

**Informe final\* del Proyecto HA013**  
**Actualización de la Colección de Microorganismos de importancia acuática**

**Responsable:** Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala  
**Institución:** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.  
Coordinación de Acuicultura y Manejo Ambiental (Mazatlán, Sinaloa)  
**Dirección:** Av. Sábalo Cerritos s/n Estero del Yugo, Mazatlán, Sin, 82010, México  
**Correo electrónico:** [bruno@ciad.mx](mailto:bruno@ciad.mx)  
**Teléfono, fax** 01(669) 989 8700 ext. 245 o 221  
**Fecha de inicio:** Enero 15, 2010  
**Fecha de término:** Mayo 21, 2013  
**Principales resultados:** Base de datos, Informe final.  
**Forma de citar\*\* el informe final y otros resultados:** Gómez-Gil B. 2013. Actualización de la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. HA013** México D. F.

**Resumen:**

La colección CAIM ya gozó de un proyecto de computarización por parte de la CONABIO (CC007). Durante este proyecto se computarizó la Colección, pero varias de las cepas (261) quedaron incompletas en su identificación. De las 1813 cepas (registros) faltan por identificar 210 (11.6 %) y otros 51 sólo están a nivel de género; además se han adquirido varios nuevos ejemplares. Para poder llevar a cabo la actualización de la base de datos (BIOTICA), uno de los objetivos que no se pudo satisfacer plenamente en la propuesta anterior, es necesario identificar esas cepas. Para cumplir con este objetivo, en la presente propuesta se realizarán secuenciaciones de genes útiles ("housekeeping") para poder llegar a una identificación correcta de las cepas bacterianas faltantes. Debido a que estos genes ya se encuentran secuenciados y disponibles en bases de datos públicas (GenBank), los resultados que se ajusten con una similitud muy elevada (superior al 97-98% para el caso del 16S rARN, por ejemplo), será el criterio para identificar la cepa como perteneciente a esa especie. En caso de que el índice de similitud sea menor, se catalogará como potencial nueva especie y sujeta a posterior análisis. Con estos datos, se actualizará la base de datos para reflejar estas nuevas determinaciones y adicionar las bacterias que se han adquirido recientemente.

- 
- \* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
  - \*\* El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

Informe final

Proyecto HA013.

**Actualización de la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática.**

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

## **Resumen**

Durante el presente proyecto se actualizó la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM) para tener plenamente registradas en una base de datos las 1878 cepas bacterianas que aloja. De estas cepas, 1781 están identificadas a nivel especie y 93 a subespecie y 69 a género. Se tienen 185 diferentes especies registradas de 35 países y de México se tienen 1,405 registros provenientes de ocho estados. Durante este proyecto se actualizó la base de datos a la versión 5.0 del programa Biótica y se incrementaron o cambiaron 106 registros, además, se depuraron varios registros y se identificaron lo más posible varias cepas pendientes.

## Introducción

En México son pocas las colecciones microbiológicas que existen ya que el estudio de microorganismos, en general, ha sido deficiente en nuestro país. En la World Federation for Culture Collections, se tienen registradas 17 colecciones microbianas para México ([http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/col\\_by\\_country/m/52/](http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/col_by_country/m/52/)), de las cuales, 7 o quizá 8 contienen bacterias. De éstas, CAIM es la que aloja un mayor número de cepas, el resto, en total, llegan a 1,632 cepas. De dos colecciones no se aportan datos. Se puede calcular que en México apenas se tienen debidamente preservadas alrededor de 3,500 cepas bacterianas. Como comparación, la American Type Culture Collection tiene 16, Esta colección es la única en México y en Latinoamérica especializada en cepas bacterianas de importancia en el sector acuícola y de las pocas que existen en el mundo. Los primeros registros datan de 1994 para cepas colectadas en México, pero anteriores para cepas que han sido donadas por otras instituciones.

Al ser una colección de organismos vivos, su adecuada conservación es indispensable para mantener la información biológica de este grupo de organismos muy poco estudiados en nuestro país. Además, muchas de estas cepas tiene o pueden tener características importantes para la industria, la investigación científica, e incluso para la salud pública. Debido a esto, considero de suma importancia que se apoye a este tipo de colecciones.

## Antecedentes

La Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM por sus siglas en inglés) se ha dedicado ya desde hace más de diez años a preservar bacterias relevantes para la acuicultura pero considerando también aquellas que tengan un papel importante en los ecosistemas acuáticos. Aunque el interés principal son las especies de la familia Vibrionaceae, también se tienen representantes de otras familias de bacterias.

Mediante el proyecto financiado por la CONABIO CC007 se inició la computarización de la colección. Se registraron 1,787 registros (cepas bacterianas) de las cuales 1,689 tenían una identificación taxonómica a nivel especie (94.5%). Los ejemplares asociados a localidad eran 1,595 (89.2%) ya que varias cepas se adquirieron de otras colecciones en las que nunca se registró su procedencia; esto fue particularmente común para las cepas colectadas hace muchos años. Toda la base de datos está en inglés y disponible a través de la página de internet [www.ciad.mx/caim](http://www.ciad.mx/caim). Debido a que esta es una colección con servicio internacional de venta, intercambio y colaboración, es imprescindible que sea en inglés.

Mediante el proyecto HA013 se pretendió actualizar la base de datos a la versión Biótica 5.0, además de identificar molecularmente las cepas sin identificación o con una identificación no específica. También se comprometió adicionar 26 registros nuevos de varios estados de la república.

## Objetivos

1. Identificación mediante secuenciación de las cepas bacterianas indeterminadas.

2. Actualización de la base de datos BIOTICA 5.0.

## Metodología

Para la identificación mediante secuenciación de las cepas no determinadas o identificadas sólo a nivel género se siguió el esquema descrito abajo y presentado a detalle en el ANEXO I. De éstas cepas ya se tenía el ADN extraído. A partir de éste ADN se amplificó el gen 16S rARN con primers universales (Frank et al. 2008). Los amplicones se enviaron a purificar y secuenciar a Macrogen Inc. en Corea. Una vez obtenidas la secuencias, éstas se compararon con secuencias depositadas en bases de datos en Internet (Ribosomal Database Project II). Se consideró una identificación positiva y confiable a nivel especie, si la secuencia tenía un índice de similitud entre nuestra muestra y la secuencia de una cepa tipo superior al 97-98%. En algunos casos, como el de algunos grupos de la familia Vibrionaceae, los índices de similitud entre las especies es superior, llegando en algunos casos al 99.9% al usar el gen 16S (Kita-tsukamoto et al. 1993). Para estos casos, se amplificó el gen “housekeeping” que codifica para la uridilato kinasa (*pyrH*); así, junto con el 16S se pudo realizar un Multilocus Sequence Analysis (MLSA). Aun que se había planteado amplificar otros genes, esto no fue necesario ya que se obtuvieron identificaciones confiables con estos dos genes. En el caso de que ninguno de éstos genes otorgue un índice de similitud alto, entonces se puede considerar una potencial nueva especie.

Los detalles de la metodología se presentan en el anexo I.

## Resultados y Discusiones

**Objetivo 1.** Identificación mediante secuenciación de las cepas bacterianas indeterminadas.

Los compromisos del proyecto son varios, en el “Estado de la colección” se manifestó que 261 ejemplares se encontraban en el Nivel 3, ejemplares rotulados, montados o preparados, pero no determinados. Para cumplir con el primer objetivo y atendiendo a éste nivel, durante el primer semestre del proyecto, se amplificó el gen 16S rRNA de 195 ejemplares con primers universales (Weisburg *et al.* 1991). Como de algunos ejemplares fue necesarios repetir la secuenciación o incluso obtener toda la secuencia del gen completo (1490 pb) en vez de sólo la primer mitad, en total se realizaron 235 secuenciaciones de las 294 estimadas. Estos amplicones fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc., Corea. Se había propuesto tener un análisis parcial (25%) de las secuencias obtenidas, sin embargo se pudo analizar el total de las secuencias.

Mediante las secuencias obtenidas, se pudieron identificar 175 ejemplares, de éstos, en 150 se llegó a nivel especie y 25 a género. De los ejemplares a los que se pudo llegar a nivel especie (150), sus secuencias correspondientes fueron depositadas en la base de datos pública GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), como fue el compromiso. Este grupo de secuencias recibieron los números de acceso del HM583968 al HM584117 y en uno de los campos se da el crédito a la CONABIO (ejemplo en **Fig. 1**), sin embargo, posteriormente GenBank consideró que este crédito debería ir en artículos y no en la base

de datos, por lo que los suprimió. Con éstas secuencias se construyó un dendrograma (**Fig. 2**) que sirvió de ayuda para su identificación.

De los 25 ejemplares a lo que sólo se llegó a nivel de género, al menos 13 son potenciales nuevas especies pues el porcentaje de similitud con especies conocidas es inferior a 98%. El resto de los ejemplares que no han sido identificados a especie, presentaron alta similitud (>99.0%) con varias especies, principalmente del clado central del género *Vibrio*. Para resolver estas identificaciones, como se planteó en el anteproyecto, se realizará la amplificación y secuenciación de genes “housekeeping”. Se secuenció el gen *pyrH* (urenilato quinasa; Thompson *et al.* 2007) de 49 cepas en las que no era posible llegar a una identificación con el gen 16S ribosomal por su cercanía filogenética. Estas secuencias se subieron a GenBank con los números de acceso JF739403-JF739443.

De los 1878 registros, se tienen identificados 1,781 a nivel especie (94.79%) y 69 registros a nivel género (5.05%), prácticamente todos estos últimos registros podrían ser nuevas especies pues sus respectivas secuencias del gen 16S ribosomal tienen valores inferiores al límite establecido de 97% (Wayne *et al.* 1987) para delimitar a especies bacterianas. Tres registros no tiene ninguna identificación pues dos de ellos (183 y 813) fueron dados de alta pero no tienen ninguna cepa preservada y uno (857) no pudo ser secuenciado.

Se tienen 185 diferentes especies registradas de 35 países (Tabla 1), 1,405 registros de México (74.69%). La primer cepa fue registrada desde 1930 (no se sabe si ese fue su fecha de colecta) y las última en 2011; la gran mayoría fueron colectadas entre los 1994 y 2005.

## **Objetivo 2.** Actualización de la base de datos BIOTICA.

Se empezó con la actualización de la base de datos, en la cual se hicieron los ajustes necesarios para apegarse al nuevo formato de BIOTICA ver. 5. Hasta el momento se han realizado aproximadamente 218 nuevas determinaciones; para lo cual se dieron de alta tres nuevas clases, cinco órdenes, seis familias, 17 géneros, 31 especies y dos subespecies nuevas. A casi todos estos nuevos taxones se les incluyó la bibliografía correspondiente, la autoridad, el sistema de clasificación y la cita nomenclatural.

Se dieron de baja 39 registros por que las cepas murieron o bien por que eran clones de otros. Se dieron de alta nuevos registros para ocupar los sitios vacíos dejados por los ejemplares dados de baja. Además se integraron 67 registros adicionales para un total de 106 nuevos registros

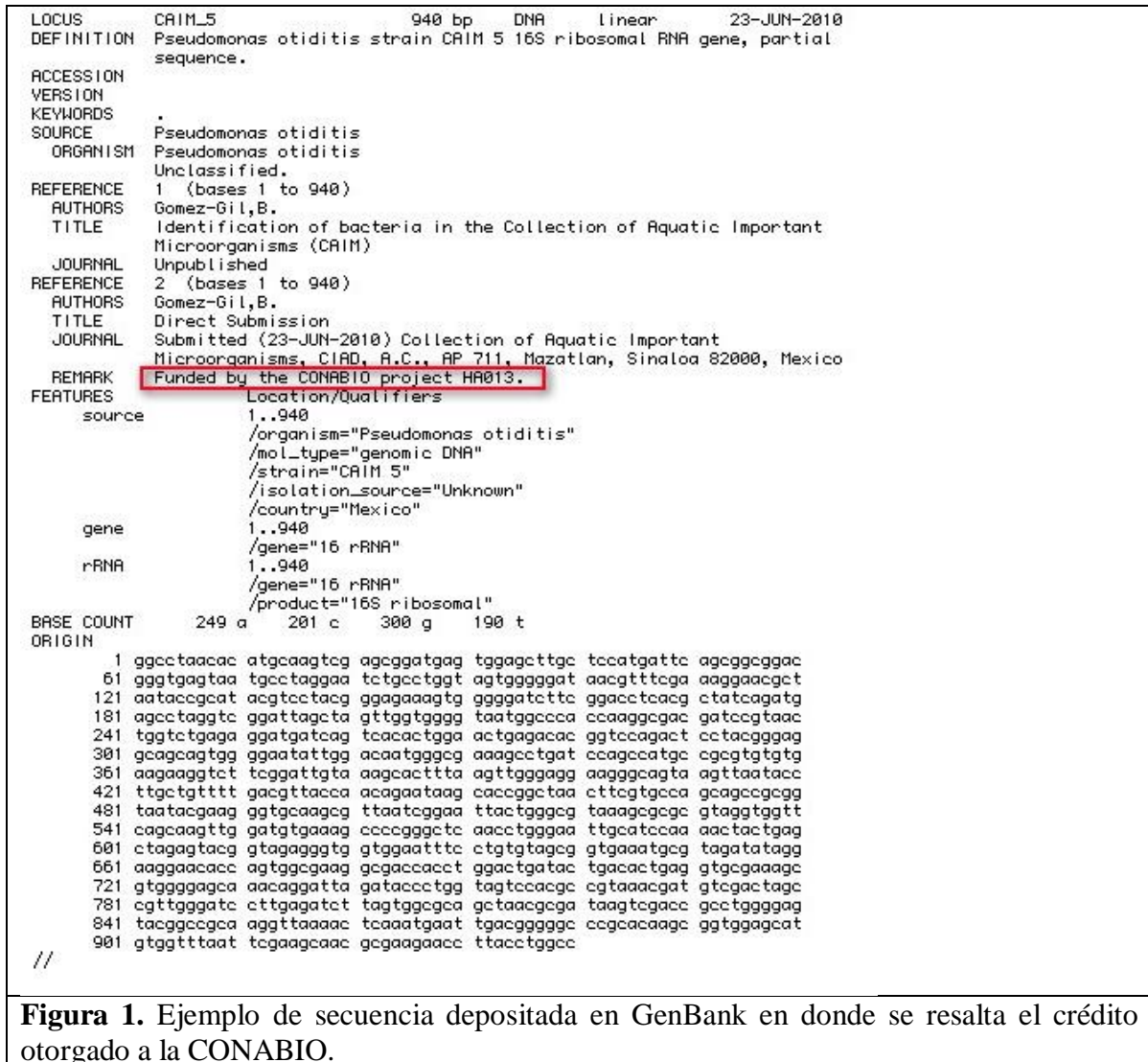
Para algunos ejemplares, se dio de alta su georreferenciación, cuando se pudo conseguir; también se corrigió la bibliografía de algunos ejemplares o se actualizó. Se obtuvieron 97 sitios de los cuales nueve no se pudo conseguir unas coordenadas; de 180 localidades, 143 fueron georreferenciadas. Del total de registros, 1677 estuvieron asociados a una localidad y solo 201 a una localidad no georreferenciada. Se alcanzó un 86% de los ejemplares georreferenciados. Se dieron de alta grupos de colecta y de identificación. De estos nuevos registros, 16 fueron de México (Hidalgo, Sinaloa y Veracruz; Tabla 2). No se consiguieron ejemplares de BCN, BC, Nayarit, Sonora ni Tabasco, pero en cambio se superó con creces el número de registros comprometidos (26 a 106) en este proyecto. No fue posible obtener ejemplares de estos estados por que a la persona que los iba a donar no le fue posible

realizarlo. Se tiene un total de 277 citas bibliográficas y de éstas, 114 están asociadas a un ejemplar y 243 a un taxón.

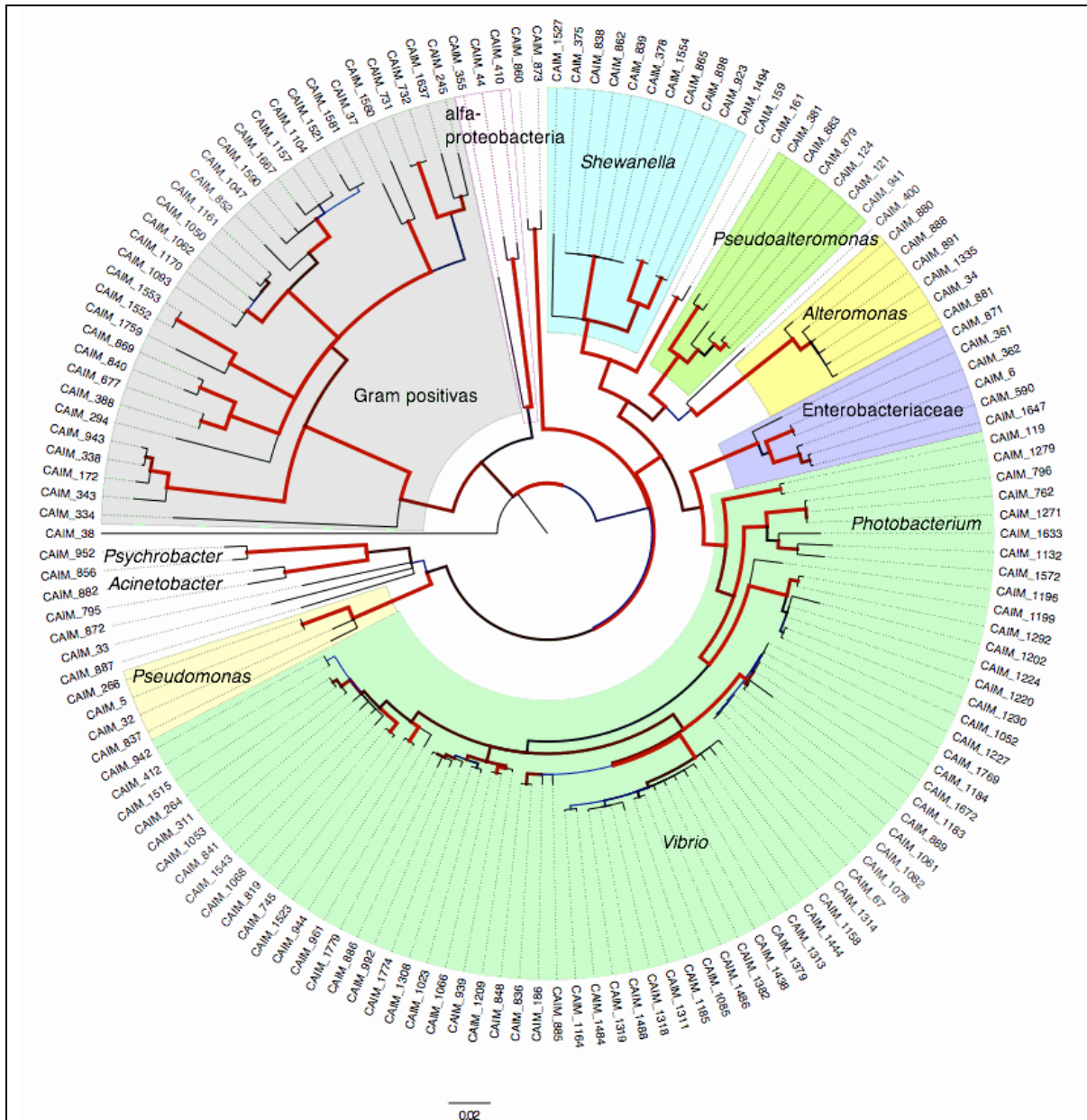
## Conclusiones

- La colección cuenta con 1878 registros (cepas bacterianas).
- Se secuenció el gen 16S ribosomal de 195 cepas bacterianas para un total de 235 secuencias. Se secuenció el gen *pyrH* de 49 cepas para distinguir entre especies muy cercanas.
- Se identificaron a nivel especie 1781 cepas y 69 a género.
- Se tienen registradas 191 diferentes especies bacterianas de 35 países, 1405 cepas de México.
- Durante este proyecto se incrementó el número total de cepas (registros) en 106 y se actualizó la base de datos (Biótica 5.0) con nuevas determinaciones y georreferenciaciones.

## Reporte Final Proyecto HA013



**Figura 1.** Ejemplo de secuencia depositada en GenBank en donde se resalta el crédito otorgado a la CONABIO.



**Figura 2.** Dendrograma generado con secuencias del gen 16S rRNA de los ejemplares no identificados del proyecto HA013. Se destacan los principales géneros encontrados.



## Reporte Final Proyecto HA013

**Tabla 1.** Países de procedencia de las cepas bacterianas en la colección.

<b>País</b>	<b>No. registros</b>	<b>País</b>	<b>No. registros</b>
Argentina	1	India	5
Canada	1	Indonesia	5
Colombia	1	South Korea	5
Egypt	1	Philippines	6
Guatemala	1	Thailand	6
Holland	1	Greece	8
Italy	1	Australia	12
New Caledonia	1	China	12
Papua New Guinea	1	United Kingdom	13
Tanzania	1	France	16
Bangladesh	2	Japan	22
Denmark	2	Belgium	31
Germany	2	USA	46
Taiwan	2	Brazil	52
Ecuador	4	Norway	56
Israel	4	Spain	69
Portugal	4	sin datos	77
Chile	5	México	1405

**Tabla 2.** Procedencia de los registros por estado de México.

<b>Estado</b>	<b>No. cepas</b>
Baja California	38
Baja California Sur	99
Colima	15
Hidalgo	1
Nayarit	122
Sin datos	43
Sinaloa	894
Sonora	191
Veracruz	2

## Literatura citada

- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A. & Olsen, G. J.** (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2461-2470.
- Kita-Tsukamoto, K., Oyaizu, H., Nanba, K. & Simidu, U.** (1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**, 8-19.
- Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Ribeiro Vasconcelos, A. T. & Sawabe, T.** (2007). Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* form distinct species. *Appl Environ Microb* **73**, 4279-4285.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, L., Moore, L. H., Murray, R. G. E., Stackenbrandt, E., Starr, M. P. & Truper, H. G.** (1987). Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J.** (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**, 697-703.