bacterias marinas ya descritos, así como a nuevos estudios en el campo agroalimentario que se desarrollan dentro de otro proyecto, μ -Andes (*Microbiota of Andean Food: tradition for healthy products* –FP7-247650), cuyo objetivo es explorar la diversidad de las poblaciones de bacterias lácticas de productos tradicionales fermentados de los Andes, y la búsqueda de nuevas cepas con potencial biotecnológico.

OTROS PROYECTOS Y COLABORACIONES

La limitación de espacio impide hablar de peticiones en fase de evaluación o de otros proyectos concedidos aunque menos relacionados con el tema de este monográfico, pero al menos queremos resaltar el papel de las colaboraciones que sin contar con una financiación específica salen adelante

con éxito. Son muchos los grupos e instituciones con las que hemos colaborado y dan cuenta de ello las publicaciones compartidas. Entre ellas resaltamos una en la que tenemos un papel modesto pero cuyo esfuerzo conjunto consideramos de gran importancia para la comunidad científica. Se trata de la iniciativa S.O.S. (*Sequencing the «Orphan» Species*) dentro del proyecto LTP (*All-Species Living Tree Project*) y que persigue rellenar los huecos que hay en el repertorio de secuencias públicas de calidad del gen 16S rRNA de todas las bacterias y arqueas con estándar en nomenclatura.

BIBLIOGRAFÍA RECIENTE

- Arahal DR, Sánchez E, Macián MC, Garay E. (2008).** Value of *recL* sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family «*Leuconostocaceae*». *Int Microbiol* 11: 33-39.
- Cuesta G, Soler A, Alonso JL, Ruvira MA, Lucena T, Arahal DR, Goodfellow M.** *Pseudonocardia hispaniensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from industrial wastewater activated sludge. *Antonie Van Leeuwenhoek* (en prensa, doi:10.1007/s10482-012-9792-1).
- De la Haba RR, Arahal DR, Márquez MC, Ventosa A. (2010).** Phylogenetic relationships within the family *Halomonadaceae* based on comparative 23S and 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 737-748.
- Gómez-Gil B, Fajer-Ávila R, Pascual J, Macián MC, Pujalte MJ, Garay E, Roque A. (2008).** *Vibrio sinaloensis* sp. nov., isolated from the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1621-1624.
- Janssens D, Arahal DR, Bizet C, Garay E. (2010).** The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. *Res Microbiol* 161: 422-429.
- Lucena T, Pascual J, Garay E, Arahal DR, Macián MC, Pujalte MJ. (2010).** *Halieta mediterranea* sp. nov., a marine gammaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1844-1848.
- Lucena T, Pascual J, Giordano A, Gambacorta A, Garay E, Arahal DR, Macián MC, Pujalte MJ. (2010).** *Euzebyella saccharophila* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family *Flavobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2871-2876.
- Lucena T, Pujalte MJ, Ruvira MA, Garay E, Macián MC, Arahal DR. (2012).** *Tropicibacter multivorans* sp. nov., an aerobic alphaproteobacterium isolated from surface seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 844-848.
- Lucena T, Ruvira MA, Arahal DR, Macián MC, Pujalte MJ.** *Vibrio aestivus* sp. nov. and *Vibrio quintilis* sp. nov., related to *Marisflavi* and *Gazogenes* clades, respectively. *Syst Appl Microbiol* 35: 427-431
- Lucena T, Ruvira MA, Garay E, Macián MC, Arahal DR, Pujalte MJ.** *Actibacterium mucosum* gen. nov., sp. nov., a new marine Alphaproteobacterium from Mediterranean seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 2858-2864.
- Lucena T, Ruvira MA, Pascual J, Garay E, Macián MC, Arahal DR, Pujalte MJ. (2011).** *Photobacterium aphoticum* sp. nov., isolated from coastal water. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 1579-1584.
- Martínez-Blanch JF, Sánchez G, Garay E, Aznar R. (2009).** Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int J Food Microbiol* 135: 15-21.
- Martínez-Blanch JF, Sánchez G, Garay E, Aznar R. (2010).** Evaluation of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Bacillus cereus* group spores in food. *J Food Prot* 73: 1480-1485.
- Martínez-Blanch JF, Sánchez G, Garay E, Aznar R. (2011).** Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 697-709.
- Martínez-Blanch JF, Sánchez G, Garay E, Aznar R. (2011).** Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* in food by RT-qPCR. *Eur Food Res Tech* 232: 951-955.
- Oggerin M, Arahal DR, Rubio V, Marín I. (2009).** Identification of *Beijerinckia fluminensis* strains CIP 106281^T and UQM 1685^T as *Rhizobium radiobacter* strains, and proposal of *Beijerinckia doebereineriae* sp. nov. to accommodate *Beijerinckia fluminensis* LMG 2819. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2323-2328.
- Oren A, Arahal DR, Ventosa A. (2009).** Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 637-642.
- Pascual J, Lucena T, Ruvira MA, Giordano A, Gambacorta A, Garay E, Arahal DR, Pujalte MJ, Macián MC. (2012).** *Pseudomonas litoralis* sp. nov., isolated from Mediterranean seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 438-444.
- Pascual J, Macián MC, Arahal DR, Garay E, Pujalte MJ. (2009).** Description of *Enterovibrio nigricans* sp. nov., reclassification of *Vibrio calviensis* as *Enterovibrio calviensis* comb. nov. and emended description of the genus *Enterovibrio* Thompson et al. 2002. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 698-704.
- Pascual J, Macián MC, Arahal DR, Garay E, Pujalte MJ. (2010).** Multi-locus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 154-165.
- Pinhassi J, Pujalte MJ, Pascual J, González JM, Lekunberri I, Pedrós-Alió C, Arahal DR. (2009).** *Bermanella marisrubri* gen. nov., sp. nov., a genome-sequenced gammaproteobacterium from the Red Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:373-377.

TESIS DOCTORALES

- Elizaquível Bárcenas P. (2009).** Detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en alimentos vegetales mediante PCR a tiempo real. Dirección: Aznar R.
- Lucena Reyes T. (2012).** Biodiversidad procaríota marina: descripción de nuevos taxones cultivables. Dirección: Arahal DR, Pujalte MJ y Macián MC.
- Martínez Blanch JF. (2008).** Métodos rápidos para el control de *Bacillus cereus* en alimentos. Dirección: Garay E, Aznar R y Uruburu F.
- Nácher Vázquez M. (En curso).** Estudio de la producción de exopolisacáridos por bacterias lácticas y su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales. Dirección: López García P y Aznar R.
- Pascual Martínez FJ. (2010).** Taxonomía molecular del clado central del género *Vibrio* y otras *Vibrionaceae*. Dirección: Pujalte MJ, Arahal DR y Macián MC.
- Ruvira Garrigues MA. (En curso).** Autenticación de cepas de la CECT mediante MALDI-TOF y GC FAME. Dirección: Arahal DR.