

Ecología Microbiana Molecular: del ambiente al laboratorio y vuelta al ambiente

PEPA ANTÓN*, VÍCTOR BLASCO-BIRLANGA, BEATRIZ CÁMARA, MIRYAM CARRILLO-BAUTISTA, ESTHER DÍAZ-ARINERO, AITANA ESCOLANO-VICO, VALENTIN GANGLOFF, CRISTINA LÓPEZ, ANA BELÉN MARTÍN-CUADRADO, FRANCISCO NADAL-MOLERO, LAURA PÉREZ-MARTÍN, ESTHER RUBIO-PORTILLO, RODRIGO SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, FERNANDO SANTOS

Grupo de Ecología Microbiana Molecular, Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Carretera de San Vicente s/n, 03690 Sant Vicent del Raspeig, Alicante.

✉ anton@ua.es



Miembros del grupo de Ecología Microbiana Molecular (de izquierda a derecha): Rodrigo Sánchez-Martínez, Fernando Santos, Valentin Gangloff, Pepa Antón, Miryam Carrillo-Bautista, Aitana Escolano-Vico, Esther Díaz-Arinerero, Laura-Pérez-Martín, Beatriz Cámara, Ana Belén Martín-Cuadrado, Cristina López, Víctor Blasco-Birlanga, Francisco Nadal-Molero, Esther Rubio-Portillo.

Presentación e historia del grupo

El grupo de Ecología Microbiana Molecular de la Universidad de Alicante inició sus actividades en 1999 de la mano de Pepa Antón. Pronto, el grupo obtuvo sus primeros proyectos financiados, incluyendo uno en colaboración con Ramón Rosselló-Móra (IMEDEA), estableciendo así una colaboración fructífera y duradera. Estos primeros proyectos sentaron las bases de las principales líneas de investigación del grupo durante gran parte de su trayectoria: virus en ambientes hipersalinos, diversidad procarionótica de ambientes hipersalinos, *Salinibacter ruber* y microbiota de invertebrados

marinos. A lo largo de más de dos décadas, numerosos investigadores han pasado por el grupo, además de muchos estudiantes que han llevado a cabo proyectos de fin de Grado y fin de Máster con el equipo. Actualmente el grupo cuenta con catorce miembros, firmantes de este trabajo, presentados en orden alfabético.

Principales líneas de investigación

El grupo comenzó su andadura estudiando la diversidad procarionótica de ambientes hipersalinos. En particular, el modelo que más se ha estudiado ha sido la bacteria

halófila extrema *Salinibacter ruber*. Desde que *Sal. ruber* fuese aislado por primera vez, se ha estudiado intensivamente en trabajos posteriores y se ha visto que presenta una elevada diversidad intraespecífica, lo que le convierte en un modelo ideal para estudios de microdiversidad y de interacciones virus-hospedador. El estudio de las interacciones de *Sal. ruber* y sus virus se ha realizado empleando técnicas tanto dependientes como independientes de cultivo. De hecho, el aislamiento de virus que infectan a diferentes cepas de *Sal. ruber* ha permitido la caracterización detallada de las interacciones de esta bacteria y sus virus. Por otra parte, en nuestro grupo hay un gran esfuerzo en caracterizar consorcios microbianos de ambientes hiper-

salinos formados por nanohaloarqueas, nanohalovirus y haloarqueas, para poder descifrar el papel ecológico de cada uno de ellos, así como sus interacciones. Para ello se están utilizando diferentes herramientas bioinformáticas y experimentales.

En los inicios del grupo también hubo un claro interés en el estudio de la microbiota de invertebrados marinos, como ascidias y corales. Actualmente, estamos también llevando a cabo la caracterización de la microbiota asociada *Posidonia oceanica* y a sedimentos de ambientes eutrofizados, ya que estudios previos describen la producción de compuestos bioactivos de interés médico e industrial en estos tipos de muestras. Gracias a la colaboración entre varias instituciones de múltiples países, el proyecto europeo "Bluetools", del que formamos parte, pretende encontrar nuevas moléculas de interés a partir del estudio funcional de estas comunidades microbianas.

Siguiendo con el estudio de ambientes acuáticos, una parte de nuestro grupo está centrada en la bacteria del género *Vibrio*, que se encuentra ampliamente distribuida, desde aguas costeras y marinas hasta ríos y estuarios. Las técnicas clásicas de cultivo subestiman el número de especies microbianas de una muestra natural, siendo especialmente relevante en el caso de los vibrios, no sólo por su papel ecológico, sino también por su potencial patogénico. Además, los factores de virulencia en *Vibrio* están frecuentemente asociados a elementos genéticos móviles encontrados en sus virus. Por esta razón, uno de los objetivos de esta línea se centra en el estudio comparativo de las poblaciones naturales de *Vibrio* y sus virus en los puntos clave del ciclo del agua, y la posible dispersión de factores de virulencia, mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.

Con el tiempo, el interés del grupo se ha ido diversificando hacia el estudio de otros ambientes naturales, siempre dentro del marco de la Ecología Microbiana. Empleando técnicas de culturomica de alto rendimiento, se han seleccionado una serie de biomas (aguas residuales, agua de mar, agua dulce y sedimentos marinos) expuestos a diferentes grados de impacto antropogénico, con el fin de aislar en cultivo puro un número importante de procariontes y sus virus. Los hospedadores bacterianos son seleccionados en base a su ubicuidad en estos ambientes y su impacto en la salud humana. A partir de estos hospedadores se está obteniendo una gran colección de

virus, que se pretende caracterizar a nivel genómico y de rango de hospedador, con especial énfasis en aquellos con aplicaciones futuras en terapia fágica.

Sin embargo, una gran parte de los microorganismos de muestras naturales no son cultivables en el laboratorio, constituyendo la denominada "materia oscura microbiana". Algunas de las limitaciones asociadas a la culturomica han sido solventadas por la metagenómica. No obstante, los métodos actuales de metagenómica y bioinformática no son capaces de recuperar algunas poblaciones microbianas importantes debido a sesgos y limitaciones en los pasos de muestreo o ensamblaje de las secuencias. En nuestro grupo, con el fin de ir cerrando esta brecha de conocimiento, estamos utilizando la microfluídica, una tecnología que permite la encapsulación individual de células, virus o incluso moléculas individuales de DNA en gotas microscópicas, que actuarán como microcompartimentos, donde se podrán llevar a cabo reacciones de PCR dirigidas a regiones de interés. Esta técnica permite el cribado y separación de aquellas células individuales positivas para cualquier gen diana, lo que la convierte en una técnica muy poderosa en el campo de la Ecología Microbiana, dado que posibilita el estudio de los componentes minoritarios de un microbioma de manera independiente a los componentes mayoritarios.

Uno de los principales objetivos del grupo, como se ha comentado previamente, es el estudio de las asociaciones virus-hospedador en ambientes naturales utilizando diferentes enfoques. Uno de ellos se basa en análisis bioinformáticos *in-silico*, usando características de las secuencias genómicas capaces de cambiar de posición entre una o varias moléculas de ADN. Estas secuencias se encuentran en diferentes virus de bacterias y arqueas, por lo que supone una herramienta valiosa para descubrir nuevas interacciones virus-hospedador. Otra aproximación para la asociación virus-hospedador está basada en la captura de uniones de fragmentos de ADN que están físicamente cercanos entre sí, por lo que se emplea para detectar pares virus-procarionta aprovechando el momento de infección de un virus a una célula. Estas técnicas nos están permitiendo ir desvelando estas interacciones en ambientes marinos, de agua dulce y aguas residuales.

Por último, una de las líneas que más recientemente se ha asentado en nuestro

grupo es el estudio de *biofilms* de redes urbanas de agua potable. La importancia de estudiar esos *biofilms* radica en la capacidad de los microorganismos de persistir en dichos sistemas, influyendo en la calidad del agua, la integridad de las infraestructuras y la bioseguridad. Estas estructuras biológicas son particularmente resilientes a los tratamientos rutinarios, y pueden ser un nicho para el desarrollo de patógenos y genes de resistencia a antibióticos, representando una amenaza directa para la bioseguridad. Aplicando análisis metataxonómicos y metagenómicos, nuestro grupo investiga las diferencias de diversidad microbiana y funcional entre los *biofilms* y las fracciones planctónicas. Estas estrategias nos permiten obtener datos claves sobre las bacterias implicadas en la formación y estabilidad de los *biofilms*, así como sobre las interacciones virus-hospedador y la actividad enzimática relacionada con la formación o degradación de los exopolisacáridos de la matriz del *biofilm*.

Una descripción más detallada de las actividades del grupo, sus colaboraciones y los proyectos financiados se puede encontrar en: <https://mme-research.com/>

Bibliografía

- Castillo D et al.** Widespread distribution of prophage-encoded virulence factors in marine *Vibrio* communities. *Sci. Rep.* 8, 9973 (2018).
- Lim SW, Tran TM, & Abate AR.** PCR-Activated Cell Sorting for Cultivation-Free Enrichment and Sequencing of Rare Microbes. *PLOS ONE* 10, e0113549 (2015).
- Paul SI et al.** Bioprospecting Potential of Marine Microbial Natural Bioactive Compounds. *J. Appl. Biotechnol. Rep.* 8, 96-108 (2021).
- Villamor J et al.** Characterization of ecologically diverse viruses infecting co-occurring strains of cosmopolitan hyperhalophilic Bacteroidetes. *ISME J.* 12, 424-437 (2018).
- Wu R et al.** Hi-C metagenome sequencing reveals soil phage-host interactions. *Nat. Commun.* 14, 7666 (2023).
- Zhang H-H et al.** Unexpected invasion of miniature inverted-repeat transposable elements in viral genomes. *Mob. DNA* 9, 19 (2018).