

¿CÓMO AUMENTAR LA DIVERSIDAD FENOTÍPICA DE CULTIVOS INICIADORES LÁCTICOS?

María Jesús López-González, Susana Escobedo, Ana Rodríguez y Beatriz Martínez
Grupo DairySafe, IPLA-CSIC. Paseo del Río Linares, s/n 33300 Villaviciosa, Asturias.

Lactococcus lactis, componente esencial de cultivos iniciadores, es la especie acidificante más utilizada en la industria quesera. Su función principal es producir ácido láctico, facilitando la coagulación de la leche, a la vez que participa en el desarrollo del sabor, aroma y textura final del producto. Actualmente, la creciente demanda de productos fermentados con menos aditivos y cualidades organolépticas definidas implica la necesidad de abordar nuevas estrategias encaminadas a generar cepas con diferentes aptitudes tecnológicas.

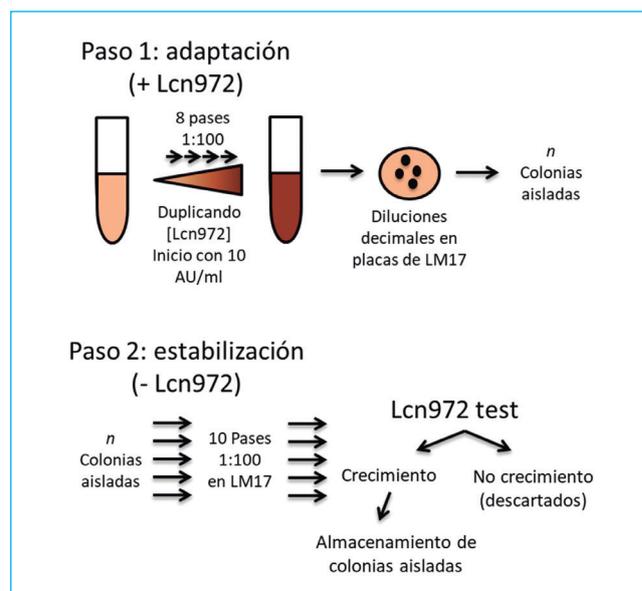
Con este fin, el grupo DairySafe del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC) ha evaluado la evolución adaptativa bajo condiciones de estrés sobre la pared celular (AE-CES), como posible estrategia de grado alimentario para introducir diversidad fenotípica y genotípica a partir de los cultivos iniciadores lácticos existentes, sin comprometer su funcionalidad y obtener nuevas cepas con aptitudes tecnológicas mejoradas.

El proceso diseñado consistió en dos pasos (figura): uno de adaptación, en el que se crecen los cultivos en concentraciones crecientes de Lcn972, una bacteriocina que inhibe la síntesis de pared celular, para seleccionar mutantes resistentes (Lcn972R), y otro de estabilización, que conllevó pases sucesivos en ausencia de presión selectiva, para fijar mutaciones que no interfiriesen negativamente en el crecimiento. Este proceso se aplicó a tres cepas acidificantes y cinco cepas productoras de nisina, una de ellas comercializada como cultivo protector, pertenecientes a la especie *L. lactis*

En todos los casos se pudieron seleccionar mutantes Lcn972R, lo que apoya la posible aplicación de AE-CES a otros lactococos sensibles a Lcn972. Los parámetros de acidificación en leche fueron, en general, acordes a los estándares existentes para iniciadores lácteos. Además, se aislaron variantes con cambios significativos en fenotipos con repercusión tecnológica que afectan a la superficie bacteriana (ej. hidrofobicidad) y en el grado de autólisis, entre otros. En algunos casos, durante el proceso de adaptación se identificaron problemas asociados, como la pérdida de plásmidos, que han de minimizarse en el futuro.

El estudio genómico preliminar ha puesto de manifiesto, además, la diversidad genética entre los mutantes caracterizados, reflejando los diferentes mecanismos de *L. lactis* para defenderse del daño en la pared celular. En su conjunto, los resultados obtenidos avalan el uso de AE-CES como una estrategia viable para generar diversidad fenotípica y genética en cepas industriales de *L. lactis*.

López-González, M.J., Escobedo, S., Rodríguez, A., Neves, A.R., Janzen, T., and Martínez, B. (2018). Adaptive Evolution of Industrial *Lactococcus lactis* Under Cell Envelope Stress Provides Phenotypic-Diversity. *Front. Microbiol.*, 9:2654 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02654>



Esquema representativo del protocolo de AE-CES.

Publicación de reseñas de artículos para la sección “Nuestra Ciencia”

La sección «Nuestra Ciencia» publica reseñas de artículos científicos producidos por nuestros socios. La extensión máxima del texto es de 400 palabras y puede incluirse una imagen. Deben incluir la siguiente información: Título de la reseña, Autor, referencia bibliográfica completa del artículo que se reseña. Si el autor lo desea puede proporcionar su email de contacto.

Envía tus reseñas a la secretaría de la SEM (secretaria.sem@semicrobiologia.org) o al director editorial (Manuel Sánchez, correo: m.sanchez@umh.es)

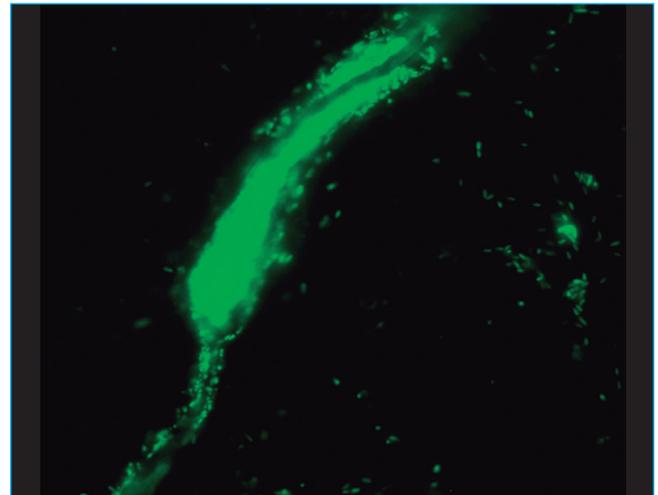
RESPUESTA DE UNA BACTERIA AISLADA DE LAS RAÍCES DE AGUACATE A LOS EXUDADOS DEL HONGO CAUSANTE DE LA PODREDUMBRE BLANCA RADICULAR

Cayo Ramos

La bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110, aislada de raíces de aguacate en la Axarquía malagueña, controla la podredumbre blanca radicular causada por *Rosellinia necatrix*. Este artículo describe la identificación de un conjunto de genes que AVO110 requiere para utilizar los sustratos presentes en exudados de *R. necatrix* y sobrevivir en contacto directo con los mismos. Además de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos o el catabolismo de ácidos grasos y de compuestos aromáticos, hemos encontrado genes que resultan esenciales para que la bacteria colonice las hifas del hongo y/o la rizosfera de aguacate. El artículo, se ha publicado por investigadores de la línea "Biología y Control de Enfermedades de Plantas" del IHSM-UMA-CSIC (José Ignacio Crespo-Gómez, Adrián Pintado, Isabel Pérez-Martínez, Antonio de Vicente, Francisco M. Cazorla y Cayo Ramos) y del IFAPA-Centro de Málaga (Clara Pliego), en la revista *Applied and Environmental Microbiology*, de la *American Society for Microbiology*.

Response of the biocontrol agent *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 to *Rosellinia necatrix* exudate. *Appl. Environ. Microbiol.* (2019) 85 (3): e01741-18. DOI: 10.1128/AEM.01741-18

<https://aem.asm.org/content/early/2018/11/20/AEM.01741-18>

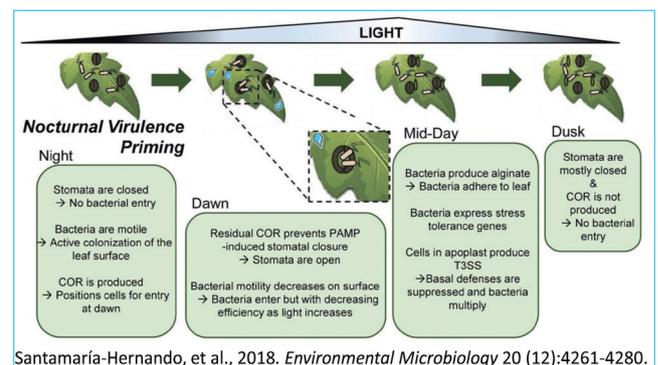


En la imagen se muestra la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 marcada con la proteína verde fluorescente (GFP) colonizando por completo una hifa del hongo *Rosellinia necatrix*. La fluorescencia verde emitida por la bacteria permite visualizar la estructura piriforme característica de las hifas de este hongo.

PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. TOMATO APROVECHA LA PERCEPCIÓN DE LA LUZ PARA OPTIMIZAR LA VIRULENCIA Y LA COLONIZACIÓN DE LAS HOJAS.

Saray Santamaría Hernando

Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 (*PsPto*) es un patógeno hemibiotrofo foliar que causa la mancha bacteriana en tomate. Durante su vida en la filósfera, la bacteria está continuamente expuesta a las diferentes condiciones de luz. *PsPto* presenta en su genoma un fotorreceptor de luz azul y dos fotorreceptores de luz roja. Este artículo describe como la percepción de la luz a través de los fotorreceptores induce una reprogramación génica en *PsPto* que conlleva cambios significativos en la tolerancia al estrés y en los mecanismos relacionados con la virulencia. Además, se pone de manifiesto que los efectos de la presencia, ausencia y la calidad de la luz en la expresión génica, junto con el estado fisiológico de la planta con respecto al ciclo diurno en el momento de la inoculación, determinan el resultado de la virulencia. Esto indica, que al igual que las plantas aprovechan las señales de luz para maximizar su resistencia frente a patógenos, las bacterias pueden aprovechar estas señales para maximizar su virulencia en las plantas. El artículo, se ha publicado por un equipo de investigadores del grupo de "Bacterias fitopatógenas" del CBGP de la UPM (Saray Santamaría-Hernando, José J. Rodríguez-Herva, Pedro M. Martínez-García, Isabel Río-Álvarez, Pablo González-Melendi, Pablo Rodríguez-Palenzuela y Emilia López-Solanilla), en colaboración con el Departamento de Astrofísica y CC. de la Atmósfera de la UCM (Carlos Tapia y Jaime Zamorano), en la revista *Environmental Microbiology*.



Santamaría-Hernando, et al., 2018. *Environmental Microbiology* 20 (12):4261-4280.

En la imagen se muestra un modelo que ilustra el impacto de la detección de la luz por *PsPto* sobre la virulencia y colonización de hojas de tomate.

Pseudomonas syringae pv. tomato exploits light signals to optimize virulence and colonization of leaves. *Environ. Microbiol.* (2018) 20(12):4261-4280. DOI: 10.1111/1462-2920.14331

PREVENCIÓN DE BROTES DE LEGIONELOSIS MEDIANTE LA DETECCIÓN RÁPIDA DE LA BACTERIA *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* A PARTIR DE MUESTRAS DE AIRE

Beatriz Sánchez-Parra¹, Andrés Núñez¹ y Diego A. Moreno^{1,2}

¹Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Universidad Politécnica de Madrid (ETSII-UPM), C/José Gutiérrez Abascal, 2 E-28006 Madrid, Spain.

²Facultad de Farmacia, Universidad de Castilla-La Mancha (FF-UCLM), Avda. Dr. José María Sánchez Ibáñez, s/n, E-02008 Albacete, Spain.

sanchez.parra.beatriz@gmail.com
andres.nunez@upm.es
Diego.Moreno@uclm.es

La legionelosis es una infección grave de los pulmones que se origina por la inhalación de bacterias del género *Legionella*. Concretamente en Europa está ocasionada principalmente por la especie *Legionella pneumophila*.

Normalmente alcanza las vías respiratorias a través de aerosoles que proceden del agua de fuentes, spas, torres de refrigeración, etc. Estos sistemas deben estar rutinariamente controlados para evitar la aparición de esta bacteria. La manera más habitual de detectar su presencia es mediante cultivos bacterianos, los cuales requieren varios días para proporcionar un resultado concluyente.

En este estudio, investigadores del Grupo BIO-MAT de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Madrid, hemos desarrollado un protocolo que permite detectar *L. pneumophila* directamente de muestras del aire que inhalamos, sin necesidad de realizar un cultivo previo.

Durante el desarrollo del Programa AIRBIOTA-CM (2013/MAE-2874), analizamos muestras de aire urbano de distintos puntos de la Comunidad de Madrid mediante técnicas de secuenciación masiva. Entre la gran diversidad bacteriana presente en dichas muestras, detectamos, en algunos casos, restos de ADN correspondiente con *Legionella* spp., aunque siempre en muy baja proporción. Con este resultado, decidimos desarrollar un protocolo rápido para detectar de manera específica la presencia de *L. pneumophila* directamente a partir de las muestras de aire, lo que ayudaría a iniciar los protocolos de actuación de manera más temprana y evitar así posibles infecciones.

El protocolo consta de dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) dirigidas para detectar una zona específica del gen 16S rRNA de la bacteria, comprendida entre las regiones hipervariables V3 y V5 (Figura 1).

Asimismo, resulta novedoso el tipo de muestras que se han utilizado para detectar al patógeno. Se trata de muestras de aire recogidas con un muestreador tipo Hirst (*Burkard Manufacturing Co., United Kingdom*), diseñado y ampliamente utilizado para cuantificar los niveles de polen del aire en las ciudades. Dicho muestreador contiene una cinta transparente recubierta con vaselina, que actúa como superficie adherente para las partículas presentes en el aire, incluidos los microorganismos. El ADN necesario para llevar a cabo las PCR puede obtenerse fácilmente a partir de esta cinta mediante un kit de extracción comercial (consultar procedimiento en este enlace: <https://youtu.be/fsqyiltfd4Y>).

Este ADN puede analizarse directamente con las dos PCR diseñadas, confirmando la presencia de *L. pneumophila* en unas pocas horas. Aunque el resultado no permite conocer si dicha bacteria es infecciosa o viable, su simple presencia puede suponer un riesgo para la población, por lo que su rápida detección puede evitar la aparición de brotes de legionelosis o formas más leves de la enfermedad como la fiebre de Pontiac, causada por la simple exposición a los antígenos de la bacteria.

Este trabajo constituye un avance en la detección de patógenos presentes en el aire, sin necesidad de realizar cultivos, y con una alta sensibilidad dada la baja concentración de ADN de las muestras y la multitud de entidades biológicas diferentes (bacterias, hongos, arqueas, polen, etc.) presentes en el aire que respiramos.

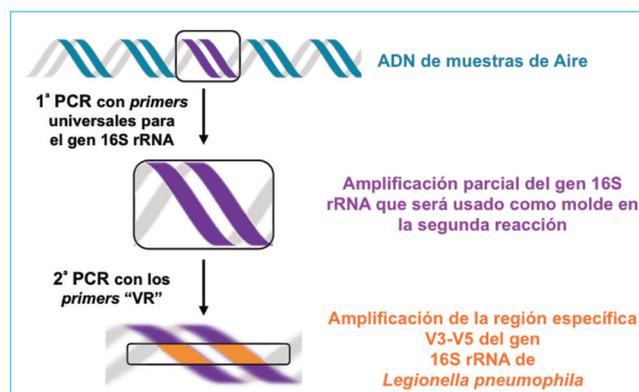


Ilustración esquemática del protocolo para detectar *Legionella pneumophila*. El protocolo consta de dos PCR. La primera reacción está diseñada para amplificar parcialmente el gen 16S rRNA de todas las bacterias, mientras que la segunda reacción es específica para detectar *L. pneumophila*. Modificada de Sánchez-Parra et al., *Env Research* 2019.

RIZOBACTERIAS, PLANTAS HALÓFILAS Y CAMBIO CLIMÁTICO

Jennifer Mesa Marín

La redacción de este capítulo de libro ha sido posible gracias a una colaboración que comenzó de manera fortuita entre profesores del Departamento de Microbiología y Parasitología y el Departamento de Biología Vegetal y Ecología, ambos de la Universidad de Sevilla. Con el tiempo, y tras numerosos trabajos conjuntos, la relación colaborativa se ha consolidado dando lugar a una línea de estudio ligada al microbioma de plantas halófilas.

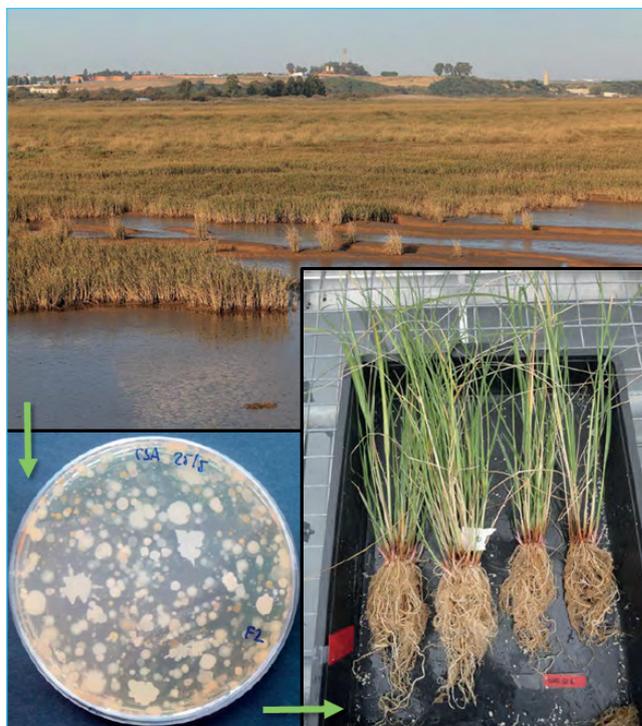
Las halófitas son plantas que pueden sobrevivir y completar su ciclo de vida en ambientes altamente salinos y entornos que, generalmente, no son adecuados para cultivos convencionales. Este libro contiene conocimientos actualizados en el campo de la biología, la ecología y los potenciales usos de las halófitas. Todo ello, enmarcado en un contexto de Cambio Climático, dado que cada vez son más numerosas las pruebas de que las halófitas están preparadas para enfrentar entornos cambiantes, gracias a sus múltiples mecanismos de adaptación.

¿Y qué pinta la Microbiología en todo esto? En este caso, representa un recurso natural que apenas se ha abordado en halófitas: su microbiota. Y es que las bacterias asociadas íntimamente con las raíces o los tejidos de las plantas pueden interactuar y afectar a su fisiología. En particular, algunas bacterias pueden facilitar el crecimiento vegetal o su adaptación a diferentes factores de estrés. Son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (en inglés PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria).

En el capítulo redactado por nuestro equipo, se recoge lo que sabemos de la, hasta ahora poco estudiada, microbiota asociada a halófitas. En primer lugar, se describen brevemente las distintas propiedades bacterianas que promueven el crecimiento vegetal, como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos y de hormonas vegetales, etc. Además de estas propiedades, las bacterias aisladas de la microbiota de halófitas cuentan con una elevada tolerancia a la sal. Esto hace que estos microorganismos puedan ser aplicados sobre plantas halófilas u otras especies que se vean obligadas a crecer en ambientes salinos, mediante algunas estrategias como pueden ser la bioestimulación, la bioaumentación o la inoculación de semillas. Así, en el capítulo se recopilan estudios donde los tratamientos bacterianos en halófitas y otras plantas han mejorado su fisiología y capacidades de adaptación, contribuyendo positivamente en distintos campos de acción medioambientales, como la restauración ecológica, la bioremediación de contaminantes y sal en suelo, la mejora en la productividad de diversos cultivos y la obtención de enzimas de interés biotecnológico. Finalmente, se exponen algunas limitaciones de este campo de estudio, sobre las que hay que seguir trabajando, y perspectivas futuras, que vendrán sobre todo de la mano de las ciencias “ómicas” y estudios de campo *in situ*.

El estudio de la interacción microbiota – halófitas comienza a surgir como una bioherramienta prometedora, económica y respetuosa con el medio ambiente, para enfrentarnos a desafíos actuales como la contaminación, la salinidad, la intervención antropogénica o las demandas biotecnológicas en un mundo cada vez más cambiante y sujeto al Cambio Climático.

Jennifer Mesa Marín, Enrique Mateos Naranjo, Ignacio David Rodríguez Llorente, Eloísa Pajuelo Domínguez, Susana Redondo Gómez. *Synergic Effects of Rhizobacteria: Increasing Use of Halophytes in a Changing World*. En *Halophytes and Climate Change: Adaptive Mechanisms and Potential Uses*. Mirza Hasanuzzaman, Sergey Shabala, Masayuki Fujita, Editores. CAB International (2019).



En España, las marismas de Huelva suponen una zona de muestreo idónea y frecuentada por nuestro equipo de trabajo. De la microbiota de algunas halófitas de la zona se han aislado bacterias cultivables promotoras del crecimiento vegetal tolerantes a medios salinos. La bioaumentación con una selección de las mejores bacterias ha promovido una mejora en el crecimiento de halófitas como *Spartina densiflora* (Mateos-Naranjo et al., 2015).

Mateos-Naranjo E, Mesa J, Pajuelo E, Pérez-Martín A, Cavedes MA, Rodríguez-Llorente ID (2015). Deciphering the role of plant growth-promoting rhizobacteria in the tolerance of the invasive cordgrass *Spartina densiflora* to physicochemical properties of marshes soils. *Plant and Soil*, 394: 45–55. doi: 10.1007/s11104-015-2504-7

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS SOBRE MATERIALES BIOABSORBENTES



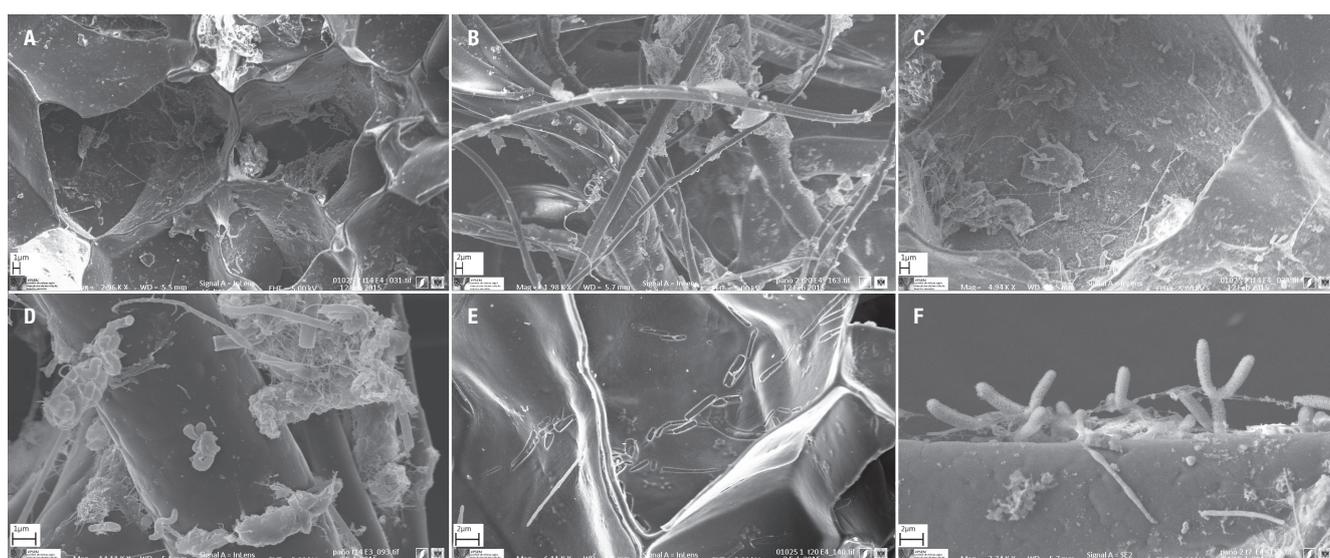
Alfonso Rodríguez-Calvo*, Gloria Andrea Silva-Castro, Tatiana Robledo-Mahón,
Jesús González-López, Concepción Calvo.

Instituto de Investigación del Agua, Departamento de Microbiología, Universidad de Granada

La contaminación de aguas con hidrocarburos es un problema medioambiental de gran relevancia. En esta investigación el objetivo ha sido estudiar la capacidad de la microbiota autóctona de aguas residuales industriales contaminadas con hidrocarburos para formar biopelículas estables sobre diferentes soportes absorbentes (corcho granulado hidrófilo "CorkSorb®-03025", corcho granulado hidrófobo "CorkSorb®-01025", fibra de polipropileno "Paño-Sentec®" y fibra de polipropileno con pulpa de celulosa "Cordón-Sentec®"), así como determinar la capacidad degradadora de la biopelícula formada. Los ensayos se realizaron en microcosmos de 1 L de capacidad, compuestos por 400 mL de medio de cultivo (LB o BH) y 200 mL de soporte, e inoculados inicialmente con *Pseudoalteromonas elyakovii* W18, cepa seleccionada por su elevada capacidad de adhesión (Rodríguez-Calvo et al. 2017). Los resultados mostraron que en medio rico en nutrientes (LB) los cuatro soportes originaron una biopelícula estable sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo en el medio mineral BH en el que el crecimiento de W18 fue moderado (valores entre 6-7 Log UFC), se demostró que el corcho hidrófobo y los dos soportes de fibra de polipropileno permitían la formación de biopelícula estable, mientras que ésta no se observó sobre el corcho hidrófilo.

En una segunda etapa se evaluó la capacidad de formación de biopelículas por parte de la microbiota autóctona del agua residual contaminada empleando los soportes CorkSorb®-01025 y Paño-Sentec® (seleccionados a partir de los primeros resultados) y evaluando la influencia de la concentración de hidrocarburos en la formación de biopelícula y en la degradación del contaminante. En ambos ensayos la presencia de hidrocarburos incrementó el crecimiento microbiano adherido a ambos materiales, siendo más acusado en el soporte Paño-Sentec® y observándose un desprendimiento de la biopelícula en el caso de CorkSorb®-01025. El crecimiento de la biopelícula se tradujo en un elevado porcentaje de degradación de la mayoría de las fracciones de hidrocarburos analizadas, cercanos al 80% para CorkSorb®-01025 y al 90% para el Paño-Sentec®. Esta tendencia indicaría que los microorganismos autóctonos adheridos utilizarían los hidrocarburos absorbidos en la superficie como fuente de carbono y energía. El Paño-Sentec® fue más eficaz que CorkSorb®-01025 tanto en la formación de la biopelícula como en la eliminación del contaminante. Los resultados de microscopía electrónica verificaron la capacidad de adherencia de la microbiota a estos materiales. En consecuencia, la fibra de polipropileno, al ser un buen absorbente de hidrocarburos, facilita la formación de una biopelícula especializada altamente eficaz en la degradación de hidrocarburos y se perfila como un bioabsorbente útil en biorremediación.

Rodríguez-Calvo, A., Silva-Castro, G.A., Robledo-Mahón, T., González-López, J., and Calvo, C. (2018). Capacity of Hydrophobic Carriers to Form Biofilm for Removing Hydrocarbons from Polluted Industrial Wastewater: Assay in Microcosms. *Water, Air, Soil Pollut.* 229, 175. doi: 10.1007/s11270-018-3826-x



Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido. A) Vista general de la estructura del soporte CorkSorb® 01025. B) Vista general de la estructura del soporte Paño Sentec®. C) Detalle de la adhesión bacteriana al soporte CorkSorb® 01025. D) Detalle de la adhesión bacteriana al soporte Paño Sentec® E) Detalle del desprendimiento bacteriano de la estructura del soporte CorkSorb® 01025 F) Detalle de la adhesión bacteriana al soporte Paño Sentec®.

MICROBIOTA DE SUELOS HIPERSALINOS



Blanca Vera-Gargallo y Antonio Ventosa

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

Suelos salinos estudiados en el Paraje Natural Marismas del Odiel (Huelva).

Se estima que los suelos salinos o con problemas de salinidad cubren más del 2% de la superficie mundial, siendo España uno de los países con mayor extensión de suelos de este tipo en Europa. Sin embargo, la literatura sobre la microbiota de ambientes hipersalinos se basa principalmente en estudios de sistemas salinos acuáticos y solo recientemente ha aumentado el interés por la microbiota de ambientes hipersalinos terrestres.

En nuestros trabajos recientes analizamos mediante técnicas ómicas las comunidades de bacterias y arqueas de suelos salinos (con $CE_{1,5}$ comprendidas entre 5,96 y 61,02 mS/cm), localizados en zonas de marisma alta de las Marismas del Odiel (Huelva), analizando los resultados obtenidos en el contexto de las comunidades microbianas de varios sistemas hipersalinos acuáticos ampliamente estudiados y determinando los principales factores fisicoquímicos relacionados con su composición y diversidad.

Así, por un lado, la diversidad taxonómica y funcional de la comunidad procarionta de los suelos hipersalinos estudiados fue superior a la de ambientes acuáticos, tales como diversos estanques de las salinas Bras del Port (Santa Pola, Alicante) y las salinas de Isla Cristina; probablemente debido a la mayor heterogeneidad del suelo frente a la de una columna de agua. Las secuencias metagenómicas se asignaron principalmente a grupos taxonómicos con representantes halófilos conocidos, como *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes* y los recientemente creados *Balneolaeota* y *Rhodothermaeota*, aunque también se encontraron otras relacionadas con grupos minoritarios para los que no se han descrito representantes halófilos. Los géneros *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natronomonas* y *Salinibacter*, abundantes en otros ambientes hipersalinos, se encontraron entre los mayoritarios en estos suelos. Sin embargo, no se detectaron secuencias relacionadas con el género *Haloquadratum*, que constituye un gran porcentaje de la población en los ambientes acuáticos utilizados como referencia. Además, *Fodinibius* y *Salinimicrobium*, taxones sobre los que se posee escasa información ambiental, se hallaron entre los más representados en estos suelos. Tres genomas ambientales -de calidad media según los estándares actuales-, relacionados con el phylum *Balneolaeota*, el orden *Saprospirales* y el género *Salinimicrobium* pudieron ser recuperados a partir de las secuencias de los metagenomas completos estudiados.

El estudio de los parámetros fisicoquímicos relacionados con la estructura de las comunidades procariontas de suelos salinos del citado paraje reveló que la humedad, el pH, la textura y la concentración de carbono y metales jugaban un papel esencial en la distribución espacial de las mismas, relegando la salinidad como factor de estructuración de la comunidad a un segundo plano, probablemente debido a que en dichas condiciones la mayor parte de la comunidad está constituida por microorganismos altamente adaptados a la vida en ambientes salinos capaces de soportar un rango amplio de salinidad. Estos resultados sugieren que existe un cierto valor límite de salinidad a partir del cual este factor no juega un papel esencial en la estructuración de las comunidades microbianas o en su diversidad.

Vera-Gargallo, B. and Ventosa, A. (2018). Metagenomic insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils from the Odiel saltmarshes (SW Spain). *Genes* 9: 152. doi: 10.3390/genes9030152

Vera-Gargallo, B., Chowdhury, T.R., Brown, J., Fansler, S.J., Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C., Bailey, V.L., Jansson, J.K. and Ventosa, A. (2019). Spatial distribution of prokaryotic communities in hypersaline soils. *Sci. Rep.* 9: 1769. doi: 10.1038/s41598-018-38339-z

CONTROLANDO LA POLARIDAD EPITELIAL. UN MODELO ENTÉRICO PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN PATÓGENO-HOSPEDADOR

Mar Margalef-Català

Department of Pediatrics and Microbiology and Immunology, School of Medicine, Stanford University, CA, USA

Como humanos, hemos evolucionado con una cantidad gigantesca de organismos con los que establecemos una intrínseca relación ya al inicio de nuestra vida. Entender el porqué de estas interacciones, cómo se mantienen y cómo en algunos casos terminan dañando nuestro cuerpo son algunos de los objetivos de nuestro grupo de investigación. Para responder a algunas de estas preguntas hemos desarrollado un nuevo modelo *in vitro* de estómago e intestino humano basado en la utilización de organoides.

Los organoides provienen de células madre y forman esferas de agregados celulares cultivados en un biogel. De forma análoga al intestino humano, la parte interior de la esfera equivaldría al lumen, por donde pasa la comida y donde el epitelio intestinal entra en contacto con infinidad de microorganismos y compuestos. Esta región del epitelio humano tan importante para el estudio científico queda recluida en el interior del organoide y solamente resulta accesible mediante la micro inyección.

Recientemente, Co et al. (2019) hemos publicado una nueva manera de estudiar esta parte del epitelio humano a través de la eversión completa de los organoides. Al finalizar este proceso, el lumen queda expuesto en el medio de cultivo manteniendo la estructura 3D. Básicamente, como si volviésemos un calcetín de dentro para afuera. De este modo, el estudio de la interacción entre las células humanas y otro compuesto se puede realizar con la simple adición de éste en el medio de cultivo sin necesidad de dañar el organoide.

Esta eversión viene regulada por el contacto entre las proteínas extracelulares de la matriz que contiene los organoides, con la integrina $\beta 1$ localizada en la parte basal de las células. Al remover los organoides de esta matriz, se produce el proceso de polaridad invertida por eversión.

Los organoides con polaridad invertida contienen diferentes tipos de células presentes en el intestino humano creando así un modelo más cercano al escenario *in vivo*. Mediante el ensayo de difusión de dextranos analizamos que, al igual que nuestro intestino, los organoides invertidos mantienen la integridad de la barrera epitelial. Además, las células que absorben nutrientes son capaces de captar los ácidos grasos del medio.

Finalmente, usamos estos organoides con polaridad invertida para el estudio de patógenos intracelulares como *Salmonella* y *Listeria*, mediante su simple inoculación en el medio de cultivo.

Creemos que este modelo *in vitro* puede representar una herramienta excelente para muchos grupos de investigación que estudian el epitelio gastrointestinal y la interacción huésped-patógeno.

Co, Julia., Margalef-Català, M., Li, X., Mah, A., Kuo, C., Monack, D., Amieva, M.R. (2019) Controlling epithelial polarity: a human enteroid model for host pathogen interactions. Cell Reports Vol 26, 9 p2509-2520.E4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.108>

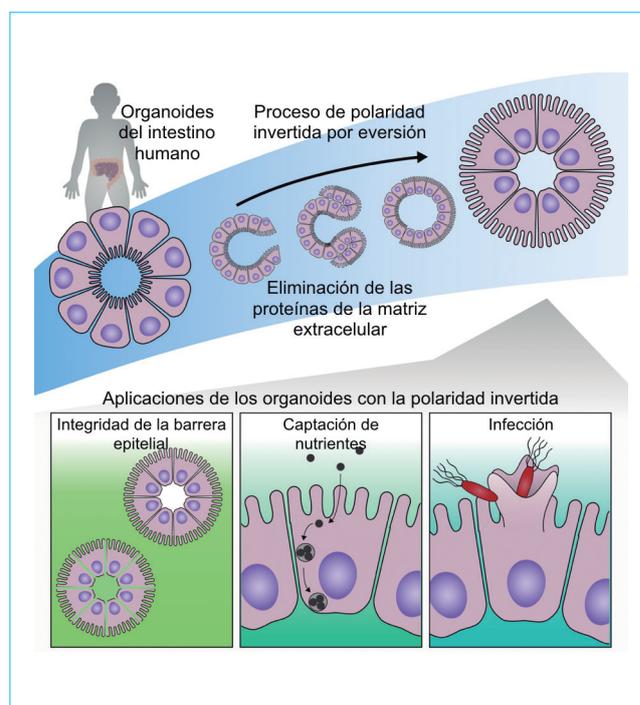


Figura adaptada al castellano del resumen gráfico del artículo Co et al., (2019) <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.108> Link: Creative Commons user license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

BIODISTRIBUCIÓN Y TRANSCITOSIS DE BACTERIÓFAGOS ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS EN TERAPIA FÁGICA ORAL



Montserrat Llagostera

Departament de Genètica i de Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona

La aplicación de bacteriófagos en terapia fágica es una estrategia alternativa o complementaria al uso de los antibióticos cada vez más investigada. Su uso permite disminuir i controlar la dispersión de bacterias resistentes a los antibióticos en ciertos ambientes como las granjas de animales, la cadena alimentaria y el ámbito hospitalario y de la comunidad.

Entre las diferentes vías de aplicación, la vía oral parece ser la más adecuada debido a su fácil administración, la reducida respuesta inmune que confiere y el mayor confort del paciente. En estudios previos, el grupo de Microbiología Molecular del Departamento de Genética y Microbiología de la UAB, dirigido por la Dra. Montserrat Llagostera, demostró que la encapsulación de los bacteriófagos en liposomas prolongaba en el tiempo la elevada efectividad de los bacteriófagos al ser administrados oralmente a pollos contaminados con *Salmonella*.

En el trabajo recientemente publicado en la revista *Frontiers in Microbiology*, se ha partido de dos hipótesis: i) los bacteriófagos encapsulados en liposomas pueden adherirse al epitelio intestinal, aumentando así su tiempo de permanencia en el tracto intestinal, y ii) los bacteriófagos encapsulados pueden atravesar la barrera intestinal y llegar a órganos internos. Para probar estas dos hipótesis dicho grupo de investigación ha aplicado una metodología de imagen no invasiva para visualizar por primera vez la biodistribución de los bacteriófagos encapsulados en liposomas (marcados con un fluorocromo) en un modelo murino. Asimismo, se ha empleado también un modelo *in vitro* de barrera intestinal, desarrollada por el grupo de Mutagénesis del Departamento de Genética y Microbiología, dirigido por el Dr. Ricard Marcos, con quien se ha colaborado.

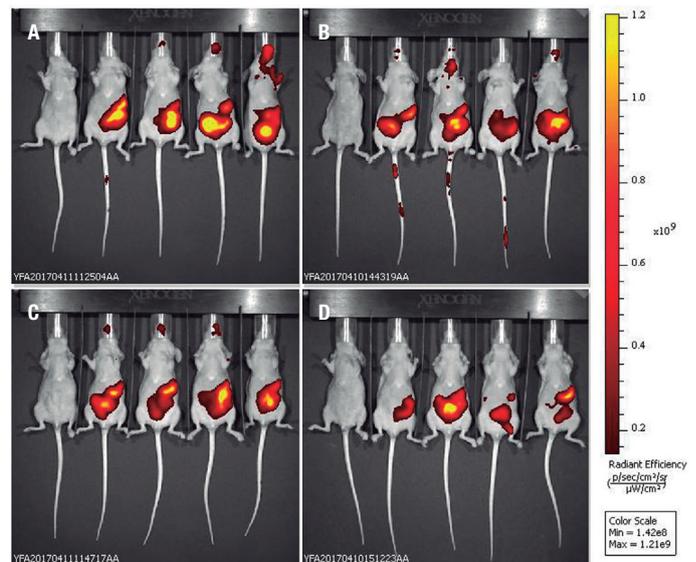
Los ensayos de biodistribución se realizaron administrando oralmente a ratones fagos encapsulados y marcados con el fluorocromo VTS-750 y visualizándolos con una metodología de imagen no invasiva IVIS Spectrum en las instalaciones del Servicio de Animal de Laboratorio y del CIBER-BBN *in vivo experimental platform* (Instituto de Investigación de la Vall d'Hebron). Con esta metodología, combinada con métodos de cultivo de órganos *ex vivo* de los ratones, se demostró que la encapsulación de los fagos da lugar a un aumento significativo de fagos encapsulados en el estómago, incluso 6 h después de su administración y sin disminuir su concentración. Además, los datos obtenidos de los órganos *ex vivo* mostraron una mayor concentración de los fagos no encapsulados respecto a los encapsulados en hígado, riñón y músculo, hasta 6 h después de su administración. Sin embargo, se detectaron bacteriófagos encapsulados en el hígado, bazo y músculo, con valores de encapsulación destacables durante todo el experimento ($38\% \pm 6,3\%$, $68\% \pm 8,6\%$ y $47\% \pm 7,4\%$, respectivamente).

Por otro lado, la aplicación de la microscopía láser de barrido confocal en cultivos *in vitro* de células intestinales humanas (Caco-2 / HT29 / Raji-B) reveló que los liposomas teñidos con el fluorocromo Vybrant-Lun y conteniendo los bacteriófagos marcados con SYBR *gold* se adhieren a las membranas de estas células.

El conjunto de los resultados obtenidos apunta a que la causa de la mayor eficacia en el tiempo de la terapia fágica oral con bacteriófagos encapsulados en liposomas, respecto a los no encapsulados, se debe a su mayor persistencia en el estómago y a su adherencia a la pared intestinal.

Para realizar la encapsulación de los bacteriófagos, se ha contado con la inestimable colaboración del grupo Supramolecular Nanochemistry and Materials del ICN2, dirigido por el profesor ICREA Daniel Maspoch.

Otero J, García-Rodríguez A, Cano-Sarabia M, Maspoch D, Marcos R, Cortés P*, Llagostera M. 2019. Biodistribution of liposome-encapsulated bacteriophages and their transcytosis during oral phage therapy. *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2019.00689.



Visión ventral de la fluorescencia *in vivo* de la biodistribución en ratones de bacteriófagos marcados con un fluorocromo no encapsulados (A, C) y encapsulados en liposomas (B, D) a las 3 y 6 horas de su administración por vía oral.

DESCUBIERTO UN NUEVO PROCESO DE RESISTENCIA A FÁRMACOS EN BACTERIAS

Jordi Barbé

Departament de Genètica i de Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona.

Investigadores de la UAB y la UMBC han descrito un nuevo proceso capaz de originar resistencia a fármacos antibacterianos sintéticos antes de su invención y en ausencia de sustancias análogas naturales que favorezcan la aparición de genes de resistencia. El estudio ha establecido que los genes de resistencia a sulfamidas aparecieron hace millones de años, a partir de una mutación en el gen diana de este fármaco.

La investigación ha sido liderada por el Dr. Jordi Barbé, investigador del Grupo de Microbiología Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) y miembro del grupo especializado de Microbiología Molecular de la SEM y el Dr. Ivan Erill, del Departamento de Biología de la Universidad de Maryland Baltimore County (UMBC), y publicado en *Frontiers in Microbiology*.

Los investigadores han analizado el gran volumen de genomas bacterianos disponibles para identificar el origen de los elementos genéticos móviles portadores de resistencia a sulfamidas que se detectan frecuentemente en superbacterias en los hospitales. Mediante el análisis comparativo de secuencias y técnicas filogenéticas, se han podido establecer que los genes de resistencia a sulfamidas aparecieron en dos familias de bacterias del suelo (*Rhodobiaceae* y *Leptospiraceae*) hace más de 600 millones de años, a partir de una mutación en el gen diana de este fármaco. Los genes identificados fueron movilizados y transferidos a otras bacterias, y seleccionados a partir del uso masivo de la sulfamida en la agricultura y en clínica, a mediados del siglo XX.

La descripción de un proceso capaz de originar resistencia a fármacos antibacterianos antes de su invención y en ausencia de sustancias análogas naturales que favorezcan la aparición de genes de resistencia tiene importantes repercusiones para el desarrollo y praxis de futuros fármacos, según los investigadores.

Los fármacos antibacterianos sintéticos como la sulfamida se obtienen a partir de sustancias químicas diseñadas íntegramente en el laboratorio, mientras que los antibióticos están basados en las producidas por microorganismos como virus, hongos, levaduras o bacterias.

En la naturaleza se pueden encontrar genes de resistencia a los antibióticos antes de su aplicación clínica, porque los mismos microorganismos los generan frente a las sustancias antibacterianas de sus competidores. Pero no es tan esperable que este fenómeno tenga lugar con los fármacos sintéticos. Y en ningún caso se ha hallado un proceso como el descrito en este estudio, identificando una mutación en el gen diana del fármaco, afirman los investigadores.

La sulfamida fue el primer antibacteriano sintético introducido en el ámbito clínico en la primera mitad del siglo pasado. Actualmente se usa en la primera línea de intervención clínica, junto con otros fármacos, sobre todo en países en desarrollo. También se utiliza mucho como tratamiento preventivo en agricultura.

“El hallazgo confirma la necesidad de usar una terapia combinada multi-fármaco que ataque varios mecanismos de resistencia en el ámbito hospitalario. Por otro lado, dado que el origen de los genes de resistencia se ha hallado en bacterias que viven en el subsuelo y en acuíferos, nos alerta de la necesidad de reducir el uso actual de antibacterianos en agricultura”, señala Ivan Erill.

“Nuestra hipótesis es que la ingente variabilidad genética de las bacterias habría favorecido la mutación de los genes de resistencia que hemos identificado, sin necesidad de que existiera la presión selectiva de la sulfamida o de ninguna sustancia similar en la naturaleza”, explica Jordi Barbé. “En este sentido, el estudio pone de relieve que el vasto pan-genoma bacteriano puede permitir seleccionar y movilizar rápidamente resistencias ya existentes ante la introducción de un fármaco de nueva síntesis”, concluye.

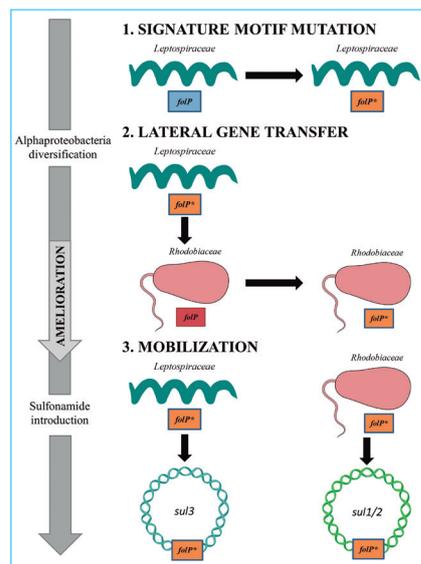


Diagrama esquemático del proceso evolutivo que conlleva a la aparición de elementos genéticos móviles que albergan sul1/2 y sul3.

Sánchez-Osuna, M., Cortés, P., Barbé, J., Erill, I. Origin of the Mobile di-hydro-pterolate synthase gene determining sulfonamide resistance in clinical isolates. *Frontiers in Microbiology*, 10 January 2019 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03332>.