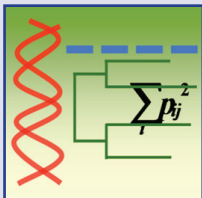


Grupo de genética de poblaciones bacterianas y filogenia molecular



M.^a Carmen Fusté y José Gaspar Lorén

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona
mcfuste@ub.edu

www.ub.edu/microfar/webcata/grupscast/welcome2.htm



Miembros del grupo de investigación (de izquierda a derecha): José Gaspar Lorén, Vicenta Albarral, M.^o Carmen Fusté, Maribel Farfán y Ariadna Sanglas.

cuencias alélicas de varios genes o «loci», y trata de explicar esta variabilidad en términos de mutación, selección, recombinación genética, etc. El análisis estadístico de estas frecuencias permite establecer modelos de evolución, que nos ayudan a entender y predecir el pasado y el presente del flujo génico en la población.

Los estudios sobre genética de poblaciones bacterianas se iniciaron en 1973 por parte de Milkman y más tarde en 1980 por Selander y colaboradores, que aplicaron la técnica estándar en la genética de poblaciones eucariotas, la electroforesis de enzimas multilocus o MLEE, a *Escherichia coli*. Durante esta década el propio Selander y otros autores estudiaron, utilizando esta metodología, la diversidad de varias especies bacterianas, principalmente patógenas. En la mayoría de estas poblaciones bacterianas se pudo detectar la existencia de un fuerte desequilibrio de ligamiento en los loci analizados. Este hecho condujo al establecimiento del paradigma clonal en las poblaciones bacterianas: la existencia de un fuerte desequilibrio de ligamiento implica que los fenómenos de recombinación son inexistentes o suceden con una frecuencia muy baja. Al faltar un mecanismo que homogenice la variación, las bacterias, de reproducción estrictamente asexual, divergirán continuamente como linajes independientes formados por individuos prácticamente idénticos. En 1993, John Maynard Smith y colaboradores publican un trabajo en el que ponen en duda la generalización del concepto clonal a todas las poblaciones bacterianas. La influencia de los autores y la consistencia del trabajo hicieron surgir las primeras dudas acerca del paradigma clonal.

La búsqueda de métodos de análisis más precisos y reproducibles culmina hacia 1998, cuando Maiden y colaboradores introducen el tipado mediante secuenciación multilocus (MLST). El enfoque MLST se basa en idénticos presupuestos que la MLEE. Para cada cepa de un conjunto lo más amplio posible y que sea representativo de la diversidad de la especie estudiada se secuencian fragmentos de distintos genes (5-7). Para cada uno de los loci estudiados, toda secuencia distinta (incluso una sola base) constituye

El grupo de investigación de Genética de Poblaciones Bacterianas y Filogenia Molecular forma parte del Departamento de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Universitat de Barcelona. Desde el año 1996 el grupo ha sido reconocido como Grupo de Investigación de Excelencia por la Generalitat de Catalunya. También forma parte del Institut de Recerca de la Biodiversitat (IrBio) de la Universitat de Barcelona.

Basándose en la experiencia adquirida previamente por los doctores Lorén y Fusté en el estudio de la estructura genética de poblaciones bacterianas de *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*, en el año 1996 se formó este grupo de investigación. Aplicando la técnica de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), y más tarde la secuenciación de genes (MLST y MLSA), se estudiaron diferentes poblaciones de bacterias patógenas y de interés industrial, como *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas stutzeri* y *Aeromonas* sp.

La genética de poblaciones estudia la variabilidad genética de las poblaciones bacterianas a partir de las fre-

un alelo diferente. Los alelos correspondientes a todos los loci estudiados presentes en las distintas cepas constituyen su secuencia tipo o ST («sequence type»), perfil alélico o genotipo. Al contrario que la MLEE, los datos obtenidos mediante MLST son totalmente comparables de un laboratorio a otro, fácilmente validados y almacenados electrónicamente, pudiendo crearse bases de datos públicas para cada especie bacteriana estudiada.

En la actualidad el trabajo de nuestro grupo se centra en la taxonomía, filogenia molecular y genética de poblaciones del género *Aeromonas*. Este género constituye un modelo idóneo para este estudio ya que es un grupo de bacterias que incluye formas de vida libre, patógenos oportunistas y primarios, de una gran ubicuidad, con especies definidas mediante métodos clásicos y moleculares y con una taxonomía compleja y aún no del todo resuelta. Los trabajos con este género bacteriano se iniciaron hace algo más de una década con un estudio de caracterización fenotípica de cepas aisladas de moluscos y aguas. Fruto de este estudio fue la constatación de la presencia de distintas especies de *Aeromonas* en estos hábitats y la descripción de dos nuevas especies: *A. molluscorum* y *A. bivalvium*. De la colección de cepas obtenida, se seleccionaron las pertenecientes al «complejo de especies *Aeromonas hydrophila*» (*A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. popoffii*), un grupo de *Aeromonas* en el que es difícil establecer de manera clara la separación entre especies a nivel fenotípico y molecular, y se llevó a cabo un estudio de genética de poblaciones con la técnica de MLEE. Los resultados mostraron que cinco loci son suficientes para una excelente separación de las especies de este grupo.

Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación nos planteamos llevar a cabo un estudio filogenético mediante la secuenciación de varios genes, genes esenciales o conservados («housekeeping genes») y otros, como el *flaA* que codifica la flagelina A del filamento del flagelo polar. La secuenciación de la región universal (UT) del gen que codifica la chaperona Cpn60 ha demostrado ser una herramienta molecular útil para asignar un nuevo aislado bacteriano a una especie de este género. El gen de la malato deshidrogenasa (*mdh*) ha permitido una buena separación de las especies de *Aeromonas*. Otro gen analizado, el gen *flaA*, al tener una región central altamente variable, no fue útil para la filogenia pero el análisis de sus secuencias detectó la existencia de al menos dos tipos de flagelina distintos que han evolucionado separadamente dentro de este género. Además, los resultados obtenidos con las secuencias de los genes analizados, han permitido la reclasificación de una cepa de *A. hydrophila* CIP 57.50, que se utiliza como cepa control de ensayos de calidad, en *A. salmonicida* CIP 57.50, y la asignación del nombre de especie *A. diversa* para las cepas que anteriormente se denominaban *Aeromonas* sp. Grupo 501.

Más recientemente, el análisis de genética de poblaciones realizado a partir de las secuencias correspondientes a 6 genes conservados (*cpn60*, *dnaJ*, *gyrB*, *mdh*, *recA*, *rpoD*) de 128 cepas representativas de las especies del «complejo *A. hydrophila*», ha puesto de manifiesto que se trata de

un grupo no monofilético, ya que precisamente la especie que da nombre al grupo diverge filogenéticamente de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*. Este estudio ha desvelado que mientras que *A. salmonicida* constituye un grupo homogéneo de cepas (a pesar de estar constituido por 5 subespecies), en *A. hydrophila* y *A. bestiarum* se separan distintos grupos. Este estudio se ha completado con una serie de ensayos para medir la adherencia, invasión y citotoxicidad en cultivos celulares.

En la actualidad el grupo está interesado en el estudio de los procesos de especiación y en nuevas aproximaciones al estudio de la diversidad y la evolución bacteriana, como la secuenciación masiva de genomas para realizar un estudio filogenómico que permita completar los estudios filogenéticos y determinar el pangenoma de este género. La secuenciación de estos genomas aportará también nuevos datos sobre los factores de virulencia implicados en las infecciones producidas por *Aeromonas*, que podrán ser útiles para la prevención y control de posibles infecciones.

PUBLICACIONES RECIENTES

- Fusté MC, Farfán M, Miñana-Galbis D, Albarral V, Sanglas A, Lorén JG. (2012).** Population Genetics of the «*Aeromonas hydrophila* Species Complex». In Studies in Population Genetics, pp. 39-54. InTech - Open Access Publisher. Croatia. ISBN 978-953-51-0588-6.
- Marqués AM, Burgos-Díaz C, Aranda FJ, Teruel JA, Manresa A, Ortiz A y Farfán M. (2012).** *Sphingobacterium detergens* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol. 62:3036-3041
- Garreta A, Carpena X, Busquets M, Fusté MC, Fita I, Manresa M. (2011).** Crystallization and resolution of the lipoxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 and phylogenetic study of the subfamilies of the lipoxygenases. In Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, pp. 247-273. Transworld Research Network. India. ISBN 978-81-7895-528-5.
- Farfán M, Miñana-Galbis D, Garreta A, Lorén JG, Fusté MC. (2010).** Malate dehydrogenase: A useful phylogenetic marker for the genus *Aeromonas*. Syst Appl Microbiol. 33: 427-432.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Lorén JG, Fusté MC. (2010).** The reference strain *Aeromonas hydrophila* CIP 57.50 should be reclassified as *Aeromonas salmonicida* CIP 57.50. Int J Syst Evol Microbiol. 60: 715-717.
- Lorén JG, Farfán M, Miñana-Galbis D, Fusté MC. (2010).** Prediction of whole-genome DNA G+C content within the genus *Aeromonas* based on housekeeping gene sequences. Syst Appl Microbiol. 33: 237-242.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Lorén JG, Fusté MC. (2010).** Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. Syst Appl Microbiol. 33: 15-19.
- Farfán M, Miñana-Galbis D, Fusté MC, Lorén JG. (2009).** Divergent evolution and purifying selection of the *flaA* gene sequences in *Aeromonas*. Biol Direct. 4: 23.
- Miñana-Galbis D, Urbizu-Serrano A, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG. (2009).** Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. Int J Syst Evol Microbiol. 59: 1976-1983.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG. (2007).** *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. Int J Syst Evol Microbiol. 57: 582-587.