

Presencia de actinobacterias del género *Rubrobacter* en tumbas de la Necrópolis de Carmona

L. Laiz, V. Jurado, E.A. Akatova, J.M. González y C. Saiz-Jimenez

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. Apartado 1052, 41080 Sevilla

La Necrópolis de Carmona fue descubierta a finales del siglo XIX. Está formada por un gran número de tumbas excavadas en la roca, de las que se conocen más de 600 y otras muchas, aún por descubrir. Fue utilizada por los romanos durante los siglos I y II antes de Cristo y es uno de los yacimientos de la Península Ibérica que conservaba mayor número de pinturas, pues las tumbas se decoraban con enlucidos de cal para ocultar la roca. Sin embargo, la Necrópolis se encuentra en mal estado de conservación y las pocas pinturas existentes presentan un acusado biodeterioro. Por ello, en los últimos años, se han realizado varios estudios encaminados a caracterizar y controlar el biodeterioro de estas tumbas (Ariño y Saiz-Jimenez 1997, Piñar et al. 2001, Akatova et al. 2007).

Estudios previos pusieron de manifiesto la biodiversidad bacteriana de las paredes de las tumbas de esta Necrópolis, ya que se aislaron y describieron nuevas especies de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Virgibacillus* (Heyrman et al. 2003, 2005, Lee et al. 2006, Smerda et al. 2006). De estos géneros, solamente *Arthrobacter* pertenece a la clase *Actinobacteria*. Sin embargo, las bacterias de la clase *Actinobacteria* son muy abundantes en los monumentos deteriorados y particularmente interesantes en cuanto a biodeterioro, debido a que su naturaleza micelial, les confiere una gran capacidad de penetración en el sustrato. Además, producen como metabolitos secundarios pigmentos y sustancias bioactivas, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos y posibilitan el crecimiento de las cepas productoras. También son capaces de inducir la cristalización de sales y formar eflorescencias, las cuales contribuyen en gran medida al deterioro.

Dentro de la clase *Actinobacteria*, existen seis órdenes: *Acidimicrobiales*, *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*, *Coriobacteriales*, *Rubrobacterales* y *Sphaerobacterales*. Se han descrito 158 géneros, la mayoría de *Actinomycetales*. Esto se debe a que las bacterias pertenecientes a otros grupos como *Acidimicrobiales* y *Rubrobacteriales*, son más difíciles de aislar y cultivar y requieren meses de crecimiento para su completa caracterización.

Intentando avanzar en el conocimiento de la ecología de las actinobacterias y en la búsqueda de soluciones para el biodeterioro que originan, se realizaron aislamientos selectivos y caracterización de actinobacterias procedentes de las paredes y pinturas murales deterioradas de dos de las tumbas más importantes de la Necrópolis, las Tumbas de Servilia y de Postumio.

Las actinobacterias aisladas en la Necrópolis de Carmona representaron un 37,5% del total de aislamientos, siendo las especies de *Streptomyces* las más abundantes. Las bacterias pertenecientes a la clase *Proteobacteria* representaron un 18,75% y las pertenecientes a la clase Firmicutes, un 43,75%. Entre las actinobacterias, se identificaron, mediante secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S, dos cepas de *Rubrobacter* sp.: C05-TS-X24-S3 en la Tumba de Servilia y C05-TP-Z26-S14 en la Tumba de Postumio. Estas dos cepas presentaron morfología y coloración similares: colonias rojas, circulares, cóncavas y de consistencia seca.

Actualmente, existen 3 especies descritas del género *Rubrobacter*: *R. radiotolerans*, *R. xylanophilus* y *R. taiwanensis* (Suzuki et al. 1988, Carreto et al. 1996, Chen et al. 2004), y todas

ellas crecen a 55 °C. Hasta hoy ninguna se había aislado de monumentos. Nuestras cepas C05-TS-X24-S3 y C05-TP-Z26-S14 tienen un porcentaje de similitud del 94% con *R. radiotolerans*. Sin embargo, este porcentaje es del 98% cuando se compara con las secuencias de los clones obtenidos de las pinturas murales de la capilla del Castillo de Herberstein en Austria (Schabereiter-Gurtner et al. 2001) y con las secuencias de los clones obtenidos de los frescos medievales de la cripta del Pecado original, en Matera, Italia (Imperi et al. 2007).

En la Necrópolis de Carmona, las técnicas moleculares también han permitido detectar un elevado porcentaje de clones cuyo homólogo más cercano es *Rubrobacter* sp. Se analizaron 28 clones de ADN y 110 clones de ARN. El 7,1% de los clones de ADN correspondió a *Rubrobacter* sp. Este porcentaje fue mayor, 9,1%, en el caso de los clones de ARN, indicando que las cepas cultivadas son metabólicamente activas. Además, la secuencia de los clones CAR-X24-D5 y CAR-X24-A7 correspondió a la de la cepa aislada C05-TS-X24-S3 en la misma muestra, demostrando su implicación en el biodeterioro de las pinturas de la Tumba de Servilia.

En resumen, las cepas aisladas de las paredes de la Necrópolis de Carmona representan un avance en el estudio de la clase *Actinobacteria* en general, y de las bacterias pertenecientes al grupo *Rubrobacteridae* en particular. Nuestros resultados demuestran que las cepas de *Rubrobacter* implicadas en el biodeterioro de la Necrópolis corresponden a nuevas especies de *Rubrobacter*, puesto que nuestros aislamientos presentan diferencias fenotípicas con las ya descritas, como por ejemplo la incapacidad de crecer a 55°C, en medio TSA, etc.

Por otra parte, todavía se plantean algunos interrogantes acerca de la abundancia y distribución de las *Rubrobacteria* en los ecosistemas terrestres, debido a que existen líneas filogenéticas de este grupo de bacterias que carecen de representantes cultivados (Janssen 2006). Las cepas que hemos logrado cultivar en este estudio y la investigación de sus características fisiológicas, demuestran que el género *Rubrobacter* está ampliamente distribuido entre los monumentos deteriorados, donde aparecen en nichos moderadamente halófilos, a partir de los que se ha logrado cultivar por primera vez, habiéndose corroborado su implicación en los procesos de biodeterioro.

Agradecimientos: LL y JMG agradecen al CSIC los proyectos 200740I011 y 200640I197, respectivamente. EA y VJ agradecen los contratos Marie Curie Action MEST-CT2004-513915 e I3P-postdoctoral (CSIC-ESF) respectivamente. Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, proyecto P06-RNM-02318.

Bibliografía

- Akatova, E.A., Gonzalez, J.M. y Saiz-Jimenez, C. 2007. Analysis of the microbial communities from a restored tomb in the Necropolis of Carmona (Sevilla, Spain). *Coalition* 14: 2-5.
- Ariño, X. y Saiz-Jimenez, C. 1997. Deterioration of the Elephant tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). *Int. Biodeter. Biodegr.* 40: 233-239.
- Carreto, L., Moore, E., Nobre, M.F., Wait, R., Riley, P.W., Sharp, R.J. y Da Costa, M.S. 1996. *Rubrobacter xylanophilus* sp. nov., a new thermophilic species isolated from a thermally polluted effluent. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 460-465.
- Chen, M.Y., Wu, S.H., Lin, G.H., Lu, C.P., Lin, Y.T., Chang, W.C. y Tsay, S.S. 2004. *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, radiation-resistant species isolated from hot springs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1849-1855.
- Heyrman, J., Balcaen, A., Rodriguez-Diaz, M., Logan, N.A., Swings, J. y De Vos, P. 2003. *Bacillus decolorationis* sp. nov., isolated from biodeteriorated parts of the mural paintings at the Servilia tomb (Roman necropolis of Carmona, Spain) and the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 459-463.
- Heyrman, J., Verbeeren, J., Schumann, P., Swings, J., y De Vos, P. 2005. Six novel *Arthrobacter* species isolated from deteriorated mural paintings. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1457-1464.

- Imperi, H.F., Caneva, G., Cancellieri, L., Ricci, M.A., Sodo, A. y Visca, P. 2007. The bacterial aetiology of rosy discoloration of ancient wall paintings. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01393.x
- Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1719–1728.
- Lee, J.-S., Lim, J.-M., Lee, K.C., Lee, J.-C., Park, Y.-H. y Kim, C.-J. 2006. *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* to the genus *Oceanobacillus* as *Oceanobacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 251-257.
- Piñar, G., Saiz-Jimenez, C., Schabereiter-Gurtner, C., Blanco-Varela, M.T., Lubitz, W. y Rölleke, S. 2001. Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37: 45-54.
- Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Vybiral, D., Lubitz, W. y Rölleke, S. 2001. *Rubrobacter*-related bacteria associated with rosy discolouration of masonry and lime wall paintings. *Arch. Microbiol.* 176: 347-354.
- Smerda, J., Sedláček, I., Pácová, Z., Krejčí, E. y Havel, L. 2006. *Paenibacillus sepulcri* sp. nov., isolated from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2341-2344.
- Suzuki, K., Collins, M.D., Lijima, E. y Komagata, K. 1988. Chemotaxonomic characterization of a radiotolerant bacterium, *Arthrobacter radiotolerans*: description of *Rubrobacter radiotolerans* gen. nov., comb. nov. *FEMS Microb. Lett.* 52: 33-40.