

Diversidad microbiana: en el límite de lo inimaginable

Mariana Lozada y Hebe Dionisi

Laboratorio de Microbiología Ambiental, CESIMAR-CONICET, Puerto Madryn, Chubut, Argentina

Contacto: Mariana Lozada y Hebe Dionisi - lozada@cenpat-conicet.gob.ar | hdionisi@cenpat-conicet.gob.ar

fig1

Resumen

Los últimos avances en el estudio de los microorganismos ambientales han echado luz sobre su enorme diversidad, la cual aún no se ha abarcado en su totalidad. Las técnicas basadas en el estudio de biomoléculas tales como el DNA han demostrado la existencia de ramas del árbol de la vida completamente desconocidas y muy divergentes de los conocimientos hasta el momento. El análisis de grandes volúmenes de datos a partir de iniciativas internacionales de exploración de la diversidad microbiana, y su correlación con patrones ambientales, están logrando responder preguntas fundamentales sobre los procesos ecológicos y evolutivos que han moldeado estas comunidades en el ambiente. En este contexto, desde Argentina se han analizado sedimentos costeros de ambientes subantárticos, alcanzando un nivel de resolución inédito, y contribuyendo a paliar el desvío existente en contra del Hemisferio Sur. Además, se están realizando avances en el aprovechamiento del potencial biotecnológico de microorganismos ambientales no cultivados.

Palabras clave: comunidades microbianas, diversidad, ómicas

Summary

Recent advances in the study of environmental microorganisms have uncovered the enormous diversity and complexity of microbial communities, much of which has not yet been fully covered. Molecular techniques, based on the study of biomolecules such as DNA have demonstrated the existence of branches of the tree of life that are completely unknown and divergent from what is known so far. The analysis of large volumes of data within major international diversity surveys, and their correlation with environmental patterns are shedding light on the ecological and evolutionary processes that have shaped these communities in the environment. In Argentina, we have analyzed Sub-Antarctic coastal sediments with an unprecedented level of resolution, helping to alleviate the bias existing against the Southern Hemisphere. In addition, advances are being made in harnessing the biotechnological potential of non-cultivated environmental microorganisms.

Keywords: microbial communities, diversity, omics

Introducción

Los avances metodológicos de las últimas décadas en el estudio de los microorganismos ambientales han permitido demostrar que el planeta Tierra es en realidad un “planeta microbiano” [1]. Los microorganismos son su forma de vida más abundante, tanto en número como en distribución, y representan engranajes fundamentales para la integridad y funcionamiento de la biósfera. Los microorganismos, especialmente los procariotas, son responsables de una gran parte de las transformaciones que sufren el carbono y los nutrientes en el ambiente natural, mediante su exquisita maquinaria celular adaptada a llevar a cabo virtualmente cualquier reacción química posible [2,3]. Componentes esenciales de los ciclos biogeoquímicos, sus actividades afectan a todos los niveles tróficos. También juegan un rol primordial en la salud humana, así como en la de otros organismos esenciales para el ser humano, como las plantas terrestres [4,5]. A pesar de su extrema importancia, nuestra comprensión del mundo microbiano natural y de los principios y mecanismos que lo gobiernan es aún limitada. En el ambiente, los microorganismos se ensamblan en comunidades microbianas que presentan alta diversidad, y exhiben complejas interacciones. Estas *comunidades microbianas* son además altamente variables, tanto en el tiempo como en el espacio, por lo que se necesita un gran número de muestras para lograr la descripción exhaustiva de dichas comunidades. La mayor dificultad para estudiar a los microorganismos ambientales radica en la imposibilidad o dificultad para cultivar la mayoría de ellos, lo que atenta contra una comprensión global de estos sistemas [6]. La ecología microbiana está comenzando a echar luz sobre dicha complejidad, brindando repuestas sobre las leyes que gobiernan la distribución y las funciones de los microorganismos en los ecosistemas que conforman la biósfera. Dicha información es fundamental para tener una visión más integrada de los mismos, así como para la resolución de acuciantes problemas de nuestro siglo relacionados con energía, salud y cambio climático, entre otros. Esta disciplina ha tomado gran impulso en los últimos años, recibiendo aportes de la química, la ecología teórica, la biología molecular y las ómicas, la bioinformática y las ciencias ambientales.

Catálogos de diversidad microbiana a escala planetaria: ¿solo coleccionando estampillas?

Desde el trabajo pionero de Carl Woese [7,8], el análisis de biomoléculas de los microorganismos (la más utilizada es el DNA) amplió enormemente nuestro conocimiento sobre la biodiversidad, y aún hoy sigue modificando nuestra concepción del árbol de la vida. Los estudios se basan mayormente en la extracción de DNA directamente a partir la muestra ambiental, obteniéndose una mezcla de fragmentos de los genomas de los distintos microorganismos que componen la comunidad microbiana en estudio. Este DNA puede ser analizado por medio de la amplificación de fragmentos de genes marcadores filogenéticos (el más conocido es el que codifica para la subunidad pequeña del RNA ribosomal, (*SSU rRNA* por sus siglas en inglés), utilizando las regiones altamente conservadas para el diseño de los cebadores, tratando de cubrir la mayor diversidad posible de microorganismos. Los fragmentos amplificados son luego secuenciados utilizando tecnologías de secuenciación en gran escala, que permiten obtener decenas de miles de secuencias por muestra, correspondientes al gen seleccionado. Esta estrategia simplifica el análisis de comunidades complejas, si bien solo permite estimar la estructura y diversidad de la comunidad microbiana en estudio (contestando la pregunta ¿quién está allí?), sin aportar información sobre su potencial metabólico. Alternativamente, se pueden secuenciar al azar “todos” los genes de la comunidad (si bien no es posible por el momento alcanzar altas coberturas de análisis de comunidades complejas), lo cual sí permite estudiar los procesos metabólicos representados en los genomas de los microorganismos ambientales (contestando la pregunta, ¿qué pueden hacer?). La estrategia, denominada metagenómica, ha permitido además ensamblar los genomas de los microorganismos ambientales, sin un paso de cultivo. Como consecuencia, además de la genómica de células individuales (*single-cell genomics*), se ha expandido el catálogo de grupos taxonómicos (*taxa*) en órdenes de magnitud, lo que ha llevado al

descubrimiento de nuevos grupos microbianos que opacaron rápidamente el conocimiento adquirido hasta el momento [9–11].

Debido a las diferencias fundamentales de los microorganismos con respecto a los macroorganismos, incluyendo tipos diferentes de reproducción y un rol importante de la transferencia horizontal de genes, los microorganismos han presentado limitaciones teóricas y prácticas para su estudio. En algunos casos, estas han dado origen a un largo debate en la comunidad científica, especialmente en lo que se refiere al concepto de especie microbiana, así como a los mecanismos que llevan a la especiación [12–14]. Las especies microbianas han sido definidas de una forma pragmática, incluyendo líneas de evidencias genotípicas, tal como poseer menos del 97% de identidad en el gen *SSU rRNA*, o menos de 94% de identidad promedio en sus genes compartidos (ANI, *average nucleotide identity of shared genes*), y/o fenotípicas (como un rasgo diagnóstico clave) [15]. Más recientemente, el análisis de un número creciente de genomas de microorganismos filogenéticamente divergentes y de organismos no cultivados (genomas ensamblados a partir de metagenomas o secuenciación de células individuales), ha mostrado cada vez más evidencias de que existirían discontinuidades génicas significativas en las poblaciones microbianas naturales, por lo que los microorganismos podrían ser alcanzados por una definición biológica de especie basada en aislamiento genético [16–18].

Difícilmente se pueda negar la importancia de los ambientes marinos en estos estudios. La mitad de la producción primaria global ocurre en los océanos, y se estima que los microorganismos marinos procesan alrededor de la mitad del flujo global de elementos de importancia clave para la vida tales como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y hierro [6,19]. El mar posee una enorme variedad de nichos para los microorganismos, tales como aguas a diferentes profundidades, temperaturas y salinidades, sedimentos de composiciones diferentes, ambientes costeros y oceánicos, y hospedadores evolutivamente divergentes tales como algas, corales, esponjas y peces. Todo esto significa una fuente inagotable de biodiversidad microbiana y lo convierten un atractivo blanco, pero también en una enorme desafío para su estudio [20,21]. Una serie de ambiciosas iniciativas, entre las que se encuentran las campañas globales marinas (ej. Tara Ocean Expedition, <https://www.embl.de/tara-oceans/start/index.html>, el Sorcerer II Global Ocean Sampling (GOS) expedition (<https://www.jcvi.org/gos>), el Ocean Sampling Day <http://www.assembleplus.eu/research/ocean-sampling-day-2018>) y otras grandes iniciativas internacionales de biodiversidad microbiana tales como el International Census of Marine Microbes (<http://icomm.mbl.edu/>), han permitido incrementar nuestro conocimiento de las comunidades microbianas marinas en una escala geográfica global. Los proyectos han brindado el impulso necesario para analizar una enorme cantidad de muestras y datos obtenidos de forma estandarizada, y poner a prueba hipótesis ecológicas y biogeográficas a escala planetaria. Algunas de ellas se focalizaron en los posibles mecanismos de distribución global de microorganismos [22–24], o en demostrar la existencia de reservorios genéticos en lo que constituiría la “biósfera rara” [25]. También se ha expandido significativamente el catálogo de genes y funciones mediante la colección de datos metagenómicos, permitiendo identificar los factores ambientales más importantes para la estructuración de las comunidades planctónicas [26].

Con respecto a las comunidades microbianas que nos habitan, el Proyecto Microbioma Humano (*Human Microbiome Project*, HMP, <https://hmpdacc.org/hmp/>), abarcó el análisis de la biodiversidad filogenética (mediante la secuenciación de genes *SSU rRNA*) y en una segunda etapa, funcional (secuenciación de los metagenomas) en diferentes regiones del cuerpo humano y bajo diferentes condiciones. La realización de este tipo de estudios ha permitido un avance en la comprensión de los factores que afectan la distribución y abundancia de diferentes microorganismos en nuestro cuerpo, y cómo el microbioma puede afectar la

fisiología, el sistema inmune, la predisposición a enfermedades, etc., proveyendo una efectiva unión entre la microbiología médica y ambiental [27].

El Microbioma de la Tierra

En nuestra meta de comprender el planeta microbiano, el proyecto Microbioma de la Tierra (*Earth Microbiome Project*, EMP, www.earthmicrobiome.org) fue un hito fundamental. La iniciativa fue lanzada en 2010 con el objetivo de caracterizar las comunidades microbianas de los diferentes ambientes de nuestro planeta, por medio de la participación de cientos de científicos de todo el mundo para construir la mayor base de datos de biodiversidad microbiana conocida hasta el momento [28]. El proyecto significó la coordinación de diversos proyectos de investigación, cada uno con sus propias preguntas, y la información generada permitió también realizar un meta-análisis global. El diseño básico involucró la colección coordinada de muestras y la estandarización de adquisición metadatos (ubicación geográfica, datos físico-químicos y ambientales, etc.), extracción de DNA, amplificación por PCR del gen *SSU rRNA*, y secuenciación en gran escala de dichos productos de amplificación (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/>). Este enfoque permitió reducir la variabilidad técnica en los datos, y junto con el alto número de muestras analizadas, facilitó la detección de patrones biológicos emergentes. La generación de una plataforma de acceso abierto a los datos y resultados (QIITA, <https://qiita.ucsd.edu/emp/>) aseguró a su vez el retorno de los esfuerzos de la comunidad científica de una forma coordinada. A su vez, se lograron desarrollar herramientas analíticas de alto impacto, tales como nuevos y más eficientes formatos de almacenamiento de datos, y una actualización en la forma de analizar la información a partir de los análisis moleculares.

El análisis de un primer conjunto de datos [29] incluyó 27.751 muestras de 97 estudios independientes, abarcando 7 continentes, 43 países y 17 “ambientes microbianos”. Los ambientes fueron clasificados dentro de un nuevo sistema ontológico (*Earth Microbiome Project Ontology*, EMPO, <http://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/emp/>), el cual los categoriza en 3 niveles jerárquicos. En un primer nivel, por ejemplo, se diferencian los ambientes de vida libre de aquellos que se asocian a un hospedador. En un segundo nivel, se consideran ambientes salinos y no salinos para microorganismos de vida libre, y en su asociación a animales, plantas u hongos en el segundo caso. Un tercer nivel involucra el hábitat específico para cada uno de ellos, como por ejemplo sedimento o la rizósfera de una planta. La estructura fue diseñada para capturar los dos ejes que se sabe que más influyen sobre la (beta) diversidad microbiana: salinidad y coevolución con un hospedador. La utilización de amplicones del gen *SSU rRNA* permitió el análisis en forma rápida y coordinada de miles de muestras y un nivel de cobertura importante dado por la secuenciación Illumina HiSeq (~80.000 secuencias por muestra). Se amplificó la región hipervariable V4, utilizando primers universales [30] los cuales fueron optimizados sucesivamente en función de la información emergente en las bases de datos.

El análisis de datos de genes *SSU rRNA* utilizó históricamente un enfoque de agrupamiento de secuencias en “unidades taxonómicas operativas” (*operational taxonomic units*, OTUs), en base a un nivel umbral más o menos arbitrario de identidad genética, el cual parece estar asociado con la distancia genética que existiría entre especies microbianas [31][32]. En el caso del *Earth Microbiome Project* (EMP) para el gran volumen de datos obtenido se aplicó un método diferente a los OTUs, llamado Deblur, el cual lleva a cabo la remoción directa de errores de secuenciación. Este método tiene mayor especificidad (por ejemplo, puede distinguir microorganismos que difieren en un nucleótido en este gen), y tiene la ventaja de ser trazable/reproducibile y comparable entre estudios (ya que se basa en secuencias únicas y no en grupos de

secuencias). Otra ventaja de este método es que reduce significativamente la demanda computacional para su análisis, lo cual lo hace muy prometedor para los conjuntos de datos cada vez más abultados de la secuenciación en gran escala [33].

El aporte del mencionado estudio a la descripción de la diversidad global de microorganismos se hace evidente con la siguiente información: en este set de datos que incluyó menos de 100 proyectos se capturó casi la mitad de las secuencias presentes en las bases de datos actuales (Greengenes y SILVA). Sin embargo, estas secuencias ya previamente identificadas representaban solo el 10% del set de datos generado en el EMP, indicando una enorme fuente de biodiversidad nueva descubierta en este proyecto. Además, se avanzó en el conocimiento de cómo los factores ambientales estructurarían a las comunidades microbianas y su composición. Como consecuencia se lograron avances en nuestra capacidad de predicción; mediante análisis automatizados (*supervised machine learning*) se pudo distinguir a las muestras como asociadas a animales, plantas, de vida libre salinas o no salinas con 91% de exactitud, solo basándose en datos de la comunidad microbiana. Dichos logros tienen importantes aplicaciones, por ejemplo en el campo forense. Por otro lado, preguntas fundamentales, tales como si existe un efecto de la latitud sobre la diversidad microbiana o qué rangos de temperatura y pH seleccionan una mayor riqueza de organismos, pudieron ser respondidas con un set de datos amplio y transversal a una variedad de ambientes.

Mirando al Sur: comunidades microbianas de ambientes costeros patagónicos

A pesar de la gran cantidad de información de secuencias ambientales depositada en bases de datos públicas, existe un importante desvío a favor de los ambientes del Hemisferio Norte. Esto impacta directamente tanto en la construcción del conocimiento global sobre el microbioma de nuestro planeta, como sobre las preguntas específicas que nos atañen a los países del Hemisferio Sur. Por ejemplo, de acuerdo a una base de datos que mantiene un registro de la información generada (*Genomes on Line Database*, GOLD, <https://gold.jgi.doe.gov>, consultada en noviembre de 2018), de un total de 23.160 muestras ambientales (*Biosamples*, definidas como el sitio original de donde fue tomada la muestra), correspondientes a 853 estudios metagenómicos públicos, solo 3.512 (aproximadamente el 15%) eran del Hemisferio Sur. De éstos, solo 1.555 pertenecían a sitios de latitudes mayores a los 42°S. Teniendo en cuenta la importancia que las comunidades de los ambientes fríos representan en la biósfera [34], generar información sobre las comunidades microbianas de áreas más remotas del sur es una tarea urgente, para poder conocer sus aportes a estos ambientes vulnerables, así como al ecosistema global total.

En este contexto, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental (CESIMAR, CONICET) desde hace una década utilizamos herramientas moleculares, como la secuenciación en gran escala de genes *SSU rRNA* y las estrategias metagenómicas, para caracterizar la estructura y potencial metabólico de las comunidades microbianas de sedimentos costeros de la Patagonia. Los ambientes costeros son de extrema importancia para el ser humano, ya que proveen servicios eco- sistémicos tales como la formación de hábitats, el ciclado de agua y nutrientes, la provisión de stocks de especies comestibles, la detoxificación de contaminantes, la regulación del clima, etc., que a su vez se traducen en beneficios directos para el ser humano. La mayoría de estos estudios se centraron en Bahía Ushuaia, un ambiente sub-antártico impactado por las actividades humanas, mayormente debidas a los efluentes no tratados de la ciudad de Ushuaia, y a la contaminación crónica por hidrocarburos [35–39].

Los ecosistemas costeros de altas latitudes se consideran especialmente vulnerables, ya que las poblaciones humanas continúan desplazándose hacia a los polos, generando un impacto cada vez mayor

en las costas de regiones frías del globo. Si bien existen varios estudios llevados a cabo en agua de mar, las comunidades microbianas de sedimentos de altas latitudes impactados por actividades humanas se encontraban poco caracterizadas. Para suplir esta falta de información, se conformó un consorcio de investigadores de Argentina, Estados Unidos, Suecia y Noruega, a fin de caracterizar dichas comunidades en ambientes similares de ambos hemisferios. El proyecto fue financiado por un programa del Joint Genome Institute del Departamento de Energía de los Estados Unidos (*Community Science Program*, JGI, DOE), el cual resultó en la generación de 0.2 Terabases (10^{12} bases) de información genética de los metagenomas de estos sedimentos. Además, en el marco del Proyecto Microbioma de la Tierra descrito en la sección anterior, se obtuvieron más de 100.000 secuencias del gen *SSU rRNA* por muestra, resultando en coberturas de más del 95% de la biodiversidad microbiana de estos ambientes, lo cual representa una cantidad de información nunca obtenida hasta el momento sobre las comunidades microbianas de ambientes patagónicos.

El estudio mostró la impresionante diversidad microbiana presente en los sedimentos costeros fríos, en particular en Bahía Ushuaia. En los sitios se detectaron alrededor de 5.000 OTUs por muestra, y se estimaron índices de diversidad (Shannon) de 9, lo cual los ubica entre las comunidades más diversas del mundo, incluso dentro de las microbianas (ver [29]). También se pudieron inferir los factores ambientales que más contribuyen en la estructuración de dichas comunidades microbianas: la temperatura, la salinidad y en menor escala la contaminación orgánica [40]. Los análisis también mostraron que, a pesar de sus importantes diferencias a nivel de la estructura de la comunidad (menos del 19 % de las familias de microorganismos eran compartidos entre las muestras), las funciones de los sedimentos estudiados eran remarcablemente constantes, y eran más similares a otros ambientes diversos y estructurados tales como suelos, que a las columnas de agua [40]. Interesantemente, el análisis de los metagenomas permitió descubrir que las comunidades microbianas de Bahía Ushuaia, impactada por contaminación orgánica y descarga de nutrientes [41], son un importante reservorio de potencial genético para la desnitrificación, incluyendo más de 200 variantes diferentes del gen *nosZ*, el único conocido en la naturaleza que cataliza la reducción del gas invernadero N_2O al inerte N_2 [42].

En resumen, el análisis de datos metagenómicos obtenidos por primera vez de ambientes fríos de nuestro país nos permitieron analizar el potencial de las comunidades microbianas de sedimentos costeros para proveer servicios ecosistémicos claves, así como contribuir a un mayor conocimiento de la biodiversidad microbiana global.

Potencial biotecnológico de los microorganismos ambientales

Los microorganismos exhiben una vasta biodiversidad y versatilidad metabólica, por lo que las comunidades microbianas de los variados hábitats naturales y artificiales son a menudo el punto de partida para la búsqueda de nuevos compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos u otros productos de interés biotecnológico, actividad denominada bioprospección microbiana [43]. A pesar de los grandes avances metodológicos de las últimas décadas para el estudio de dichas comunidades, se estima que aún resta por descubrir más del 90% de la diversidad microbiana que existe en nuestro planeta [44], por lo que el potencial biotecnológico de los microorganismos ambientales se encuentra aún mayormente inexplorado. Esto ocurre en particular en hábitats de difícil acceso, como por ejemplo en sedimentos a grandes profundidades o en los ambientes menos habitados del planeta, como los polos.

La metagenómica ha facilitado enormemente el acceso al potencial biotecnológico de los microorganismos. Existen dos estrategias posibles para capturar el potencial de las comunidades microbianas o

enriquecimientos generados a partir de ellas [20]. El DNA purificado a partir de las comunidades puede ser secuenciado al azar utilizando tecnologías de secuenciación en gran escala, las lecturas resultantes ensambladas, y la información genética resultante anotada y utilizada para identificar secuencias de interés por comparaciones con bases de datos existentes. Este método de bioprospección es muy poderoso, dado que permite analizar una gran cantidad de información de forma rápida, incluso datos generados con otro fin, depositados en bases de datos públicas [45]. Sin embargo, en general esta estrategia no permite identificar familias novedosas de proteínas, dado que depende de información previamente conocida. Un segundo tipo de estrategia, denominada metagenómica funcional, permite la identificación de actividades enzimáticas o metabolitos sin necesidad de contar con información previa y puede resultar en la detección de biomoléculas más novedosas. La estrategia involucra el clonado del DNA ambiental en vectores adecuados, como plásmidos, fósmidos o cromosomas artificiales, construyéndose de esta manera una biblioteca metagenómica en el hospedador seleccionado. Luego, las actividades de interés son detectadas en los clones de la biblioteca, ya sea en ensayos en placas de Petri o por medio del análisis de extractos celulares, con una mayor sensibilidad. La metagenómica funcional es más laboriosa que la secuenciación al azar, y requiere del uso de equipamiento de alto costo para la automatización de la búsqueda de las actividades de interés, dado que se analizan decenas o cientos de miles de clones. Sin embargo, es una estrategia que continúa avanzando gracias al desarrollo de nuevos sistemas de expresión de vectores y la utilización de otros hospedadores, además de *Escherichia coli* [46].

Los microorganismos que habitan ambientes extremos [47] y los microbiomas de macroorganismos como esponjas [48] o termitas [49] resultan de particular interés para la prospección de biomoléculas, debido a las adaptaciones específicas que han desarrollado para sobrevivir en estos hábitats. Por ejemplo, las enzimas de microorganismos adaptados a vivir a bajas temperaturas, como aquellos que habitan los sedimentos a altas profundidades o ambientes polares, pueden ser la base para el desarrollo de productos y procesos biotecnológicos sostenibles, capaces de operar a bajas temperaturas y con menor demanda de energía [50]. Microorganismos adaptados a las altas temperaturas, como aquellos que habitan las fuentes hidrotermales, contienen enzimas que resultan de utilidad en procesos industriales que requieren del uso de enzimas con una alta estabilidad térmica [47]. Otro ejemplo son las enzimas de microorganismos marinos, que son de particular interés para su uso en procesos industriales donde se requiere la presencia de solventes, dado que existe una relación entre la tolerancia a la salinidad y los solventes orgánicos [51].

Además de la bioprospección de enzimas con aplicaciones en múltiples industrias, otras posibles contribuciones de la biodiversidad microbiana a la biotecnología incluyen la obtención de ácidos grasos, antioxidantes, pigmentos, biopolímeros y biomateriales de utilidad para la industria, el desarrollo de medicamentos, de tratamientos médicos, de polímeros de uso biomédico, de métodos de diagnóstico y de productos de cuidado personal con aplicación en salud humana, el desarrollo de protocolos de biorremediación, de biosensores, y de antiincrustantes no tóxicos y biosurfactantes con aplicación en biotecnología ambiental, y el desarrollo de nutracéuticos, alimentos funcionales y productos que favorezcan la salud animal, como así también el desarrollo de biocombustibles, entre otros [43,44,52]. Las potenciales aplicaciones biotecnológicas derivadas de la biodiversidad microbiana son múltiples, pudiendo influir positivamente en casi todos los aspectos de la vida y la sociedad e impulsar el desarrollo de la bioeconomía, o economía basada en el conocimiento y aplicación de procesos y productos biológicos [53].

Referencias:

1. **National Research Council** (2007) *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. Washington DC:National Academies Press.

2. **Strous, M, Fuerst JA, Kramer EH, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT et al.** (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446–449. DOI: 10.1038/22749
3. **Falkowski PG, Fenchel T, Delong TF** (2008) The Microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* 320: 1034–1039. DOI: 10.1126/science.1153213
4. **Sonnenburg ED, Sonnenburg JL** (2014) Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metabolism* 20: 779–786. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.07.003
5. **van der Heijden MGA, Hartmann M** (2016) Networking in the plant microbiome. *PLOS Biology* 14: e1002378. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002378
6. **Fuhrman JA, Cram D, Needham M** (2015) Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Reviews Microbiology* 13: 133–147. DOI: 10.1038/nrmicro3417
7. **Woese CR, Fox GE** (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74: 5088–5090. DOI: 10.1073/pnas.74.11.5088
8. **Woese CR, Kandler O, Wheelis ML** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 87: 4576–4579. DOI: 10.1073/pnas.87.12.4576
9. **Pace NR** (2009) Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73: 565–576. DOI: 10.1128/MMBR.00033-09
10. **Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ et al.** (2016) A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* 1: 16048. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.48
11. **Parks DH, Rinke C, Chuvochina M, Chaumeil PA, Woodcroft BJ, Evans PN et al.** (2017) Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature Microbiology* 2: 1533. DOI: 10.1038/s41564-017-0012-7
12. **Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ et al.** (2005) Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3: 733–739. DOI: 10.1038/nrmicro1236
13. **Achtman M, Wagner M** (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology* 6: 431–440. DOI: 10.1038/nrmicro1872
14. **Doolittle WF, Papke RT** (2006) Genomics and the bacterial species problem. *Genome Biology* 7: 116. DOI: 10.1186/gb-2006-7-9-116
15. **Richter M, Rosselló-Móra R** (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 106: 19126–19131. DOI: 10.1073/pnas.0906412106
16. **Caro-Quintero A, Konstantinidis KT** (2012) Bacterial species may exist, metagenomics reveal. *Environmental Microbiology* 14: 347–355. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02668.x
17. **Bobay LM, Ochman H** (2017) Biological species are universal across life's domains. *Genome Biology and Evolution* 9: 491–501. DOI: 10.1093/gbe/evx026
18. **Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S** (2017) High-throughput ANI Analysis of 90K Prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *BioRxiv* 225342. DOI: 10.1101/225342
19. **Azam F, Malfatti F** (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* 5: 782–791. DOI: 10.1038/nrmicro1747
20. **Lozada M, Dionisi H M** (2015) Microbial Bioprospecting in Marine Environments. In: Springer Handbook of Marine Biotechnology, pp. 307–326 *Basel: Springer*
21. **Salazar G, Sunagawa S** (2017) Marine microbial diversity. *Current Biology* 27: R489–R494. DOI: 10.1016/j.cub.2017.01.017
22. **Sul WS, Oliver TA, Ducklow HD, Amaral-Zettler LA, Sogin ML** (2013) Marine bacteria exhibit a bipolar distribution. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 110: 2342–2347. DOI: 10.1073/pnas.1212424110
23. **Ghiglione JF, Galand PE, Pommier T, Pedrós-Alió C, Maas EW, Bakker K, et al.** (2012) Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 201208160. DOI: 10.1073/pnas.1217767110
24. **Amend AS, Oliver TA, Amaral-Zettler LA, Boetius A, Fuhrman JA, Horner-Devine MC et al.** (2013) Macroecological patterns of marine bacteria on a global scale. *Journal of Biogeography*. 40: 800–811. DOI: 10.1111/jbi.12034
25. **Gibbons SM, Caporaso JG, Pirrung M, Field D, Knight R, Gilbert JA** (2013) Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 201217767. DOI: 10.1073/pnas.1217767110
26. **Bork P, Bowler C, Vargas C de, Gorsky G, Karsenti E, Wincker P** (2015) Tara Oceans studies plankton at planetary scale. *Science* 348: 873–873. DOI: 10.1126/science.aac5605
27. **Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB, et al.** (2017) Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature* 550: 61–66. DOI: 10.1038/nature23889
28. **Gilbert JA, Jansson JK, Knight R** (2014) The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology* 12: 69. DOI: 10.1186/s12915-014-0069-1

29. **Thompson LR, Sanders JG, McDonald D, Amir A, Ladau J, Locey KJ et al.** (2017) A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 551: 457–463. DOI: 10.1038/nature24621
30. **Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ et al.** (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 108: 4516. DOI: 10.1073/pnas.1000080107
31. **Rodriguez-R LM, Castro JC, Kyrpides NC, Cole JR, Tiedje JM, Konstantinidis KT** (2018) How much Do rRNA gene surveys underestimate extant bacterial diversity? *Applied and Environmental Microbiology* AEM.00014-18 DOI: 10.1128/AEM.00014-18
32. **Rideout JR, He Y, Navas-Molina JA, Walters WA, Ursell LK, Gibbons SM et al.** (2014) Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ* 2: e545. DOI: 10.7717/peerj.545
33. **Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP** (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*.11: 2639–2643.
34. **D. F. Rodrigues, J. M. Tiedje** (2008) Coping with our cold planet. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1677–1686. DOI: 10.1128/AEM.02000-07
35. **Guibert LM, Loviso CL, Borglin S, Jansson JK, Dionisi HM, Lozada M** (2016) Diverse bacterial groups contribute to the alkane degradation potential of chronically polluted subantarctic coastal sediments. *Microbial Ecology* 71: 100–112. DOI: 10.1007/s00248-015-0698-0
36. **Lozada M, Mercadal JPR, Guerrero LD, Di Marzio WD, Ferrero MA, Dionisi HM** (2008) Novel aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes from coastal marine sediments of Patagonia. *BMC Microbiology* 8: 50. DOI: 10.1186/1471-2180-8-50
37. **Dionisi HM, Lozada M, Marcos MS, Di Marzio, WD, Loviso CL** (2011) Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. In: Handbook of Molecular Microbial Ecology II - Metagenomics in Different Habitats, pp. 461–473. *Indianapolis: Wiley*
38. **Guibert LM, Loviso CL, Marcos MS, Commendatore MG, Dionisi HM, Lozada M** (2012) Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microbial Ecology* 64: 605–616. DOI: 10.1007/s00248-012-0051-9
39. **Marcos MS, Lozada M, Di Marzio WD, Dionisi HM** (2012) Abundance, dynamics, and biogeographic distribution of seven polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase gene variants in coastal sediments of Patagonia. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1589–1592. DOI: 10.1128/AEM.06929-11
40. **Espínola F, Dionisi HM, Borglin S, Brislawn CJ, Jansson JK, Mac Cormack WP et al.** (2018) Metagenomic analysis of subtidal sediments from polar and subpolar coastal environments highlights the relevance of anaerobic hydrocarbon degradation processes. *Microbial Ecology* 75: 123–139. DOI: 10.1007/s00248-017-1028-5
41. **Gil MN, Torres AI, Amin O, Esteves JL** (2011) Assessment of recent sediment influence in an urban polluted subantarctic coastal ecosystem. Beagle Channel (Southern Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 62: 201–207. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2010.10.004
42. **Calderoli P, Espínola F, Dionisi H, Gil MN, Jansson J, Lozada M** (2018) Predominance and high diversity of genes associated to denitrification in metagenomes of subantarctic coastal sediments exposed to urban pollution. *PLOS ONE in press*. DOI: 10.1371/journal.pone.0207606
43. **Dionisi HM, Lozada M, Olivera NL** (2012) Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Revista Argentina de Microbiología* 44: 49–60.
44. **Sanchez-Andrea I, Jetten M** (2018) Editorial overview: Microbial environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 50: vii–ix. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.03.004
45. **Musumeci MA, Lozada M, Rial DV, Mac Cormack WP, Jansson JK, Sjöling S et al.** (2017) Prospecting biotechnologically-relevant monooxygenases from cold sediment metagenomes: an in silico approach. *Marine Drugs* 15: 114. DOI: 10.3390/md15040114
46. **Charles TC, Liles MR, Sessitsch A** (2017) Functional Metagenomics: Tools and Applications. *Basel: Springer*.
47. **Dumorne K, Córdova DC, Astorga-Eló M, Renganathan P** (2017) Extremozymes: a potential source for industrial applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 649–659. DOI: 10.4014/jmb.1611.1100
48. **Bramhachari PV, Mutyala S, Bhatnagar I, Pallela R** (2016) Novel Insights on the Symbiotic Interactions of Marine Sponge-Associated Microorganisms: Marine Microbial Biotechnology Perspective. In: Marine Sponges: Chemocobiological and Biomedical Applications, pp. 69–95 *Basel: Springer*
49. **Rashamuse K, Sanyika Tendai W, Mathiba K, Ngcobo T, Mtimka S, Brady D** (2017) Metagenomic mining of glycoside hydrolases from the hindgut bacterial symbionts of a termite (*Trinervitermes trinervoides*) and the characterization of a multimodular α -1,4-xylanase (GH11). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 64: 174–186. DOI: 10.1002/bab.1480
50. **Barroca M, Santos G, Gerday C, Collins T** (2017). Biotechnological aspects of cold-active enzymes. In Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology, pp. 461–475 *Basel: Springer*.
51. **Trincone A.** Biocatalytic processes using marine biocatalysts: ten cases in point. *Current Organic Chemistry* 17: 1058–1066. DOI: 10.1007/978-3-319-57057-0_19

52. **Perfumo A, Banat IM, Marchant R** (2018) Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. *Trends Biotechnology* 36: 277-289. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.10.016

53. **Timmis K, De Lorenzo V, Verstraete W, Ramos JL, Danchin A, Brüßow H et al.** (2017) The contribution of microbial biotechnology to economic growth and employment creation. *Microbial Biotechnology* 10: 1137–1144. DOI: 10.1111/1751-7915.12845

Química Viva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista Química Viva

Volumen 17, Número 3, Diciembre de 2018

ID artículo: E0134

[Versión online](#)