



Priestia flexa UN MICROORGANISMO ENDÓFITO DE MANGLAR CON POSIBLE USO PARA TERRAFORMACIÓN MARCIANA

Nataly Solano Llanos
CC 1007220205
Código estudiantil: 201912212129
Correo: nataly.solano@unisimo.edu.co

Trabajo de Investigación del Programa de Microbiología

Tutor:
Hernando José Bolívar Anillo

RESUMEN

El cultivo de especies vegetales en el suelo marciano resulta de gran interés para las agencias espaciales internacionales, en el proceso de terraformación de Marte conocido como el planeta rojo, sin embargo, esto resulta ser relativamente complejo y costoso. El suelo de Marte está compuesto por una gran variedad de metales y cristales de sales, por tal motivo el establecimiento de vegetación en su suelo estará condicionado a la capacidad de las plantas de superar las condiciones adversas tanto físicas como ambientales, en especial el estrés salino.

En este trabajo se evalúa la tolerancia de *Priestia flexa* a salinidad y metales pesados en condiciones de laboratorio anteriores a un viaje espacial y su crecimiento posterior a una misión espacial a bordo de un globo sonda que la expuso a radiación UV y microgravedad.

Priestia flexa presentó un crecimiento hasta una concentración de 0,75 M de cloruro de magnesio, 1 M de sulfato de magnesio, 600 mM de perclorato de sodio y tolerancia al mismo de 800 mM. También se evidenció que *P. flexa* presentó mayor tolerancia al cromo teniendo una concentración mínima inhibitoria de 15 mM y máxima bactericida de 50 mM y se



evidenció que es capaz de crecer hasta concentraciones de 0,25 mM de mercurio, datos que fueron obtenidos de ensayos realizados en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa en Madrid, España.

Objetivos: Evaluar el comportamiento de *Priestia flexa* ante pruebas de tolerancia a la salinidad y metales pesados

Materiales y Métodos:

- Secuenciación del genoma completo Se extrajo el ADN genómico de la cepa aislada mediante el método basado en el bromuro de cetiltrimetilamonio y se determinó su concentración con un fluorómetro Qubit v.2.0 (Invitrogen, EE. UU.). Este fue enviado a MicrobesNG para la secuenciación con Illumina MiSeq utilizando el kit Nextera XT (Illumina) para preparar las bibliotecas genómicas siguiendo el protocolo del fabricante. Las lecturas se recortaron con Trimmomatic v.0.36 y los análisis de calidad se realizaron con FastQC. software v.0.11.8. El ensamblaje inicial se realizó con SPAdes v.3.12.0 y el de los elementos genéticos extracromosómicos se realizó utilizando Recycler. Los contigs fueron extendidos y fusionados en Scaffolds utilizando el software SSPACE y los espacios generados se cerraron con el software GapFiller v.1-10.
- Misión RB6 En la preparación de la muestra que se envió a la estratosfera, se realizó un cultivo en caldo Luria Bertani durante 120 horas sin agitación, generando condiciones poco favorables para su desarrollo hasta conseguir la generación de esporas, seguidamente se le realizó una tinción que permitiera corroborar la presencia de estructuras compatibles con esporas. Posteriormente, se centrifugó la muestra y con la biomasa obtenida se impregnó el papel filtro que se introdujo en un tubo eppendorf esteril que a su vez se colocó en una cápsula de 4x4 cm, la cual se trasladó sin medidas especiales desde Barranquilla Colombia, hasta la Instalación Científica de Globos de Columbia de la NASA en Estados Unidos, donde fue ubicado junto a 120 experimentos más en un globo sonda y estuvo expuesto a las condiciones de la estratosfera en un periodo de 168 horas.
- Pruebas de actividad caotrópica y cosmotrópica
 - a. Tolerancia a $MgCl_2$ y $MgSO_4$

Se preparó un inóculo durante 24 horas y posteriormente se tomaron alícuotas de 100 μ L y se sembraron en medio líquido caldo tripticaseína de soya.
 - b. Tolerancia a perclorato de sodio
Se preparó un inóculo durante 24 horas y posteriormente se tomaron alícuotas de 20 μ L y se sembraron en placas de agar soya tripticaseína (TSA) en

- Pruebas de tolerancia a metales pesado

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Máxima Bactericida (CMB) a Cromo, Cobre, Zinc, Cobalto Mercurio, Plomo, Níquel, Cadmio en medio TSA: La Concentración Mínima Inhibitoria y Máxima Bactericida se evaluó en placas de agar TSA durante un periodo de 360 horas.

Resultados:

- Identificación
Mediante secuenciación genómica del gen ribosomal 16S la cepa aislada de *Avicennia germinans* fue inicialmente descrita como *Bacillus megaterium*. Sin embargo, al secuenciar el genoma completo fue identificada como *Priestia flexa*, anteriormente nombrada como *Bacillus flexus* (Figura 2). El promedio de identidad de aminoácidos (AAI) fue de un 95% para *Priestia flexa* NZCP016790 y NZCP040367, del 60.48 para *Metabacillus subtilis* y de un 59,69 para *Bacillus* sp. Por otro lado la cepa presentó un promedio de identidad de nucleótidos (ANI) del 99.07 con relación a *Priestia flexa* NZCP016790.
- Misión RB6
La supervivencia de *P. flexa* al viaje espacial fue comprobada mediante la reactivación en caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) donde se evidenció un crecimiento por turbidez del medio. Posteriormente se colocaron 10 microlitros en placas de agar BHI y se aislaron colonias típicas comprobando la resistencia posterior a las condiciones expuestas en la misión.
- Caotropicidad y cosmotropicidad
P. flexa presentó crecimiento hasta una concentración de 1,75 M de sulfato de magnesio, creciendo un poco más lento en esta condición; no obstante, se probó hasta una concentración de 2.0 M, en donde se observó la formación de un precipitado rojizo, se hizo repique de cada una de las réplicas a una placa de TSA y se observaron colonias típicas
- Resistencia a metales
Entre los ocho metales evaluados *P. flexa* presentó mayor tolerancia al cromo teniendo una CMI de 15 mM y CMB de 50 mM, seguida del plomo que presentó una CMI de 10 mM y una CMB de 1000 mM. También se evidenció que es capaz de crecer hasta concentraciones de 0,25 mM de mercurio

Conclusiones:

Priestia flexa es una de especies bacteriana que podría ser utilizada en el proceso de terraformación marciana, al no verse alterado su capacidad de tolerancia a sales ni a metales



tras haber sido expuesta a condiciones extremas en un viaje espacial a bordo de un globo sonda.

Palabras clave: Bacterias endófitas, suelo salino, terraformación, bioaumentación, globo sonda.

ABSTRACT

The cultivation of plant species in the Martian soil is of great interest to international space agencies, in the process of terraforming Mars known as the red planet, however, this turns out to be relatively complex and expensive. The soil of Mars is composed of a wide variety of metals and salt crystals, for this reason the establishment of vegetation on its soil will be conditioned by the ability of plants to overcome adverse physical and environmental conditions, especially saline stress. .

In this work, the tolerance of *Priestia flexa* to salinity and heavy metals under laboratory conditions prior to space travel and its growth after a space mission aboard a balloon that exposed it to UV radiation and microgravity is evaluated.

Priestia flexa showed growth up to a concentration of 0.75 M magnesium chloride, 1 M magnesium sulfate, 600 mM sodium perchlorate and tolerance to 800 mM. It was also shown that *P. flexa* showed greater tolerance to chromium, having a minimum inhibitory concentration of 15 mM and a maximum bactericidal concentration of 50 mM, and it was shown that it is capable of growing up to concentrations of 0.25 mM of mercury, data obtained from tests performed at the Severo Ochoa Molecular Biology Center in Madrid, Spain.

Objectives: To evaluate the behavior of *Priestia flexa* in tests of tolerance to salinity and heavy metals.

Materials and methods:

- Whole genome sequencing Genomic DNA was extracted from the isolated strain using the method based on cetyltrimethylammonium bromide and its concentration was determined with a Qubit v.2.0 fluorometer (Invitrogen, USA). This was sent to MicrobesNG for Illumina MiSeq sequencing using the Nextera XT kit (Illumina) to prepare the genomic libraries following the manufacturer's protocol. Readings were trimmed with Trimmomatic v.0.36 and quality analyzes were performed with FastQC. software v.0.11.8. The initial assembly was done with SPAdes v.3.12.0 and that of the extrachromosomal genetic elements was done using Recycler. The contigs were extended and merged into Scaffolds using the SSPACE software and the generated gaps were closed with the GapFiller v.1-10 software.



- Mission RB6 In the preparation of the sample that was sent to the stratosphere, a culture was carried out in Luria Bertani broth for 120 hours without agitation, generating unfavorable conditions for its development until the generation of spores was achieved, followed by staining that would allow corroborating the presence of structures compatible with spores. Subsequently, the sample was centrifuged and the biomass obtained was impregnated into the filter paper, which was placed in a sterile eppendorf tube, which in turn was placed in a 4x4 cm capsule, which was transferred without special measures from Barranquilla, Colombia, to the NASA's Columbia Balloon Science Facility in the United States, where it was placed along with 120 other experiments in a weather balloon and was exposed to stratospheric conditions for a period of 168 hours.

- Chaotropic and cosmotropic activity tests

- a. Tolerance to MgCl₂ and MgSO₄

An inoculum was prepared for 24 hours and subsequently aliquots of 100 µL were taken and seeded in trypticasein soy broth liquid medium.

- b. Sodium perchlorate tolerance

An inoculum was prepared for 24 hours and subsequently aliquots of 20 µL were taken and seeded on trypticasein soy agar (TSA) plates in

- Heavy metal tolerance tests

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Maximum Bactericidal Concentration (MBC) of Chromium, Copper, Zinc, Cobalt, Mercury, Lead, Nickel, Cadmium in TSA medium: The Minimum Inhibitory and Maximum Bactericidal Concentration was evaluated on TSA agar plates for a period of 360 hours.

Results:

- Identification

Through genomic sequencing of the 16S ribosomal gene, the isolated strain of *Avicennia germinans* was initially described as *Bacillus megaterium*. However, when sequencing the complete genome, it was identified as *Priestia flexa*, previously named *Bacillus flexus* (Figure 2). The average amino acid identity (AAI) was 95% for *Priestia flexa* NZCP016790 and NZCP040367, 60.48 for *Metabacillus subtilis* and 59.69 for *Bacillus* sp. On the other hand, the strain presented an average nucleotide identity (ANI) of 99.07 in relation to *Priestia flexa* NZCP016790.

- RB6 Mission



The survival of *P. flexa* to space travel was verified by reactivation in BHI broth (Brain Heart Infusion) where growth was evidenced by turbidity of the medium. Subsequently, 10 microliters were placed on BHI agar plates and typical colonies were isolated, checking resistance. after the conditions exposed in the mission.

- Chaotropic and cosmotropic activity tests

- a. Tolerance to MgCl₂ and MgSO₄

An inoculum was prepared for 24 hours and subsequently aliquots of 100 µL were taken and seeded in trypticasein soy broth liquid medium.

- b. Sodium perchlorate tolerance

An inoculum was prepared for 24 hours and subsequently aliquots of 20 µL were taken and seeded on trypticasein soy agar (TSA) plates in

- Heavy metal tolerance tests

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Maximum Bactericidal Concentration (MBC) of Chromium, Copper, Zinc, Cobalt, Mercury, Lead, Nickel, Cadmium in TSA medium: The Minimum Inhibitory and Maximum Bactericidal Concentration was evaluated on TSA agar plates for a period of 360 hours.

Results:

- Identification

Through genomic sequencing of the 16S ribosomal gene, the isolated strain of *Avicennia germinans* was initially described as *Bacillus megaterium*. However, when sequencing the complete genome, it was identified as *Priestia flexa*, previously named *Bacillus flexus* (Figure 2). The average amino acid identity (AAI) was 95% for *Priestia flexa* NZCP016790 and NZCP040367, 60.48 for *Metabacillus subtilis* and 59.69 for *Bacillus* sp. On the other hand, the strain presented an average nucleotide identity (ANI) of 99.07 in relation to *Priestia flexa* NZCP016790.

- RB6 Mission

The survival of *P. flexa* to space travel was verified by reactivation in BHI broth (Brain Heart Infusion) where growth was evidenced by turbidity of the medium. Subsequently, 10 microliters were placed on BHI agar plates and typical colonies were isolated, checking resistance. after the conditions exposed in the mission.

- Chaotropicity and cosmotropicity



P. flexa showed growth up to a concentration of 1.75 M of magnesium sulfate, growing a little slower in this condition; however, it was tested up to a concentration of 2.0 M, where the formation of a reddish precipitate was observed, each of the replicas was peeled to a TSA plate and typical colonies were observed.

- Resistance to metals

Among the eight metals evaluated, *P. flexa* presented greater tolerance to chromium, having a MIC of 15 mM and a CMB of 50 mM, followed by lead, which presented a MIC of 10 mM and a CMB of 1000 mM. It was also shown that it is capable of growing up to concentrations of 0.25 mM of mercury.

Conclusions:

Priestia flexa is one of the bacterial species that could be used in the Martian terraforming process, as its tolerance to salts and metals is not altered after being exposed to extreme conditions during space travel aboard a weather balloon.

Keywords: Endophytic bacteria, saline soil, terraforming, bioaugmentation, globe

REFERENCIAS

- García, R., Campos, J., Cruz, J. A., Calderón, M. E., Raynal, M. E., & Buitrón, G. (2016). biosorption of cd, cr, mn, and pb from aqueous solutions by *Bacillus* sp strains isolated from industrial waste activate sludge. *Tip*, 19(1), 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.02.001>
- Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., & Fava, F. (2019). Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *New Biotechnology*, 52(April), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.04.005>
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it o. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
- Hernández-Caricio, C., Ramírez, V., Martínez, J., Quintero-Hernández, V., Baez, A., Munive, J.-A., & Rosas-Murrieta, N. (2022). os metales pesados en la historia de

la humanidad, los efectos de la contaminación por metales pesados y los procesos biotecnológicos para su eliminación: el caso de *Bacillus* como bioherramienta para la recuperación de suelos. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 7 (27)(27), 1–68.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., & Sa, T. (2007). Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, 69(2), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.017>

Manuel, J., & Lozano, M. (2021). *Ecología microbiana del Salar de Uyuni (Bolivia). Efectos de la caotropicidad como factor limitante para la vida Director : Ricardo Amils Pibernat.*

Murnasih. (2013). bacterias endofitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.

Oze, C., Beisel, J., Dabsys, E., Dall, J., North, G., Scott, A., Lopez, A. M., Holmes, R., & Fendorf, S. (2021). Perchlorate and agriculture on mars. *Soil Systems*, 5(3), 1–10. <https://doi.org/10.3390/soilsystems5030037>

Priyadarshini, S., Gopinath, V., Meera Priyadharsshini, N., MubarakAli, D., & Velusamy, P. (2013). Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.018>

Ramírez Jiménez, S. I., Aguirre Ramírez, M., & Martínez Pabello, P. U. (2022). Marte: experimentos de simulación y misiones de exploración espacial. *Inventio*, 17(43). <https://doi.org/10.30973/inventio/2021.17.43/2>

Valero, N. O., Barraza, B., & Medina, A. M. (2011). Un escenario para el uso de microorganismos del manglar como inoculantes microbianos en Colombia. *Biociencias*, 6(1), 97–103. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..1.2767>

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>