

Grupo Ecología y Biotecnología Microbianas

PERE PICART FAIGET, MERCEDES BERLANGA HERRANZ

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona. Departamento de Sanidad, Salud y Medio Ambiente, Sección Microbiología.

✉ perepicart@ub.edu | mberlanga@ub.edu

El grupo de ecología y biotecnología microbianas de la unidad de microbiología de la facultad de farmacia está formado actualmente por dos investigadores principales, el Dr. Pere Picart y la Dra. Mercedes Berlanga, que se formaron y continúan desarrollando las líneas de investigación de grupos previamente consolidados. El Dr. Picart proviene del grupo de biotecnología microbiana fundado en los años 90 por los doctores Javier Pastor y Pilar Díaz en la Facultad de Biología (recientemente jubilados). Por su parte, la Dra. Berlanga se ha formado y en la actualidad continúa colaborando con el Dr. Ricard Guerrero, cuyo grupo se inició en la década de los 70 en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona y luego se trasladó en 1988 a la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. Los otros integrantes actuales del grupo son Arnau Blasco, técnico contratado a través de un proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología, el estudiante de doctorado industrial Jordi Ferrando y la estudiante de máster Pilar Marcos.

En la naturaleza, las bacterias rara vez crecen como cultivos axénicos y de forma planctónica (libres en un medio líquido). Más bien, predominan como comunidades sésiles que se desarrollan formando biofilms sobre superficies inertes o mucosas como las del tracto gastrointestinal humano y de otros animales. Los consorcios microbianos en ambientes naturales suelen ser estables básicamente porque la co-evolución de los miembros constituyentes afecta a sus interacciones, que son la base de la funcionalidad de las comunidades microbianas en un determinado hábitat. Nuestros principales retos serían identificar las poblaciones bacterianas clave que influyen en la coexistencia estable de microorganismos que comparten un mismo hábitat, como los tapetes microbianos del delta del Ebro, los biofilms complejos de las lagunas endorreicas salinas del desierto de los Monegros

y/o lagunas alcalinas de Coca, Segovia. Además, pretendemos diseñar microcosmos con poblaciones microbianas definidas para estudiar en detalle las interacciones entre ellas, cómo responden a perturbaciones y su capacidad de recuperación o resiliencia. Estos ambientes naturales son también una importante fuente de microorganismos con actividades enzimáticas o que producen compuestos bioactivos de potencial interés industrial y biotecnológico. Por ello, otro de nuestros retos es mejorar los métodos de cultivo axénico de las poblaciones bacterianas de estos hábitats para facilitar su estudio. Para alcanzar estos objetivos, combinaremos aproximaciones moleculares de metagenómica con técnicas clásicas de microbiología para obtener una comprensión integral de la estructura y funciones de estos consorcios microbianos complejos. El uso de diferentes enfoques experimentales nos permitirá elucidar tanto los mecanismos ecológicos que determinan la composición de las comunidades bacterianas, como explotar su potencial biotecnológico mediante el aislamiento dirigido de cepas de interés. Recientemente, los estudios realizados en los tapetes microbianos de la Camarga (delta del Ródano) han revelado una gran diversidad y complejidad de las comunidades microbianas en los tapetes, con más de 30 phyla bacterianos, en los que se ha comprobado que la comunidad muestra una función homeostática para adaptarse a fluctuaciones ambientales estacionales, manteniendo su estratificación característica. Análisis bioinformáticos han permitido la identificación de rutas metabólicas como la fijación de carbono (vía Wood-Ljungdahl), nitrificación en capas superiores y desnitrificación en las capas profundas, así como la detección de señales de estrés oxidativo, osmótico y por nutrientes, especialmente en la capa superficial. En conjunto, estos estudios aportan un conocimiento integral sobre la estructura, composición, interacciones y funciones eco-

lógicas de las comunidades microbianas en los tapetes de la Camarga (1, 2).

En el campo de la biotecnología, nuestro reto científico consiste en la modificación de microorganismos (bacterias y levaduras) para producir de forma recombinante todo tipo de enzimas degradadores de lignocelulosa (celulasas, amilasas, xilanasas, etc), biocompuestos activos y otros biopolímeros (nanocelulosa, polihidroxibutirato, etc), de una forma sostenible, mediante el uso de sustratos baratos y residuos agrícolas, y en condiciones respetuosas para el medio ambiente. Con este objetivo, nuestro grupo de investigación ha adoptado una estrategia basada en el sistema CRISPR-Cas9, mediante el cual, se puede realizar cualquier modificación en el genoma de la cepa recombinante a mejorar, evitando el uso de antibióticos, cuya restricción es imperativa debido a la aparición de las bacterias multirresistentes, y utilizando promotores autoinducibles, así abaratando los costes derivados del uso de inductores como el IPTG o la xilosa.

En uno de los proyectos más recientes, se ha querido optimizar y maximizar la producción de un pigmento amarillo (carotenoide), puesto que se ha observado un papel relevante de éste en estimular el sistema inmune y una potente acción antioxidante. La producción de carotenoides en la actualidad está dominada por síntesis química (bajo condiciones muy agresivas) y su extracción a partir de plantas (no sostenible y perjudicial para el medio ambiente). Nuestra alternativa se centra en la producción biotecnológica de este pigmento utilizando como huésped una cepa de *Bacillus subtilis*. Mediante el uso del sistema CRISPR-Cas9, se integraron varias copias de la ruta metabólica responsable de la producción de este pigmento en el genoma de la cepa bacteriana, bajo control de un promotor fuerte y constitutivo. A continuación, se realizó ingeniería metabólica para aumentar el flu-

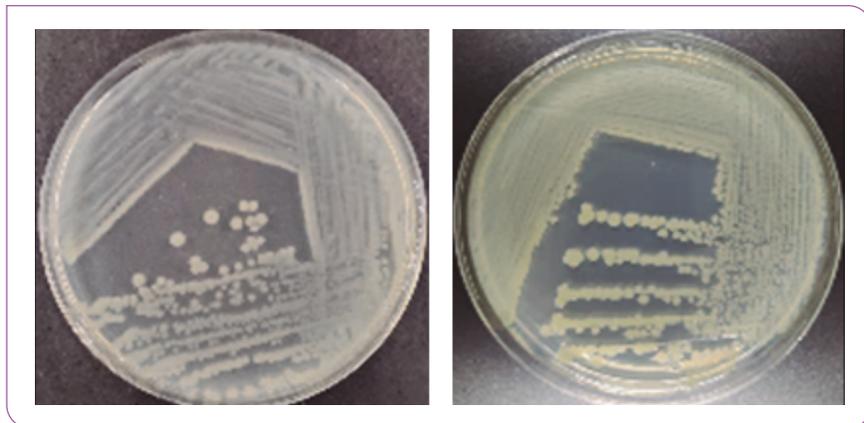


Figura 1. Cepa parental y cepa recombinante expresando el carotenoide amarillo.

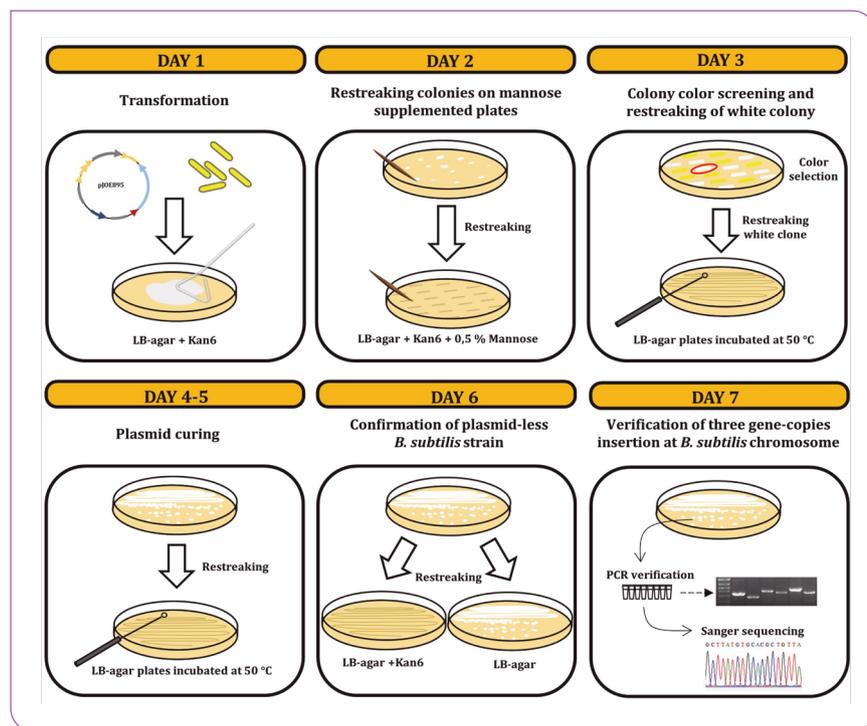


Figura 2. Representación esquemática del sistema colorimétrico de screening para insertar múltiples copias de un gen de interés en el genoma de *B. subtilis* en un único paso.

jo metabólico dirigido hacia la síntesis de los precursores responsables de la síntesis de dicho pigmento, y se suprimieron las vías complementarias que consumían dichos precursores. La combinación de todas estas modificaciones genéticas no sólo incrementó significativamente la producción del pigmento deseado, sino que nos permitió obtener una cepa bacteriana capaz de sintetizar el pigmento de forma endógena, sin antibióticos ni inductores, al cultivarla en el laboratorio (Filluelo *et al.*, 2023). En la **Figura 1** se observa la cepa parental de *B. subtilis* y la cepa final resultante de color amarillo. Actualmente, estrategias de optimización

del medio de cultivo y de las condiciones fermentativas a nivel de biorreactor están siendo abordados para desarrollar un proceso viable económicamente.

En otro proyecto muy reciente, se utilizó la cepa productora de pigmento (color amarillo) para desarrollar por primera vez un método de screening (amarillo/blanco) que nos permitiera, en un solo paso, la inserción de hasta 3 copias de un gen de interés en el genoma de *B. subtilis* mediante la tecnología CRISPR-Cas9. De este modo, se pretende maximizar la expresión de cualquier enzima de interés

de una forma sencilla y visual. La cepa parental amarilla presenta 3 copias de los genes *crtMN* que posibilitan la formación del pigmento amarillo. Tras su transformación con el vector CRISPR-Cas9, se posibilita la sustitución de las 3 copias del gen *crtMN* por nuestro gen de interés, tal que, las cepas en las que la edición genómica no ha funcionado o mantienen alguna copia del gen *crtMN* permanecen amarillas, mientras que los triples mutantes (con tres copias de nuestro gen de interés bajo un promotor constitutivo) pasan a color blanco, facilitando la identificación de los clones recombinantes positivos (**Figura 2**). Este sistema se testó para la producción recombinante de una amilasa, obteniéndose elevados valores de producción al aumentar el número de copias del gen deseado. De este modo, la nueva metodología desarrollada permite la obtención de cepas de *B. subtilis* libres de plásmidos y de marcadores de selección, estables y sobreproductoras del enzima de interés en tan solo siete días, demostrando el gran potencial que la implementación de esta tecnología puede traer en el ámbito de la biotecnología (Ferrando *et al.*, 2023). Dicha tecnología está siendo testada actualmente para la producción de celulasas, y para la obtención de bioplásticos (PHB).

Bibliografía

- Berlanga M, Palau M, Guerrero R (2022) Community homeostasis of coastal microbial mats from the Camargue during winter (cold) and summer (hot) seasons. *Ecosphere* 13:e3922.
- Berlanga M, Picart P, Blasco A, Beniges-Fernandez R, Guerrero R, Butturini A, Urmeneta J. Elucidating biodiversity and potential functionality of biofilm-sediments biotope in La Muerte lagoon, Monegros desert, Spain: An integrative study comparison with water column biotope (submitted)
- Ferrando J, Filluelo O, Zeigler DR, Picart P. Barriers to simultaneous multilocus integration in *Bacillus subtilis* tumble down: development of a straightforward screening method for the colorimetric detection of one-step multiple gene insertion using the CRISPR-Cas9 system. *Microb Cell Fact.* 2023 Jan 31;22(1):22.
- Filluelo O, Ferrando J, Picart P. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* toward the efficient and stable production of C₃₀-carotenoids. *AMB Express.* 2023 Apr 29;13(1):38.