

## Bacterias marinas detoxificadoras de metilmercurio: caracterización mediante aislamiento y técnicas –ómicas

Isabel Sanz-Sáez<sup>1</sup>, Andrea G. Bravo<sup>1</sup>, Silvia G. Acinas<sup>1</sup> y Olga Sánchez<sup>2</sup>



<sup>1</sup> Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ciències del Mar, ICM-CSIC, Barcelona, Catalunya, Spain

<sup>2</sup> Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Spain



Miembros del grupo de investigación. De izquierda a derecha: Dra. Andrea G. Bravo, Isabel Sanz-Sáez, Dra. Olga Sánchez y Dra. Silvia G. Acinas

Nuestra unidad de investigación se formó recientemente, en el año 2014, cuando las Dras. Silvia G. Acinas (ICM-CSIC) y Olga Sánchez (UAB) aunaron sus conocimientos y experiencia para estudiar la diversidad y función de bacterias marinas implicadas en la biorremediación de metilmercurio (MeHg). El grupo está compuesto además por la Dra. Andrea G. Bravo, investigadora postdoctoral Marie Curie, e Isabel Sanz-Sáez, becaria predoctoral FPU. Además, colaboran con el grupo distintos alumnos de máster realizando prácticas de investigación. Hasta la fecha se han finalizado 5 trabajos de final de máster y un trabajo de final de grado en relación a esta línea de investigación. Además, se ha obtenido financiación específica de un proyecto asociado a una *Beca Leonardo* a Investigadores y Creadores Culturales concedido por la Fundación BBVA – Convocatoria 2015 (BIOSENSOMICS) y mediante una beca postdoctoral Marie Curie (MER-CURE-2016).

Hoy en día, el estudio de la diversidad microbiana se ha convertido en una de las

líneas de investigación más relevantes en el área de la Ecología Microbiana, la Oceanografía y la Biotecnología. El conocimiento de la diversidad microbiana es clave no sólo por su papel en el conocimiento de la función, la estructura y la evolución de las poblaciones bacterianas que componen una comunidad microbiana en los ecosistemas marinos, sino como una fuente importante de investigación médica y biotecnológica. El desarrollo de métodos moleculares y genómicos para el estudio de la diversidad microbiana ha proporcionado una visión más realista de la gran diversidad existente en cualquier ecosistema. Los mayores avances de la ecología microbiana en los últimos años se han producido gracias a i) la inclusión de diferentes estrategias genómicas, como las técnicas de metagenómica (DNA) y metranscriptómica (RNA), basadas en el análisis de fragmentos de genes (metagenómica) y de transcritos (metatranscriptómica) de los genomas de las comunidades microbianas de ambientes naturales, ii) la

posibilidad de secuenciar genomas a partir de una única célula (*single cell genomics*) y iii) la posibilidad de reconstruir genomas microbianos a partir del co-ensamblaje de varios metagenomas (MAGs: *metagenomic assembled genomes*). Por otra parte, el aislamiento de microorganismos sigue siendo fundamental para obtener información sobre su fisiología y para testar hipótesis sobre su ecología y función, que no se puede conseguir únicamente mediante técnicas de secuenciación.

Por ello, nuestra línea de investigación combina la utilización de técnicas moleculares, genómicas y de aislamiento clásicas para el estudio de las bacterias marinas, particularmente aquellas capaces de detoxificar el metilmercurio. El metilmercurio es un compuesto altamente tóxico para la salud humana capaz de bioacumularse en los organismos y biomagnificarse en las cadenas tróficas. El interés sobre la investigación y la biorremediación del metilmercurio se considera, por

tanto, una prioridad a nivel mundial. Como consecuencia, en 2017, entró en vigor el convenio de Minamata, firmado por 128 países y ratificado ya por 98. El objetivo de este convenio internacional es reducir las emisiones de mercurio y proteger la salud humana y el medio ambiente.

Nuestra estrategia para seleccionar bacterias detoxificadoras marinas se ha centrado en primer lugar en aislar e identificar, a través de la amplificación por PCR del gen del 16S rRNA, bacterias de diferentes mares y océanos (Mediterráneo, Atlántico Norte, Atlántico Sur, Índico y Ártico), tanto de la zona fótica como de la zona profunda (hasta 4000 m), cubriendo por consiguiente un amplio gradiente vertical y latitudinal (Fig. 1). De un total de 1313 aislados (de los cuales se determinaron sus relaciones filogenéticas) se realizó un cribado funcional de bacterias resistentes al metilmercurio mediante la amplificación por PCR de los genes *merA* (mercurio reductasa) y *merB* (organomercurio liasa), implicados en la detoxificación del metilmercurio. Concretamente, la enzima organomercurio liasa (MerB) desmetila el metilmercurio a mercurio inorgánico (Hg(II)), mientras que la mercurio reductasa (MerA) convierte el Hg(II) en mercurio elemental Hg(0), un gas volátil que difunde a través de la membrana y se expulsa de la célula.

En una segunda fase, tras el cribado funcional de los genes *merA* y *merB* en los aislados marinos, se seleccionaron las cepas que presentaban los dos genes, se hicieron crecer en cultivos en presencia de cloruro de mercurio y metilmercurio, y se determinó su concentración mínima inhibitoria (CMI). A partir de estos aislados, se seleccionaron dos cepas por sus propiedades de alta resistencia y detoxificación, identificadas como *Alteromonas* y *Marinobacter* spp., se caracterizaron sus curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de metilmercurio y se cuantificaron las diferentes formas químicas de mercurio en el medio de cultivo. Para esto último, contamos con la colaboración de la Dra. Rosa del Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios, de la Universidad de Castilla-La Mancha. Además de la determinación cuantitativa del poder de detoxificación de las dos cepas testadas, se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica y de epifluorescencia con la finalidad de elucidar los posibles mecanismos

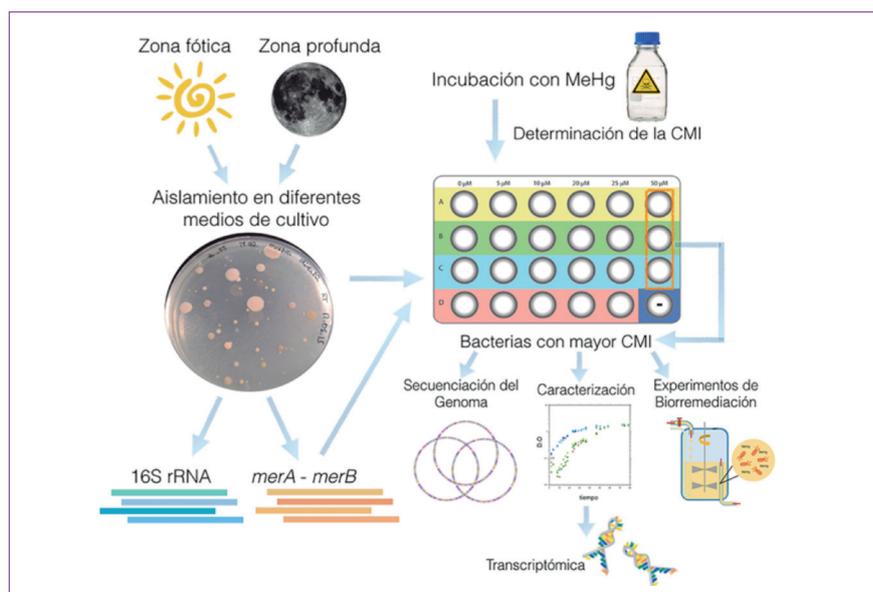


Figura 1. Enfoque metodológico para el aislamiento y caracterización de bacterias detoxificadoras del metilmercurio de diferentes muestras marinas

de detoxificación de este compuesto tóxico (acumulación o adsorción).

En una tercera fase, se ha secuenciado el genoma de la cepa con mayor resistencia al metilmercurio, con una CMI de 10 µM (y 70 µM de HgCl<sub>2</sub>), que corresponde a *Alteromonas* sp. ISS312, aislada de una muestra marina a 4000 m de profundidad del Océano Atlántico Sur. Además, como parte de un nuevo Trabajo de Fin de Máster se están realizando análisis de transcriptómica en esta cepa expuesta a 5 µM de metilmercurio y en ausencia del mismo para detectar posibles diferencias en la expresión génica y determinar qué genes pueden estar sobre-expresados en presencia de dicho compuesto.

En una cuarta fase, realizaremos también experimentos de biorremediación con bacterias aisladas de sedimentos marinos para cuantificar su potencial en la biorremediación de sedimentos contaminados con metilmercurio.

Paralelamente a estos experimentos realizados con aislados, se han llevado a cabo análisis ómicos *in silico* para detectar la presencia de genes *merA* y *merB* a partir del catálogo de genes no redundantes de la expedición de circunnavegación de Malaspina (2010) con 1.1 millones de genes. Dicho catálogo de genes procede de un total de 58 metagenomas del océano profundo, concretamente del batipelágico (de muestras

colectadas entre 1000-4000 m) y de dos fracciones de tamaño (de 0.22 a 0.8 µm y de 0.8 a 20 µm), ya que se ha evidenciado el acúmulo de metilmercurio asociado a partículas en dichas profundidades.

Finalmente, también se han reconstruido genomas bacterianos a partir de los metagenomas (MAGs), que contienen el operon *mer* para analizar los metabolismos inherentes en bacterias y arqueas con capacidad detoxificadora del metilmercurio.

## BIBLIOGRAFÍA

Sanz-Sáez I, Lara E, Salazar G, Royo-Llonch M, Vaqué D, Duarte CM, Gasol JM, Pedrós-Alió C, Sánchez O, Acinas SG. Diversity patterns of marine cultivable bacteria along vertical and latitudinal gradients. Submitted to Syst Appl Microbiol

Capilla Lloris M. (2018). Phenotyping characterization of methylmercury marine bacteria detoxifiers. Master thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.

Pla Ferriol M. (2017). Phylogenetically diverse and widespread tolerance to mercury and methylmercury of marine bacteria isolates. Master thesis, Universitat de Barcelona.

Martí-Carreras J. (2016). Biogeography profiling and expression pattern of the *merA* and *merB* genes retrieved from global deep ocean metagenomes and metatranscriptomes. Master thesis, Universitat Pompeu Fabra.

Trujillo Cuadra L. (2016). Analyses of the genes responsible for the degradation of methylmercury from marine isolated bacteria and metagenomes. Master thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.

Sanz-Sáez I. (2015). Isolating marine microorganisms from the deep sea. Master thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.