

ARTÍCULOS

Ecología microbiana: desde el microscopio hasta el análisis genómico y bioinformático

Microbial ecology: from microscopy to genomic and bioinformatics analysis

Sandra Ignacia Ramírez Jiménez

0000-0002-4344-0896, ramirez_sandra@uaem.mx

Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)

Santiago Cadena Rodríguez

santiago.cadena@uaem.edu.mx

Investigador posdoctoral, Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)

RESUMEN

La ecología microbiana se encarga del estudio de las interacciones de los microorganismos entre ellos y con su ambiente, cuyo conocimiento permite comprender la estructura y composición de las comunidades microbianas en un hábitat determinado, como ecosistemas extremos poco explorados o ambientes del entorno humano. Más aún: permite asociar los procesos metabólicos de algunos microorganismos con aplicaciones biotecnológicas en industrias como la alimenticia, la farmacéutica o la agricultura. Estas aplicaciones tecnológicas sólo son posibles cuando se conoce a detalle la identidad y función de las comunidades microbianas que realizan estos procesos, ámbito de estudio de la ecología microbiana.

PALABRAS CLAVE

microorganismos, microscopía, cultivos microbianos, biología molecular, ecología microbiana

ABSTRACT

Microbial ecology is responsible for the study of the interactions of microorganisms among themselves and with their environment, whose knowledge allows understanding the structure and composition of microbial communities in a given habitat, such as little explored extreme ecosystems or environments of the human domain. Moreover, it allows the association of the metabolic processes of some microorganisms with biotechnological applications in industries such as food, pharmaceuticals or agriculture. These technological applications are only possible when the identity and function of the microbial communities that carry out these processes, the field of study of microbial ecology, are known in detail.

KEYWORDS

microorganisms, microscopy, microbial cultures, molecular biology, microbial ecology

El mundo microbiano

Los microorganismos o microbios son seres vivos diminutos imperceptibles a simple vista. Su tamaño se ubica en magnitudes correspondientes a un micrómetro (μm), unidad de longitud que equivale a una millonésima parte de un metro y que en notación científica corresponde a 10^{-6}m . El diámetro promedio de un cabello humano se encuentra entre 20 y 40 μm , mientras que el diámetro promedio de una bacteria está entre 0.5 y 4 μm y el tamaño de algunas biomoléculas, como las proteínas, es de aproximadamente 0.01 μm .

Siguiendo la actual organización de los seres vivos propuesta por Carl Woese (Woese et al., 1990), los microorganismos se encuentran principalmente en los dominios Bacteria y Archaea (Adam et al., 2017). También pueden encontrarse algunos ejemplos en el dominio Eukaryota, entre los que se incluyen los hongos, las microalgas y el zooplancton. Los microorganismos constituyen el grupo de seres vivos más abundante en la Tierra. Se ha estimado que cerca del 60% de la biomasa de nuestro planeta está constituida por microbios (Whitman et al., 1998), lo que equivale aproximadamente a 1.2×10^{30} de células microbianas (Flemming y Wuertz, 2019).

El número de células microbianas en la Tierra es nueve órdenes de magnitud mayor que la cantidad de estrellas estimadas en el universo observable (Knight et al., 2012). En contraste, en la actualidad sólo se han descrito y reconocido 99 *phylum* bacterianos y 14 *phylum* arqueanos (Parks et al., 2018). Un *phylum* es un nivel taxonómico que sucede al dominio, según los siete niveles de clasificación de los seres vivos. Los últimos dos niveles de esta clasificación son el género y la especie. Algunas organizaciones internacionales, como el Proyecto del Microbioma de la Tierra (Earth Microbiome Project) (Gilbert et al., 2014) y la Fundación Tara Oceanos (Tara Oceans Foundation) (Sunagawa et al., 2020), realizan esfuerzos para caracterizar la diversidad filogenética y metabólica microbiana de nuestro planeta.

Los microbios constituyen una parte esencial de los ecosistemas, ya que se encuentran presentes en la atmósfera, en los suelos y en los cuerpos de agua. Su presencia y actividad está íntimamente relacionada con la biogeoquímica de la Tierra y favorece, por ejemplo, el reciclaje de los denominados bioelementos, es decir, aquellos elementos químicos fundamentales para todos los seres vivos, entre los que se encuentran el carbono, el nitrógeno, el hidrógeno, el oxígeno, el fósforo y el azufre (CHONPS).

Este reciclaje se centra en la transformación de algunas moléculas existentes en el entorno, que son incorporadas por los microorganismos para utilizarlas como alimento. En este proceso, las degradan, toman los elementos químicos que les son de utilidad y desechan, como parte de otras moléculas diferentes, aquellos elementos que no utilizan. Estas transformaciones son la base de los ciclos biogeoquímicos, como el de la fijación del carbono, el de fijación de nitrógeno o la degradación de materia orgánica, por mencionar algunos ejemplos (Falkowski et al., 2008).

Las capacidades metabólicas de los microorganismos son amplias, ya que algunos utilizan el oxígeno atmosférico (O_2) para sustentar su metabolismo, es decir, son organismos aerobios como los seres humanos, que necesitamos respirar oxígeno para subsistir. Otros microorganismos pueden respirar metano (CH_4) y utilizan la energía extraída de esta molécula para vivir. Existen otros que pueden respirar compuestos derivados del azufre, como el sulfuro de hidrógeno (H_2S), o del nitrógeno, como aquellos que metabolizan el ion nitrato (NO_3^-). Inclusive algunos microorganismos pueden obtener energía de compuestos, como los pesticidas, hidrocarburos o metales pesados, que para otros organismos representan agentes tóxicos (Madigan et al., 2004).

Los virus son otro tipo de organismos diminutos; no obstante, existe una amplia discusión acerca de si deben o no considerarse seres vivos. El principal argumento en contra de considerarlos como tales es que dependen de otro organismo, distinto a ellos, para replicarse, es decir, para generar más virus. También los virus se encuentran distribuidos en los ecosistemas y cuando llegan a estar en contacto con las células de otro ser vivo, identificado de manera genérica como hospedero, desarrollan un proceso denominado infección. Ese contacto les permite introducir su material genético en la célula hospedera y aprovechar la maquinaria genética de ésta para reproducirse, provocando que la célula hospedera muera. Existen virus que pueden infectar exclusivamente a algunos microorganismos, como las bacterias, a los que se les denomina bacteriófagos (Madigan et al., 2004). También existen virus que afectan la salud de los seres humanos, como el de la influenza o el SARS-COV-2, responsable del COVID-19 (Esakandari et al., 2020).

Los primeros pasos de la microbiología

Los microorganismos fueron descubiertos gracias a la invención del microscopio. Anton van Leeuwenhoek, un comerciante de telas holandés, construyó el primer microscopio en el siglo XVII. Originalmente, Leeuwenhoek deseaba observar los detalles de las costuras y los tejidos de sus telas, pero su curiosidad lo llevó a exponer diferentes muestras bajo su microscopio. Observó agua, sangre, semen —él descubrió los espermatozoides— y un sinnúmero de materiales. Con sus observaciones se reveló la existencia de los microorganismos y su abundancia en la naturaleza y, además, se definieron diferentes morfologías microbianas, como los cocos, bacilos o espiroquetas. Leeuwenhoek no contaba con formación científica; fue su propia curiosidad lo que le llevó a ser uno de los más grandes naturalistas de todos los tiempos (Karamanou et al., 2010).

El químico francés Louis Pasteur fue uno de los pioneros en cultivar microorganismos en laboratorio, al haber trabajado con la industria del vino en 1864. Con sus experimentos, Pasteur demostró a la comunidad científica de su época que la fermentación del mosto de las uvas, el proceso en el que azúcares como la glucosa son transformados en etanol, era provocada por

microorganismos vivos. También demostró que el deterioro y el mal sabor que el vino adquiriría por el añejamiento eran provocados por microorganismos. Para eliminar este problema, desarrolló el proceso conocido como pasteurización, al calentar el vino a 60 °C para exterminar a los pequeños seres. Esta innovación revolucionó no sólo la industria del vino sino también la de producción de cerveza y la de muchos otros alimentos, como la leche, miel, pepinillos, entre otros (Smith, 2007).

Por otro lado, los médicos alemanes Robert Koch, Julius Richard Petri y Walter Hesse contribuyeron significativamente en el área de la salud humana. Sus estudios permitieron descubrir que algunos microorganismos eran los causantes de ciertas enfermedades. Particularmente, trabajaron con la tuberculosis y el ántrax, e identificaron a las bacterias *Mycobacterium tuberculosis* y *Bacillus anthracis* como las causantes de estas infecciones. Los medios de cultivo que se utilizaron para alimentar a microorganismos de este tipo contenían sangre, líquido linfático o líquidos biliares de animales como borregos, cerdos o vacas. En ese tipo de medios, los microbios se reproducían y era posible tenerlos disponibles para estudiarlos en el laboratorio.

Koch contribuyó desarrollando postulados que permiten identificar de manera inequívoca cuando un microorganismo es el causante de una enfermedad. Petri desarrolló una pequeña caja de vidrio circular en la que podía colocarse un medio de cultivo para hacer crecer a los microorganismos y estudiarlos. Hesse incorporó el uso del agar —una sustancia utilizada para preparar gelatinas— en los medios de cultivo líquidos para convertirlos en medios de cultivo sólidos. Esta sencilla pero útil implementación permitió aislar cultivos puros de microorganismos a través de la técnica de siembra en estriado, en la cual una muestra se va arrastrando sobre la superficie del medio de manera tal que se diluye sistemáticamente para permitir el crecimiento de colonias aisladas que idealmente se originan a partir de un único microorganismo. Esta técnica es bastante utilizada en los actuales laboratorios de microbiología (Kruif, 1997).

Los medios de cultivo intentan simular el ecosistema natural en el que viven los microorganismos. Sin embargo, las estimaciones actuales indican que sólo el 1% de la diversidad microbiana existente en la naturaleza se ha podido cultivar en el laboratorio. Esto se debe a que los microorganismos poseen requerimientos nutricionales muy específicos, difíciles de replicar artificialmente (Stewart, 2012). Los microorganismos que aún no han logrado cultivarse se conocen como *materia oscura microbiana*. Afortunadamente, es posible acceder a ellos a través de técnicas de biología molecular, también llamadas *técnicas independientes de cultivo*, en las cuales no es necesario cultivar a los microorganismos *in vitro* para estudiarlos (Jiao et al., 2021).

Técnicas de biología molecular en el desarrollo de la microbiología

En 1953, el biólogo James Watson y el biofísico Francis Crick, ambos estadounidenses, anunciaron la elucidación de la estructura de doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN), logro

al cual contribuyó sustancialmente el trabajo de rayos x de la cristalógrafa inglesa Rosalind Franklin. A partir de entonces se revolucionó el estudio de la biología en el mundo. En los años siguientes se demostró que el ADN es un código que lleva consigo las instrucciones necesarias para el desarrollo metabólico de los seres vivos. Con ello, se formaron subdisciplinas de la microbiología, la biología molecular y la genómica microbiana (Madigan et al., 2004).

En 1969, el microbiólogo estadounidense Thomas D. Brock estudió algunos de los géiseres termales del Parque Nacional Yellowstone, en Estados Unidos, y reportó, por primera vez, la existencia de microorganismos capaces de vivir en temperaturas cercanas a 80° C. Este descubrimiento llamó la atención hacia esos seres microscópicos extremos, actualmente identificados como organismos hipertermófilos. El estudio detallado de las estrategias de adaptación del microorganismo *Thermus aquaticus* (Brock, 1997) condujo al aislamiento de la enzima Taq polimerasa, pieza clave en el desarrollo de una de las técnicas más poderosas utilizadas en genética: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por *polymerase chain reaction*).

La enzima Taq polimerasa participa en la replicación del ADN de estos organismos hipertermófilos. Esa función es la que se aprovecha en los laboratorios de investigación en genética, ya que esta enzima se utiliza para duplicar el ADN de algún otro organismo, logrando con ello la producción de cientos de miles de copias de un mismo gen. Esto es necesario porque los ácidos nucleicos son moléculas muy pequeñas que se encuentran en una baja proporción en las células.

Con esta herramienta es muy práctico replicar y magnificar los genes de una célula para estudiarlos con mayor facilidad. La técnica de PCR fue desarrollada por el bioquímico estadounidense Kary Mullis, galardonado en 1993 con el Premio Nobel de Química precisamente por este desarrollo. Actualmente, la PCR tiene diversas aplicaciones, por ejemplo, para el descubrimiento de genes asociados a enfermedades específicas como el cáncer, la genética forense e incluso para la rápida detección de agentes patógenos, como el virus SARS-COV-2.

Una de las herramientas más utilizadas para el estudio, no sólo de las poblaciones microbianas sino inclusive de organismos multicelulares, se basa en la caracterización de los genes ribosomales 16S y 18S. Estos genes son piezas del ADN que codifican para la elaboración de ribosomas, que son estructuras que participan directamente en la síntesis de aminoácidos, por lo cual son esenciales para el correcto funcionamiento celular. Es particularmente útil identificar al gen 16S en los dominios Bacteria y Archaea, así como al gen 18S en el dominio Eukaryota, ya que son genes altamente conservados, es decir, que se han mantenido sin cambios durante millones de generaciones.

Tanto en el gen 16S como en el 18S existen regiones conocidas como hipervariables que, como su nombre lo indica, presentan una alta variabilidad en la secuencia de nucleótidos. Esta característica ayuda a establecer una correspondencia inequívoca con cierta especie biológica, es decir, la información contenida en la región hipervariable de un organismo permite

establecer si se trata de un pez, un mamífero o una bacteria. Al mismo tiempo, permite diferenciar con un alto nivel de confianza una bacteria de otra o un mamífero de otro. En el lenguaje de la taxonomía de los seres vivos, la información de la región hipervariable permite llegar al último nivel de clasificación al definir la especie de un organismo, lo que implica un alto grado de especificidad (Patwardhan et al., 2014).

Esto es práctico en el estudio de las poblaciones microbianas para conocer con precisión la identidad de los microorganismos investigados. Así, se considera que existen genes que son como un código de barras en el ADN que identifica a cada organismo. Esta idea sustenta la creación de la organización denominada The International Barcode of Life Consortium, que pretende mapear y almacenar el ADN de todos los seres vivos de la Tierra (Valentini et al., 2009). De manera complementaria, la principal base de datos que almacena y actualiza la información de los genes 16S y 18S ribosomales se denomina SILVA Database Project (Quast et al., 2013), nombrada así por la palabra *silva*, que en latín significa *bosque*.

Entre 1980 y 1990 se popularizaron las técnicas conocidas como *huellas digitales moleculares* o *molecular fingerprints*, las cuales se basan en el estudio de comunidades de microorganismos mediante el análisis de fragmentos de su ADN que contienen la información necesaria para sintetizar en las células a los genes 16S y 18S de ARN ribosomales. Estas técnicas proporcionan una visión parcial de la identidad y el número de individuos específicos para cierta comunidad microbiana, es decir, resultan en la huella digital genética para esa comunidad.

La principal ventaja de estas técnicas es que se genera una gran cantidad de información en un tiempo corto, con la que es posible realizar análisis estadísticos de la comunidad en estudio, los cuales permiten definir aspectos como el índice de biodiversidad, el de similitud entre muestras o el de riqueza de especies (Marzorati et al., 2008). Aunque estas técnicas son muy útiles para conocer a los individuos de una comunidad microbiana, aún tienen limitaciones para determinar con precisión el tipo de organismos presentes y su abundancia relativa, es decir, la composición y la estructura de la comunidad microbiana de interés.

Secuenciación masiva de genes y su análisis a través de la bioinformática

Frederick Sanger y Alan Coulson, ambos bioquímicos británicos, propusieron en 1977 un método para conocer el orden en el que se presenta cada uno de los nucleótidos que forman una cadena de ADN. Este método se conoce como *secuenciación* y su desarrollo fue posible gracias al desarrollo de moléculas modificadas llamadas *dideoxynucleótidos terminales*, que ayudan a detener la incorporación de nucleótidos en lugares específicos de las cadenas de ADN durante el proceso de replicación. Con el paso del tiempo, este método se automatizó y permitió la elucidación de genomas completos, inicialmente de genomas pequeños, como el del bacteriófago MS2, que contiene sólo 3,600 pares de bases (pb).

En 1998 se logró la secuenciación del material genético del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, que ronda los cien millones de pb, y para el año 2001 se logró la secuenciación del genoma humano, el cual contiene cerca de 3.2 billones de pb (Pereira et al., 2020). La primera técnica de secuenciación masiva surgió en 2004 y fue desarrollada por la empresa Life Sciences-Roche 454. Esta técnica permite leer en paralelo millones de fragmentos de ADN con la ayuda de señales luminiscentes que indican la incorporación de los nucleótidos, mientras un equipo va capturando la señal de la secuencia. Actualmente, la secuenciación o lectura del ADN se ha convertido en un proceso muy convencional gracias a la reducción en costo y tiempo de análisis.

En ecología microbiana, la secuenciación masiva puede apoyar en la elucidación de fragmentos pequeños de ADN, como los genes 16S y 18S ARN ribosomales, para determinar la identidad de los microorganismos. La secuenciación metagenómica o *shotgun* es una variante que consiste en secuenciar el ADN total de una muestra ambiental, es decir, permite elucidar todos los genes contenidos en una muestra dada. Con ello es posible reconstruir genomas no sólo de un organismo, sino de comunidades completas de microbios que habitan en un ambiente específico. Independientemente del tipo de secuenciación que se utilice, es necesario aplicar un análisis masivo a los datos obtenidos, lo cual ocurre a través de la informática.

La informática se define como el tratamiento automatizado de datos por computadora. La informática aplicada a la biología se conoce como bioinformática. Esta área del conocimiento combina las herramientas de la estadística y los procesos de programación computacional. Convencionalmente, se utiliza *software* de código libre o propietario, como Linux y MacOS, basado en algún lenguaje de programación, como Python, R o Bash. Esto permite que cualquier usuario pueda, potencialmente, convertirse en desarrollador, ya que los nuevos algoritmos creados son de libre acceso para la comunidad interesada en este tipo de análisis.

Asimismo, una consecuencia de la creciente generación de información es la creación de bases de datos en las que se resguarda la información relativa a los genes, las enzimas y las rutas metabólicas de los microorganismos, entre las que se reconoce el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEEG) y la Anotación de Genoma de Procariontes (Prokka) (Hernández et al., 2020). La información resguardada en estas bases de datos también es de libre acceso para la comunidad interesada, lo cual permite el desarrollo de investigaciones a nivel mundial.

Conclusiones

Los microorganismos son un componente importante de los ecosistemas naturales y también impactan en nuestra vida cotidiana. Las diferentes técnicas que se utilizan en microbiología permiten coleccionar información relevante de un microorganismo o de una comunidad microbiana. Estas técnicas se complementan entre sí y por sus aportes se mantienen

vigentes, aunque algunas hayan sido desarrolladas hace cerca de cuatrocientos años, como es el caso del microscopio. El desarrollo y la constante actualización de las distintas técnicas microbiológicas en el laboratorio y en el campo computacional permiten comprender con mayor profundidad la función de los microorganismos en la naturaleza y generar aplicaciones biotecnológicas para beneficio de la sociedad.

Referencias

- Adam, P. S., Borrel, G., Brochier-Armanet, C. y Gribaldo, S. (2017). The growing tree of Archaea: New perspectives on their diversity, evolution and ecology. *ISME Journal*, 11, 2407-2425. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.122>
- Brock, T.D. (1997). The value of basic research: Discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics*, 4(146), 1207-1210. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.4.1207>
- Esakandari, H., Nabi-Afjadi, M., Fakkari-Afjadi, J., Farahmandian, N., Miresmaeili, S.-M. y Bahreini, E. (2020). A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biological Procedures Online* 22, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12575-020-00128-2>
- Falkowski, P. G., Fenchel, T. y Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*, 80(320), 1034-1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- Flemming, H. C. y Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 247-260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K. y Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: Successes and aspirations. *BMC Biology*, 12, 1-4. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0069-1>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro y Eiros, J. M., (2020). Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Revista Argentina de Microbiología*, 2(52), 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Jiao, J.-Y., Liu, L., Hua, Z.-S., Fang, B.-Z., Zhou, E.-M., Salam, N., Hedlund, B. P. y Li, W.-J. (2021). Microbial dark matter coming to light: Challenges and opportunities. *National Science Review*, 3(8), 1-5. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa280>
- Karamanou, M., Poulakou-Rebelakou, E., Tzetis, M. y Androutsos, G. (2010). Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): Father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 311-314. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016779013>
- Knight, R., Jansson, J., Field, D., Fierer, N., Desai, N., Fuhrman, J. A., Hugenholtz, P., van der Lelie, D., Meyer, F., Stevens, R., Bailey, M. J., Gordon, J. I., Kowalchuk, G. A. y Gilbert, J. A. (2012). Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nature Biotechnology*, 30(6), 513-520. <https://doi.org/10.1038/nbt.2235>
- Kruif, P. D. (1997). *Cazadores de microbios*. Editora Géminis.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. y Stahl, D. A. (2004). *Brock: Biología de los microorganismos* (10ª ed.). Pearson Educación.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D. y Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: Practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 6(10), 1571-1581. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01572.x>
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarszewski, A., Chaumeil, P.-A. y Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36, 996. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
- Patwardhan, A., Ray, S. y Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies—A Review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology*, 2(2), 131. <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>
- Pereira, R., Oliveira, J. y Sousa, M. (2020). Bioinformatics and computational tools for next-generation sequencing analysis in clinical genetics. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), 132. <https://doi.org/10.3390/jcm9010132>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. y Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, D1(41), 590-596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Smith, K. (2007). Technological and economic dynamics of the world wine industry: An introduction. *International Journal of Technology and Globalisation*, 2-3(3), 127-137. <https://doi.org/10.1504/ijtg.2007.014329>
- Stewart, E. J. (2012). Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, 16(194), 4151-4160. <https://doi.org/10.1128/JB.00345-12>
- Sunagawa, S., Acinas, S. G., Bork, P., Bowler, C., Tara Oceans Coordinators, Eveillard, D., Gorsky, G., Guidi, L., Iudicone, D., Karsenti, E., Lombard, F., Ogata, H., Pesant, S., Sullivan, M. B., Wincker, P. y de Vargas, C. (2020). Tara Oceans: towards global ocean ecosystems biology. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 428-445. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0364-5>
- Valentini, A., Pompanon, F. y Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 2(24), 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011>
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. y Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *PNAS*, 95(12), 6578-6583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS*, 87(12), 4576-4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>