

as a possible basal medium for laccase production. *Env. Eng. Manag.* 12: 3037-3044.

León-Palmero E, Joglar V, Alvarez PA, Martín-Platero A, Llamas I y Reche I. (2018). Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. *PLoS One* (13 e0196178).

Lluque R, Béjar V, Quesada E y Llamas I. (2014). Diversity of halophilic bacteria isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain) *Can. J. Microbiol* 60:1-8.

Queriaghli N, Bejar V, Quesada E y Martínez-Checa F. (2013). Molecular ecology techniques reveal both spatial and temporal variations in the diversity of archaeal communities within the athalassohaline environment of Rambla Salada, Spain. 2013. *Microb. Ecol.* 66: 297-311.

Queriaghli N, González-Domenech C, Martínez-Checa F, Muyzer G, Ventosa A y Quesada E, Béjar V. (2014). Diversity and distribution of *Halomonas* in Rambla Salada, a hypersaline environment

in the Southeast of Spain. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87:460-474.

Quesada E, Tahririou A y Llamas I. (2013). Genetic and phenotypic analysis of the *gacS/gacA* system in the moderate halophile *Halomonas anticariensis*. 2013. *Microbiology SGM* 159:462-474.

Siles JA, Pérez-Mendoza D, Ibañez JA, Scervino JM, Ocampo JA, García-Romera I y Sampedro I. (2014). Assessing the impact of biotransformed dry olive residue application to soil: Effects on enzyme activities and fungal community. *Int. Biod. Biodeg.* 89: 15-22.

Tahririou A, Quesada E y Llamas I. (2013). Draft genome sequence of the moderately halophilic gamma proteobacterium *Halomonas anticariensis* FP35^T *Genome A* doi:10.1128/genomeA.00497-13

Tahririou A, Schwab M, Quesada E y Llamas I. (2013). Quorum sensing in some representative species of *Halomonadaceae*. *Life* 3:260-275.

Torres M, Reina JC, Fuentes-Monteverde JC, Fernández G, Rodríguez J, Jiménez C y Llamas I. (2018). AHL-lactonase expression in three marine emerging pathogenic *Vibrio* spp. reduces virulence and mortality in brine shrimp (*Artemia salina*) and manila clam (*Venerupis philippinarum*). *PLoS ONE* 13: e0195176.

Torres M, Romero M, Prado S, Dubert J, Tahririou A, Otero A y Llamas I. (2013). N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve larval cultures. *Microb. Res.* 66: 297-311.

Torres M, Rubio Portillo E, Antón J, Ramos-Esplá AA, Quesada E y Llamas I. (2016). Selection of the n-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alioteromonas stellipolaris* PQQ-42 and its potential for biocontrol in aquaculture. *Front. Microbiol.* 7:1-13.

Torres M, Uroz S, Salto R, Fauchery L, Quesada E y Llamas I. (2017). Hqja, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family. *Sci. Rep.* 7:1-15.

Filogenia molecular y procesos de diversificación en *Aeromonas*

Maribel Farfán, Vicenta Albarral, José Gaspar Lorén y M^a Carmen Fusté



Grupo de Genética de Poblaciones Bacterianas y Filogenia Molecular. Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente, Sección de Microbiología, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Barcelona



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

Nuestro grupo de investigación se formó en el año 1996, basándose en la experiencia adquirida por los doctores Lorén y Fusté

en el estudio de la estructura genética de poblaciones bacterianas de *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*.

Mediante la aplicación de la técnica de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y, más tarde, de la secuenciación de genes

multilocus (MLST, MLSA) se estudiaron diferentes poblaciones de bacterias patógenas y de interés industrial, como *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas stutzeri* y *Aeromonas* sp.

Hace más de una década que el estudio de la taxonomía, la filogenia molecular y la genética de poblaciones del género *Aeromonas* constituye una de las principales líneas de investigación del grupo. Este género bacteriano es 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 *Aeromonas* se iniciaron mediante un estudio de caracterización fenotípica de cepas aisladas de moluscos y aguas. Fruto de este análisis 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 pobla-

ciones 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 moleculares nos planteamos llevar a cabo un estudio filogenético mediante la secuenciación de varios genes esenciales o conservados ("housekeeping genes"). Los resultados obtenidos con las secuencias de los genes analizados han permitido la asignación del nombre de especie *A. diversa* para las cepas anteriormente denominadas *Aeromonas* sp. Grupo 501 y las reclasificaciones de una cepa control de ensayos de calidad (*A. hydrophila* CIP 57.50 en *A. salmonicida* CIP 57.50) y de *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes* dentro de *A. caviae*. Hemos secuenciado también los genomas completos de dos especies de *Aeromonas*: *A. molluscorum* y *A. diversa*.

Más recientemente, el estudio 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. salmo-*

nicida. 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 trabajo se ha completado con un estudio para establecer la posible existencia de genes implicados en la virulencia de *Aeromonas* y la determinación de la capacidad de adherencia, invasión y citotoxicidad de estas cepas en cultivos celulares. El análisis ha permitido demostrar la presencia de diversos genes de virulencia, tanto en cepas medioambientales como en otras de origen clínico, y su capacidad para adherirse e invadir los cultivos celulares (Fig. 1).

Para evaluar si el gen *recA* podría ser un buen marcador molecular del género *Aeromonas*, se realizó un estudio filogenético con 221 cepas representativas de todas las especies de *Aeromonas*. En este trabajo se identificó la presencia de un fragmento recombinante en 4 cepas de *Aeromonas bestiarum* de una longitud total de 248 pares de bases, que afectaba a la región terminal del gen *recA* y al inicio del gen *recX*. Se pudo determinar que el posible origen de la región recombinante sería una cepa de *Aeromonas eucrenophila*. Todos los fragmentos eran prácticamente idénticos, diferían en pocos nucleótidos, indicando que era una adquisición relativamente reciente.

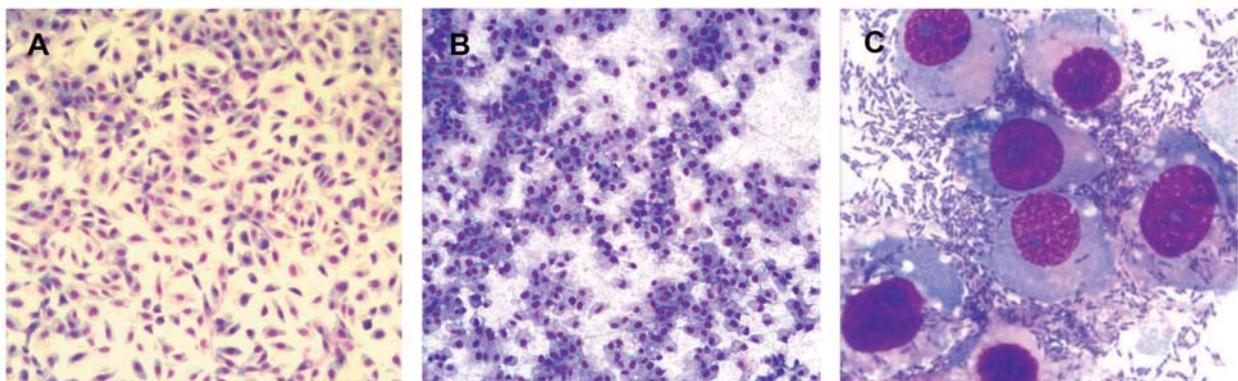


Figura 1. Micrografías de células monocapa de Caco-2: A) células no infectadas (control, x10), B) y C) células infectadas con *Aeromonas hydrophila* CECT 5174 (x10 y x100, respectivamente).

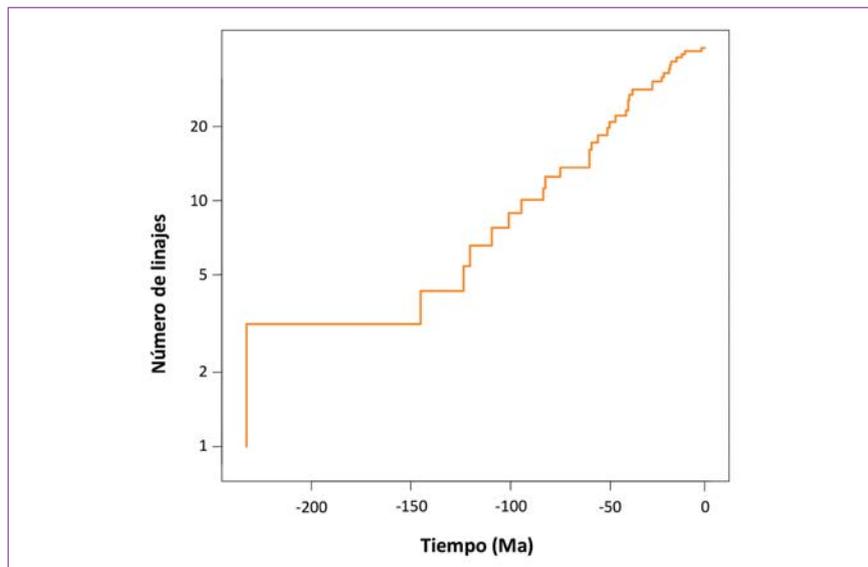


Figura 2. Análisis de diversificación del género *Aeromonas*. El gráfico semilogarítmico muestra la aparición de linajes a lo largo del tiempo (lineages-through-time o LTT plot) a partir del cronograma construido.

En la actualidad el grupo está trabajando en el estudio de los procesos de diversificación y especiación y en nuevas aproximaciones al estudio de la diversidad y la evolución bacteriana. Tradicionalmente la datación, los modelos de diversificación y las tasas de especiación y extinción de una población se han determinado a partir del análisis del registro fósil, o indirectamente a partir de eventos geofísicos. Sin embargo, el registro fósil no siempre está disponible para todas las especies, está restringido a los últimos 600 millones de años, y en el caso de los procariontes es prácticamente inexistente. La reciente expansión de las filogenias moleculares ha proporcionado la posibilidad de solventar este problema. Desde los primeros modelos propuestos por Nee y colaboradores en el año 1994, se han desarrollado diversos métodos para estimar los tiempos de divergencia y los modelos de diversificación de un linaje a partir de datos moleculares, más concretamente a partir de filogenias reconstruidas con taxones contemporáneos.

Nuestros trabajos más recientes se basan en utilizar como modelo el género *Aeromonas* para estimar el origen y los tiempos de divergencia de los clados principales y determinar el modelo y la tasa de diversificación de este género. A partir del árbol ultramétrico datado (cronograma), construido por inferencia bayesiana a partir de las secuencias concatenadas de dos o más genes conservados, se puede estimar el origen de este género y realizar el análisis de diversificación. Los resultados obtenidos muestran que *Aeromonas* se habría originado hace aproximadamente 250 Ma (período Pérmico-Triásico) y seguiría un modelo de diversificación constante (Fig. 2). Más recientemente, hemos aplicado un método de delimitación de especies, el llamado "Generalized Mixed Yule Coalescent" o GMYC, a un grupo representativo de cepas de todas las especies de *Aeromonas*. A partir de un árbol filogenético, el método GMYC establece el umbral de divergencia que delimita las especies basándose en el patrón de ramas del árbol, y fija la transición entre el proceso

de especiación (inter-específico) y el de coalescencia (diversificación intra-específica). El análisis ha permitido delimitar claramente las especies de este género, incluso en el caso de los conflictivos complejos de especies de *A. veronii* o *A. media*.

BIBLIOGRAFIA SELECCIONADA DE LOS ÚLTIMOS AÑOS

- Fusté MC, Farfán M, Miñana-Galbis D, Albarral V, Sanglas A y Lorén JG.** (2012). Population Genetics of the "*Aeromonas hydrophila* Species Complex". In *Studies in Population Genetics*, pp. 39-54. InTech. Croatia. ISBN 978-953-51-0588-6.
- Farfán M, Spataro N, Sanglas A, Albarral V, Lorén JG, Bosch E y Fusté MC.** (2013). Draft genome sequence of the *Aeromonas diversa* type strain. *Genome Announcements* 1: e00330-13.
- Spataro N, Farfán M, Albarral V, Sanglas A, Lorén JG, Fusté MC y Bosch E.** (2013). Draft genome sequence of *Aeromonas molluscorum* strain 848T^T, isolated from bivalve molluscs. *Genome Announcements* 1: e00382-13.
- Farfán M, Albarral V, Sanglas A, Lorén JG, Fusté MC.** (2013). The effect of recombination in *Aeromonas*. In *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III*, pp. 179-193. Transworld Research Network. India. ISBN: 978-81-7895-605-3.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Albarral V, Sanglas A, Lorén JG y Fusté MC.** (2013). Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subspecies *anaerogenes*. *Syst Appl Microbiol* 36: 306-308.
- Lorén JG, Farfán M y Fusté MC.** (2014). Molecular phylogenetics and temporal diversification in the genus *Aeromonas* based on the sequences of five housekeeping genes. *PLoS One* 9: e88805.
- Sanglas A, Albarral V, Farfán M, Lorén JG y Fusté MC.** (2016). Direct evidence of recombination in the *recA* gene of *Aeromonas bestiarum*. *Syst Appl Microbiol* 39: 106-114.
- Albarral V, Sanglas A, Palau M, Miñana-Galbis D y Fusté MC.** (2016). Potential pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* complex strains isolated from clinical, food, and environmental sources. *Can J Microbiol* 62: 296-306.
- Sanglas A, Albarral V, Farfán M, Lorén JG y Fusté MC.** (2017). Evolutionary roots and diversification of the genus *Aeromonas*. *Front Microbiol* 8: 127.
- Lorén JG, Farfán M y Fusté MC.** (2018). Species delimitation, phylogenetic relationships and temporal divergence model in the genus *Aeromonas*. *Front Microbiol* doi: 10.3389/fmicb.2018.00770