

Grupo de Ecología Microbiana de la Universidad Autónoma de Barcelona

Antonio Solé, Isabel Esteve, Laia Millach, Eduard Villagrasa, Nadia Bahavar, Zully M. Puyen, Álvaro Burgos



Antoni.sole@uab.cat

Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici C, Campus de la UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193, Barcelona



De izquierda a derecha: Eduard Villagrasa, Nadia Bahavar, Dra Isabel Esteve, Dr Antonio Solé, Dra. Laia Millach, Neus Bonet, Cristina Sosa

El grupo de Ecología Microbiana de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), está especializado en el aislamiento y cultivo de los microorganismos fotótrofos, principalmente cianobacterias, de ambientes extremos. Nuestros principales **objetivos** son: el estudio del efecto tóxico que producen los metales en dichas poblaciones; su potencial como bioindicadores/biorremediadores de ambientes contaminados por metales pesados, y la optimización, aplicación y validación de técnicas tanto de microscopía óptica como de microscopía electrónica de alta resolución para llevar a cabo tales estudios.

El equipo de investigación está coordinado por el **Dr. Antonio Solé** (profesor contratado doctor) y la **Dra. Isabel Esteve** (catedrática-profesora honoraria) y en él se han formado en los últimos 5 años: la **Dra. Laia Millach** y la **Dra. Zully M. Puyen** (doctorado en microbiología) y el **Dr. Álvaro Burgos** (doctorado en biotecnología) y diferentes estudiantes de máster. Actualmente, el grupo lo completan, además de

nuevos estudiantes de máster, los doctorandos **Eduard Villagrasa** y **Nadia Bahavar** y la técnica de laboratorio **Cristina Sosa**.

La contaminación por metales pesados es un problema medioambiental grave que afecta a los seres vivos y altera la microbiota de los ecosistemas acuáticos y terrestres. Gran parte de estos compuestos tóxicos son liberados al medio ambiente por causas antropogénicas. Un ejemplo de hábitat donde las principales fuentes de contaminación son la agricultura y la industria es el delta del río Ebro, el cual está situado al noreste de la península ibérica y cubre una extensión de 320 km² en la desembocadura del río. En esta área encontramos los tapetes microbianos, ecosistemas naturales costeros formados por comunidades microbianas bentónicas verticalmente estratificadas en capas, de distinta coloración y de grosor variable (mm a cm), según los microgradientes de parámetros físico-químicos predominantes: luz, temperatura, salinidad, oxígeno y sulfhídrico, entre otros.

Las cianobacterias y las microalgas, microorganismos fotótrofos, son los más abundantes e importantes productores primarios de la zona, y se ubican principalmente en las capas superiores de los tapetes microbianos. Estos microorganismos tienen una especial capacidad tanto para adaptarse a condiciones muy limitantes para la vida como para tolerar o resistir la presencia de los metales.

En la última década, el grupo de Ecología Microbiana de la UAB ha aislado diferentes consorcios de microorganismos de los tapetes microbianos del delta del Ebro donde cada uno está a su vez formado por distintos microorganismos: un único fotótrofo y distintos heterótrofos. Al mismo tiempo, también se han optimizado y aplicado distintas técnicas de microscopía óptica y electrónica con el principal objetivo de estudiar el efecto de los metales pesados, principalmente, en los microorganismos fotótrofos, y se ha determinado su capacidad para biorremediar ambientes contaminados por éstos. Dichas

técnicas incluyen: Microscopía Láser Confocal (CLSM) y CLSM acoplado a un detector espectrofluorométrico (λ Scan-CLSM) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), ambos acoplados a un detector de Energía Dispersiva de rayos X (EDX).

Referente a la microscopía óptica, el CLSM se utiliza para determinar los cambios en diversidad, viabilidad y biomasa debidos a la presencia del metal, tanto de microorganismos fotótrofos como de heterótrofos. Esta técnica se basa en la capacidad de los microorganismos fotótrofos de emitir fluorescencia natural, y en la de los no fotótrofos de emitir fluorescencia debido a la incorporación de fluorocromos vitales específicos. Para ello se aplican las metodologías CLSM-IA y FLU-CLSM-IA, utilizando un programa de análisis de imagen (IA) y fluorocromos vitales específicos (FLU, Hoechst y Sytox Green). Por otro lado, la función λ Scan-CLSM evalúa el efecto de los metales *in vivo*, de manera rápida y a nivel celular de muestras de microorganismos fotótrofos (autofluorescentes) sin interferencia de las bacterias heterótrofas presentes tanto en los consorcios aislados como en muestras naturales. La técnica nos permite determinar significativamente la mínima concentración de metal que afecta la fluorescencia emitida por el pigmento seleccionado como biomarcador (clorofila *a*).

A nivel de microscopía electrónica, además de poder observar cambios en la ultra-estructura celular debidos a la presencia del metal, la aplicación del SEM-EDX y el TEM-EDX evalúa la capacidad de los microorganismos, tanto fotótrofos como heterótrofos, de captar metales pesados, ya sea externamente en sustancias poliméricas extracelulares (bioadsorción) y/o internamente en el citoplasma o en inclusiones de polifosfato (bioacumulación). Además, la aplicación de técnicas complementarias de análisis químico y bioquímico proporciona datos sobre las eficiencias de captación de dichos metales por parte de los microorganismos ensayados.

El análisis conjunto de los resultados nos permite valorar qué microorganismos podrían ser considerados buenos bioindicadores de contaminación según el metal y cuáles presentan un mayor potencial para ser ensayados en biorremediación.

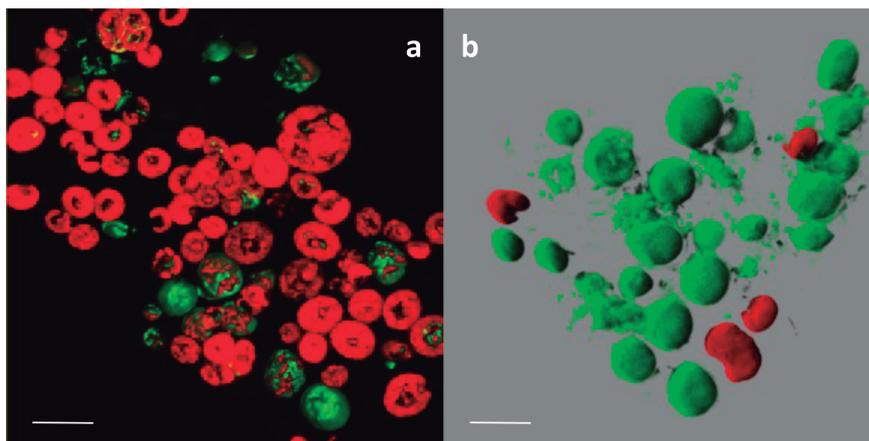


Figura 1. CLSM-DL. Autofluorescencia roja (PAF) y verde (NPAF) de *Scenedesmus* sp. DE2009. Proyección 3D para el cultivo control (a) y a 100 g NaCl/L (b). La barra representa 10 micras. Cortesía: Laia Millach

El grupo de Ecología Microbiana de la UAB considera primordial el desarrollo de nuevas técnicas que permitan detectar fácilmente y de manera rápida la contaminación ambiental debida especialmente a la actividad humana. Es por ello que el potencial de todas las técnicas de microscopía utilizadas por el grupo es extensible al estudio del efecto estresante de cualquier tipo de contaminante (hidrocarburos, pesticidas, etc.) sobre las comunidades microbianas autóctonas, principalmente formadas por microorganismos fotótrofos, de un ambiente contaminado, y la capacidad de éstas de resistir o tolerar dichos contaminantes. Además, la mayor parte de las técnicas permiten también evaluar los cambios producidos en los microorganismos debidos a cualquier parámetro ambiental, como por ejemplo la salinidad (Fig. 1).

En este sentido, el grupo ha publicado recientemente un nuevo método, CLSM-DL, basado en la aplicación de un láser dual para evaluar de manera rápida e *in vivo* la viabilidad celular sin necesidad de protocolos de tinción ni software de análisis de imagen. La técnica se basa en una captación secuencial en dos canales diferentes a partir de un mismo plano óptico utilizando un detector híbrido que permite diferenciar la fluorescencia emitida por células vivas (PAF, *Photosyntheticautofluorescence*) de la emitida por las células muertas (NPAF, *Non-Photosyntheticautofluorescence*).

PUBLICACIONES DESTACADAS DE LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS

Villagrasa E, Ferrer-Mirallés N, Millach L, Obiol A, Creus J, Esteve I y Solé A. (2018). Morphologi-

cal responses to nitrogen stress deficiency of a new heterotrophic isolated strain of Ebro Delta microbial mats. *Protoplasma*. Published online. DOI: 10.1007/s00709-018-1263-8.

Millach L, Obiol A, Solé A y Esteve I. (2017). A novel method to analyse *in vivo* the physiological state and cell viability of phototrophic microorganisms by confocal laser scanning microscopy using a dual laser. *J Microscopy* 268(1):53-65.

Puyen ZM, Villagrasa E, Millach L, Esteve I, Maldonado J y Solé A. (2017). Multi- approach microscopy techniques to evaluate the cytotoxic effect of chromium (III) on the cyanobacterium *Chroococcus* sp. PCC 9106. Publisher: Formatex Research Center, Editors: A. Méndez-Vilas, pp.602-609.

Otón J, Pereiro E, Pérez-Berná AJ, Millach L, Sorzano CO, Marabini R y Carazo JM. (2016). Characterization of transfer function, resolution and depth of field of a soft X-ray microscope applied to tomography enhancement by Wiener deconvolution. *Biomed Opt Express* 7(12):5092-5103.

Millach L, Solé A y Esteve I. (2015). Role of *Geitlerinema* sp. DE2011 and *Scenedesmus* sp. DE2009 as bioindicators and immobilizers of chromium in a contaminated natural environment. *Bio Med Research Internat* 2015:1-11. Open Access Article.

Coreño-Alonso A, Solé A, Diestra E, Esteve I, Gutiérrez-Corona JF, Reyna López GE, Fernández FJ y Tomasini A. (2014). Mechanisms of interaction of chromium with *Aspergillus niger* var *tubingensis* strain Ed8. *Biores Technol* 158:188-192.

Burgos A, Maldonado J, De los Ríos A, Solé A y Esteve I. (2013). Effect of copper and lead on two consortia of phototrophic microorganisms and their capacity to sequester heavy metals. *Aquatic Toxicol* 140-141:324-336.

Esteve I, Maldonado J, Burgos A, Diestra E, Burnat M y Solé A. (2013). Confocal laser scanning and electron microscopy techniques as powerful tools for determining the *in vivo* effect and sequestration capacity of lead in cyanobacteria. Chapter 9. In: Ferrão-Filho, A.S. (Eds), *Cyanobacteria: Ecology, Toxicology, and Management*. Nova Science Publishers Inc., New York.

Seder-Colomina M, Burgos A, Maldonado J, Solé A y Esteve I. (2013). The effect of copper on different phototrophic microorganisms determined *in vivo* and at cellular level by confocal laser microscopy. *Ecotoxicol* 22:199-205.