

Taxonomía, biodiversidad y aplicaciones biotecnológicas de las bacterias halófilas

FERNANDO MARTÍNEZ-CHECA, VICTORIA BÉJAR, ANA DEL MORAL, AMALIA ROCA, INMACULADA SAMPEDRO E INMACULADA LLAMAS

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada.

Laboratorio de Microbiología. Instituto de Biotecnología. Centro de Investigación Biomédica. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Universidad de Granada. 18100 Granada.

✉ fmcheca@ugr.es | illamas@ugr.es



Miembros del grupo "Exopolisacáridos Microbianos" BIO 188 de la UGR. De izquierda a derecha: Ana del Moral, Cristina Domínguez, Inmaculada Llamas, Inmaculada Sampedro, Amalia Roca, Fernando Martínez-Checa, Patricia Sánchez, Victoria Béjar, Antonio Lamparero. Más información en www.bio188.es.

El equipo de investigación "Exopolisacáridos Microbianos" (BIO 188 Junta de Andalucía) de la Universidad de Granada, comenzó su trayectoria en los años 90 bajo la dirección de la Dra. Emilia Quesada hasta su jubilación en 2016. Posteriormente, fue la Dra. Victoria Béjar quien tomó las riendas del grupo hasta 2022 y desde esa fecha hasta la actualidad lo dirige la Dra. Inmaculada

Llamas. El grupo está formado por cinco profesores, un investigador contratado Ramón y Cajal y un becario predoctoral. Además, anualmente contamos con la colaboración de estudiantes que realizan sus Trabajos de Fin de Grado y de Máster. Para obtener más información sobre los integrantes del equipo y las actividades del grupo, se puede visitar la página web <https://www.bio188.es/>

La línea de investigación principal sigue siendo el estudio de la biodiversidad de ambientes hipersalinos. Se han caracterizado taxonómicamente numerosas bacterias halófilas y se han estudiado las potenciales aplicaciones en biotecnología de sus exopolisacáridos (EPS). Además, se han abierto nuevas líneas en el área de la agricultura y acuicultura apoyadas en estrategias basadas en la interferencia de

la comunicación celular de bacterias patógenas dependientes de sistemas *quorum sensing* (QS).

Desarrollamos una elevada transferencia de conocimiento: tenemos varias patentes, una de las cuales, internacional, aprobada en USA, China y Europa ha sido explotada por la *spin off* ligada al grupo Xtrem Biotech (2013-2022); actualmente ha sido transferida a Inovex Bio. Igualmente, dos de nuestros polisacáridos están siendo comercializados por Lipotec (Cellynkage® y Nocturshape®) y reportan *royalties* a la UGR desde 2012.

Nuestro grupo colabora con distintos grupos de investigación nacionales e internacionales y pertenece a la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos (RedEX) que engloba más de una veintena de grupos de investigación de distintas universidades, así como de centros del CSIC de toda España.

Taxonomía y Biodiversidad

Nuestro grupo trabaja desde los años 90 en el aislamiento y caracterización de nuevos procariotas halófilos y en la última década, aplicando técnicas que nos permiten aislar microorganismos que hasta el momento no han podido ser cultivados por métodos convencionales. Una de estas técnicas consiste en el método de dilución a extinción. Con esta metodología hemos hallado nuevas especies como *Roseovarius ramblicola*, *Marinobacterium ramblicola*, *Peribacillus castrilensis*, así como *Blastomonas quesadae* y *Roseovarius bejariae* cuyos nombres son en honor de las Dras. Emilia Quesada y Victoria Béjar por su notable contribución durante años al estudio de los microorganismos halófilos (Castro *et al.*, 2017; 2018; 2020; Durán-Viseras *et al.*, 2021; Rodríguez *et al.*, 2022).

Hemos iniciado una colaboración con el profesor Jesús Párraga del grupo de investigación "Ciencias del Suelo y Geofarmacia" (RNM127) para estudiar las características biológicas de las partículas de polvo sahariano que llegan a la península en los, cada vez más frecuentes, eventos de calima. Los "iberulitos", descubiertos por el profesor Párraga, son partículas gigantes (50-200 µm de diámetro) cuasi-esféricas generadas en la troposfera con un destacado papel

como portadores de microorganismos. Los microorganismos aerotransportados, viajan largas distancias para luego dispersarse a nuevas ubicaciones. Las partículas de polvo suspendidas en el aire protegen las células bacterianas de la desecación y favorecen su supervivencia debido a su alto contenido en nutrientes y agua atmosférica.

En un estudio recientemente publicado (Navarro *et al.*, 2024b), se analizaron muestras de lluvia de barro recogidas en Granada durante episodios de calima. Mediante microscopía electrónica de barrido se observaron por primera vez nanobacterias en muestras de lluvia de barro. Un análisis de "metabarcoding" determinó la presencia de miembros pertenecientes a los filos *Bacillota* y *Pseudomonadota* constituyendo el 18% y 23%, respectivamente, de toda la comunidad procariota. En cuanto a la comunidad fúngica, se detectó una gran abundancia de *Ascomycota* y, dependiendo del origen, la presencia de *Chytridiomycota*. Mediante análisis del ARNr 16S se identificaron 18 bacterias cultivables, pertenecientes la mayoría a los filos *Pseudomonadota* y *Bacillota*.

Las Islas Canarias, por su situación estratégica, son una de las regiones que más partículas de polvo sahariano reciben, aumentando año tras año debido al cambio climático. Se ha realizado un estudio recolectando, en este caso, muestras de polvo (deposición seca) de eventos de calima entre los años 2021 y 2022 (Navarro *et al.*, 2024a). Se han identificado 23 microorganismos mediante secuenciación del ARNr 16S como miembros de los filos *Pseudomonadota*, *Bacillota* y *Actinomycetota*. Algunos como *Peribacillus frigoritoleras*, presentan propiedades promotoras del crecimiento vegetal (*Plant Growth Promoting*, PGP) y otros son potenciales patógenos humanos como *Acinetobacter lwoffii*. La presencia de polvo sahariano e "iberulitos" en las Islas Canarias, junto con los componentes biológicos transportados, bacterias y hongos, podrían tener un impacto significativo tanto en el ecosistema, como en la salud humana.

Estrategias de control frente al estrés biótico y abiótico

Otra destacada línea de investigación estudia la comunicación celular tipo QS

en bacterias halófilas. Describimos por primera vez la existencia de estos sistemas en *Halomonas* (Llamas *et al.*, 2005) y en 43 miembros más de la familia *Halomonadaceae*. Se caracterizó el sistema QS, las moléculas autoinductoras de tipo *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) y el sistema GacA/GacS en *H. anticariensis* FP35^T que controla tanto la producción de AHLs como la del EPS sintetizado por esta bacteria. El estudio de los sistemas QS se orientó a la implicación en la virulencia de patógenos marinos tales como *Vibrio mediterranei* VibC-Oc-097, *V. owensii* VibC-Oc-106 y *V. coralliilyticus* VibC-Oc-193, (Torres *et al.*, 2018) y actualmente se está llevando a cabo en otras especies en las que no se había descrito anteriormente.

El grupo asimismo viene realizando una investigación dirigida a desarrollar una nueva estrategia biológica, sostenible y ecológica para prevenir y combatir las enfermedades infecciosas que afectan a la acuicultura. Se han seleccionado bacterias marinas no patógenas procedentes de tanques de peces y moluscos, y sus enzimas, con actividad *quorum quenching* (QQ), esto es, capaces de inhibir la comunicación QS dependiente de AHLs de las bacterias patógenas y con ello, la virulencia. Los ambientes salinos han demostrado ser una importante fuente de bacterias con estas actividades enzimáticas (Torres *et al.*, 2019). Entre las bacterias ensayadas destaca la cepa *Alteromonas stellipolaris* PQQ42 con gran actividad QQ en ensayos *in vivo* en corales y artemias frente a patógenos del género *Vibrio*, mostrándose una atenuación de la virulencia y un aumento de la supervivencia de los invertebrados marinos. Otras cepas seleccionadas por su capacidad para interferir los sistemas QS de patógenos fueron *Stenotrophomonas maltophilia*, *Psychrobacter faecalis* y *Rheinheimera aquimaris*.

En los últimos años, esta línea de investigación se ha orientado a la lucha contra las bacterias fitopatógenas para promover una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente. Se han ensayado bacterias autóctonas de ambientes salinos tales como Fuente de Piedra (Antequera, Málaga), Rambla Salada (Murcia) y el Saladar de El Margen (Granada), con unas características biotecnológicas únicas para sustituir los compuestos químicos utilizados en agricultura. En este sentido, se han seleccionado bacterias con características promotoras del crecimiento vegetal (acti-

vidad PGP) y que hidrolicen las moléculas AHLs de diferentes bacterias fitopatógenas (actividad QQ) implicadas en el control de numerosos factores de virulencia. Entre las bacterias PGP-QQ ensayadas destacan las bacterias *Bacillus toyonensis* AAEC1, *B. halotolerans* B16, *Pseudomonas segetis* P6, *Peribacillus castrilensis* N3, *Staphylococcus equorum* EN21 y *Kushneria endophytica* B23. Estas bacterias PGP-QQ además de exhibir un gran potencial PGP, presentan la capacidad para proteger a plantas y frutos del ataque de fitopatógenos (Roca *et al.*, 2024; Rodríguez *et al.*, 2020). Algunas de ellas han mostrado resultados prometedores en la osmoprotección frente a la salinidad en plantas de tomate. Otros estudios han demostrado un efecto de sinergia en la tolerancia al estrés salino en plantas tratadas con la bacteria *P. castrilensis* N3 y el EPS maurano de *Halomonas maura*. La tolerancia a este tipo de estrés abiótico se ha confirmado mediante el análisis tanto de osmoprotectores como de la expresión de genes de transporte de Na⁺ (Sánchez *et al.*, 2023). Todos los resultados obtenidos han confirmado el gran potencial de estas cepas halotolerantes para ser utilizadas como agentes promotores del crecimiento vegetal y de la tolerancia tanto a estrés biótico como abiótico. Esta estrategia resulta muy prometedora como una alternativa ecológica frente al abuso de productos químicos para mejorar el rendimiento y producción de los cultivos.

Publicaciones seleccionadas

- Castro DJ, Llamas I, Béjar V, Martínez-Checa F** (2017). *Blastomonas quesadae* sp. nov., isolated from a saline soil by dilution-to-extinction cultivation. *Int J Sys Evo Microbiol.* 67: 2001-2007. doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001902>
- Castro DJ, Cerezo I, Sampedro I, Martínez-Checa F** (2018). *Roseovarius ramblicola* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Spain. *Int J Sys Evol Microbiol.* 68: 1851-1856. doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002744>
- Castro DJ, Gómez-Altuve A, Reina JC, Rodríguez M, Sampedro I, Llamas I, Martínez-Checa F** (2020). *Roseovarius bejariae* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a hypersaline steep-sided river bed. *Int J Sys Evol Microbiol.* 70: 3194-3201 doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004154>
- Durán-Viseras A, Castro DJ, Reina JC, Béjar V, Martínez-Checa F** (2021). Taxogenomic and Metabolic Insights into *Marinobacterium ramblicola* sp. nov., a New Slightly Halophilic Bacterium Isolated from Rambla Salada, Murcia. *Microorganisms.* 9: 1654-1670. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081654>
- Llamas I, Quesada E, Martínez-Cánovas, MJ, Gronquist M, Eberhard A, González JE** (2005). Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of *N*-acylhomoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. *Extremophiles* 9: 333-341. doi: <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0448-1>
- Navarro A, Del Moral A, De Pablos I, Delgado R, Párraga J, Martín-García JM, Martínez-Checa F** (2024a). Microorganisms isolated from saharan dust intrusions in the Canary Islands and processes of mineral. *Appl Sci.* doi: <https://doi.org/10.3390/app14051862>
- Navarro A, Del Mora, A, Weber B, Weber J, Molinero A, Delgado R, Parraga J, Martínez-Checa F** (2024b). Microbial composition of saharan dust plumes deposited as red rain in Granada (southern Spain). *Sci Total Environ.* 25: 913. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169745>
- Roca A, Cabeo M, Enguidanos, C, Martínez-Checa F, Sampedro I, Llamas I** (2024). Potential of the quorum-quenching and plant-growth promoting halotolerant *Bacillus toyonensis* AA1EC1 as biocontrol agent. *Microb Biotechnol.* 17: 1-19. doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14420>
- Rodríguez M, Reina JC, Sampedro I, Llamas I, Martínez-Checa F** (2022). *Peribacillus castrilensis* sp. nov.: A plant-growth-promoting and biocontrol species isolated from a river otter in Castril, Granada, Southern Spain. *Front Plant Sci.* 13: 896728. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.896728>
- Rodríguez M, Torres M, Blanco L, Béjar V, Sampedro I, Llamas I** (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Sci Rep.* 10: 4121. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61084-1>
- Sánchez P, Castro-Cegrí A, Sierra S, Garrido D, Llamas I, Sampedro I, Palma F** (2023). The synergy of halotolerant PGPB and mauran mitigates salt stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) via osmoprotectants accumulation. *Physiol Plant.* 175: 1-13. doi: <https://doi.org/10.1111/pp1.14111>
- Torres M, Dessaux Y, Llamas I.** (2019). Saline environments as a source of potential quorum sensing disruptors to control bacterial infections: a review. *Mar Drugs.* 17: 191. doi: <https://doi.org/10.3390/md17030191>
- Torres, M., Reina, JC., Fuentes-Monteverde, JC., Fernandez, G, Rodriguez, J., Jimenez, C., Llamas, I.** (2018). AHL-lactonase expression in three marine emerging pathogenic *Vibrio* spp. reduces virulence and mortality in brine shrimp (*Artemia salina*) and Manila clam (*Venerupis philippinarum*). *PLoS One.* 13: 1-23. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195176>