

Grupo de Ecología Microbiana de la Universidad Autónoma de Barcelona

ANTONIO SOLÉ

Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Campus de la UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), 08193, Barcelona.

✉ Antoni.sole@uab.cat



De izquierda a derecha; Dr. Eduard Villagrasa, Nadia Bahavar, Dra. Isabel Esteve, Dr. Antonio Solé, Dra. Laia Millach, Neus Bonet, Cristina Sosa.

El grupo de Ecología Microbiana de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), está especializado en el aislamiento y cultivo de los microorganismos fototrófos, sobre todo cianobacterias, de ambientes extremos. Nuestros principales objetivos son: el estudio del efecto tóxico que producen los metales en dichas poblaciones; su potencial como bioindicadores/biorremediadores de ambientes contaminados por metales pesados, y la optimización, aplicación y validación de técnicas tanto de microscopía óptica como

de microscopía electrónica de alta resolución para llevar a cabo tales estudios. Todo ello aplicado a diferentes niveles: cultivo, microcosmos y ambiente natural ya sea contaminado o no por metales pesados.

El equipo de investigación está coordinado actualmente por el **Dr. Antonio Solé** (profesor contratado doctor) y anteriormente por la **Dra. Isabel Esteve** (catedrática-profesora honoraria) hasta su fallecimiento en octubre de 2020 y en él se han formado en los últimos 5 años:

el **Dr. Eduard Villagrasa** (doctorado en microbiología), la **Dra. Laia Millach** (doctorado en microbiología) y diferentes estudiantes de doctorado (**Nadia Bahavar**), máster (**Neus Bonet**, **Diana Gutiérrez**) y prácticas de grado (**Anna Roviroso**, **Anna Rosado**). Actualmente, el grupo lo completa la técnica de laboratorio **Judit Carbonell** que recientemente ha sustituido a **Cristina Sosa**.

La contaminación ambiental por metales pesados, a causa de su elevado potencial

tóxico, es un problema grave que afecta a los seres vivos y altera la microbiota de los ecosistemas acuáticos y terrestres, teniendo en cuenta que son especialmente liberados al medio por actividades antropogénicas. Un ejemplo de hábitat donde la agricultura y la industria son las principales fuentes de contaminación es el delta del río Ebro. En esta área se encuentran los tapetes microbianos, ecosistemas naturales costeros formados por comunidades microbianas bentónicas verticalmente estratificadas en capas, donde los microorganismos se hallan en constante interacción con el material inorgánico que los rodea y según los microgradientes de parámetros fisicoquímicos predominantes: luz, temperatura, salinidad, oxígeno y sulfhídrico, entre otros. Las cianobacterias y las microalgas, microorganismos fototrófos, son los más abundantes e importantes productores primarios de la zona, y se ubican en sus capas superiores, mostrando una especial capacidad tanto para adaptarse a condiciones muy limitantes para la vida como para tolerar o resistir la presencia de los metales pesados.

El grupo de Ecología Microbiana de la UAB, ha aislado diferentes consorcios microbianos de dichos tapetes microbianos, y estudiado, durante mucho tiempo, la capacidad de dichos aislados, tanto fototrófos como heterótrofos, para superar el estrés producido por metales pesados mediante, entre otros, mecanismos de biosorción y bioacumulación. En este sentido, se han optimizado y aplicado distintas técnicas tanto de microscopía óptica y electrónica, como de análisis químico, con el principal objetivo de estudiar el efecto de los metales pesados en dichos microorganismos, y de determinar y evaluar su capacidad para biorremediar ambientes contaminados por éstos. El análisis conjunto de los resultados obtenidos ha permitido valorar qué microorganismos podrían ser considerados buenos bioindicadores de contaminación según el metal y cuáles presentan un mayor potencial para ser ensayados en biorremediación.

En esta línea de investigación, y por primera vez, se ha analizado el estado fisiológico y la viabilidad de *Scenedesmus* sp. DE2009 (microalga) en condiciones de estrés por la presencia de mezclas de metales pesados (Pb, Cr y Cu; tesis doctoral Laia Millach). Para ello, se ha aplicado una

combinación de técnicas de CLSM (microscopía confocal láser de barrido) rápidas, no invasivas e *in vivo*, y sin interferencia de la comunidad heterótrofa. Entre ellas, la CLSM-DL, basada en la aplicación de un láser dual para evaluar de manera rápida e *in vivo* la viabilidad celular sin necesidad de protocolos de tinción ni software de análisis de imagen, que es útil para determinar la relación células vivas/muertas de microorganismos fototrófos; y la CLSM- λ -scan, que analiza el estado fisiológico de los pigmentos usando la clorofila *a* como biomarcador permitiendo, además, calcular la mínima concentración inhibitoria como un test sensible a la toxicidad por metales. En este caso, los resultados demostraron que la microalga era más resistente al Pb que al Cr y Cu pero que, en mezclas, la presencia de Cu afectaba negativamente su crecimiento. Se observó que el efecto interactivo de los metales individuales *versus* la mezcla trimetálica era sinérgica, indicando que el Pb solo es 36.52 veces menos tóxico que en la combinación de los 3 metales, seguramente debido a la presencia del Cu en la mezcla que, incluso en la concentración más baja (100 nM), es muy nocivo para esta microalga. La alta sensibilidad de estos métodos de CLSM para detectar bajas concentraciones de metales permite considerar *Scenedesmus* sp. DE2009 como un buen bioindicador de la contaminación metálica en entornos naturales.

Por otro lado, *Ochrobactrum anthropi* DE2010, aislado heterótrofo del consorcio de microorganismos *Scenedesmus* sp. DE2009, ha sido estudiado como modelo experimental por su potencial como biorremediador (tesis doctoral Eduard Villagrasa y artículos derivados). En dicha bacteria, de la cual se ha secuenciado su genoma completo, se ha analizado: el efecto citotóxico y su capacidad de respuesta para superar el estrés ocasionado por la exposición a concentraciones individuales crecientes de Cd, Pb(II), Cu(II), Cr(III), y Zn; su habilidad de secuestrarlos y con qué eficiencias, y sus estrategias de remoción y vías de detoxificación utilizadas. Todo ello utilizando diferentes técnicas actuales, algunas de ellas optimizadas por el propio grupo de investigación, de microscopía óptica, perfilómetro y confocal (FLU-CLSM-IA, utilizando un programa de análisis de imagen (IA) y fluorocromos vitales específicos) y electrónica, técnicas de análisis químico y bioquímico y de

análisis molecular. Como resultados destacados indicar que *O. anthropi* DE2010 es altamente resistente a todos los metales ensayados (hasta 20 mM de Zn y 10 mM para Cd, Pb(II), Cu(II), y Cr(III)) mostrando una alta capacidad de remover metales (el 90 % de Pb(II) y el 40% de Cr(III)); que presenta 6 genes relacionados con el metabolismo del polifosfato y que la síntesis y acumulación intracelular de inclusiones de polifosfato depende de la concentración del metal analizado, observándose tres patrones claros de localización celular: extracelular en gránulos de polifosfato (Cu(II)); en el espacio periplasmático formando cristales con fósforo (Pb(II)); e intracelular en inclusiones de polifosfato (Pb(II), Cr(III) y Zn), demostrando por primera vez que *O. anthropi* DE2010 genera respuestas celulares específicas para cada metal como estrategia de supervivencia, (bioacumulación en el caso de Pb(II), Cu(II), Cr(III) y Zn, biosorción para Cd y Cr(III), y biomineralización para Pb(II)). Su alta resistencia y capacidad de secuestrar metales ponen de manifiesto su gran potencial como agente biorremediador, especialmente en zonas contaminadas por Pb(II) y Cr(III).

Entre las técnicas de microscopía electrónica aplicadas por el grupo, hay que destacar la utilización, por primera vez, del microscopio electrónico HAADF-STEM EDX, cuyos resultados la señalan como técnica prometedora para localizar con precisión metales inmovilizados en las células (Fig. 1), además de SEM, FESEM y TEM utilizadas para analizar las respuestas morfológicas al estrés por metales, y SEM-EDX, TEM-EDX y TEM-SAED para los diversos ensayos analíticos.

Actualmente también se está llevando a cabo el aislamiento y cultivo de microorganismos fototrófos y/o consorcios microbianos provenientes de muestras de ambientes polares (Antártida e Islandia) y la realización de experimentos de biometeriorización de lavas/rocas de origen polar por parte de los microorganismos aislados seleccionados, analizando la interacción microorganismo-sustrato lítico a lo largo del tiempo, principalmente mediante microscopía láser confocal (λ scan CLSM, CLSM-DL y CLSM-IA) y estereomicroscopía de fluorescencia (proyecto nacional IPs: Dra. Asunción de los Ríos y Dr. Fernando Garrido).

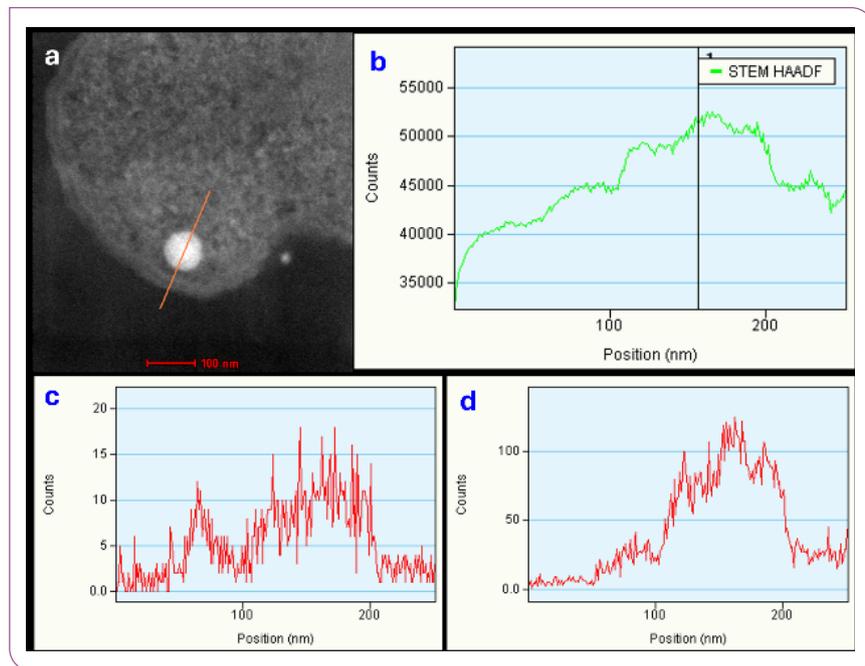


Figura 1. Análisis elemental por HAADF-STEM de *Ochrobactrum anthropi* DE20120 creciendo a 5 mM de Cr (III). Imagen HAADF-STEM con inclusión polifosfato (a); análisis HAADF-STEM EDX y perfiles lineales (escala 250 nm) a lo largo de la línea verde que muestra la intensidad de la imagen HAADF (b) y lo mismo a lo largo de la línea roja para el cromo (c) y fósforo (d). Cortesía: Eduard Villagrasa.

Publicaciones destacadas de los últimos 5 años

Shen X, Zhao J, Bonet-Garcia N, Villagrasa E, Solé A, Liao X y Palet C. (2023). Insights of microorganisms role in rice and rapeseed wastes as potential sorbents for metal removal. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(1), 801-814. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04000-6>

Solé A, Calvo MA, Lora MJ y Sánchez-Chardi A. (2019). Electron microscopy techniques applied to bioremediation and biodeterioration studies with moulds: State of the art and future

perspectives. Chapter 12, pp.354-386. In: *Fungal bioremediation: fundamentals and Applications*. Tomasini A, León-Santesteban HH (Eds). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781315205984>

Millach L, Villagrasa E, Solé A y Esteve I. (2019). Combined confocal laser scanning microscopy techniques for a rapid assessment of the effect and cell viability of *Scenedesmus* sp. DE2009 under metal stress. *Microscopy and Microanalysis*, 25(4), 998-1003. DOI: <https://doi.org/10.1017/S143192761901465X>

Villagrasa E, Bonet-Garcia N y Solé A. (2021). Ultrastructural evidences for chromium (III) immobilization by

Escherichia coli K-12 depending on metal concentration and exposure time. *Chemosphere*, 285, 131500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131500>

Villagrasa E, Palet C, López-Gómez I, Gutiérrez D, Esteve I, Sánchez-Chardi A y Solé A. (2021). Cellular strategies against metal exposure and metal localization patterns linked to phosphorus pathways in *Ochrobactrum anthropi* DE2010. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123808. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123808>

Villagrasa E, Ballesteros B, Obiol A, Millach L, Esteve I y Solé, A. (2020). Multi-approach analysis to assess the chromium(III) immobilization by *Ochrobactrum anthropi* DE2010. *Chemosphere*, 238,124663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124663>

Villagrasa E, Egea R, Ferrer-Miralles N y Solé A. (2020). Genomic and biotechnological insights in stress-linked polyphosphate production induced by chromium(III) in *Ochrobactrum anthropi* DE2010. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 97. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02875-6>

Villagrasa E, Ferrer-Miralles N, Millach L, Obiol A, Creus J, Esteve I y Solé, A. (2019). Morphological responses to nitrogen stress deficiency of a new heterotrophic isolated strain of Ebro Delta microbial mats. *Protoplasma*, 256(1), 105-116. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1263-8>