

Artículo de Revisión

# Metagenómica: más allá del genoma de los microorganismos (Metagenomics: beyond the genome of the microorganisms)

Por Susana Genti de Raimondi

[sgenti@fcq.unc.edu.ar](mailto:sgenti@fcq.unc.edu.ar)

Profesor Titular del Dpto. de Bioquímica Clínica, Investigador Independiente del CIBICI (CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

## Resumen:

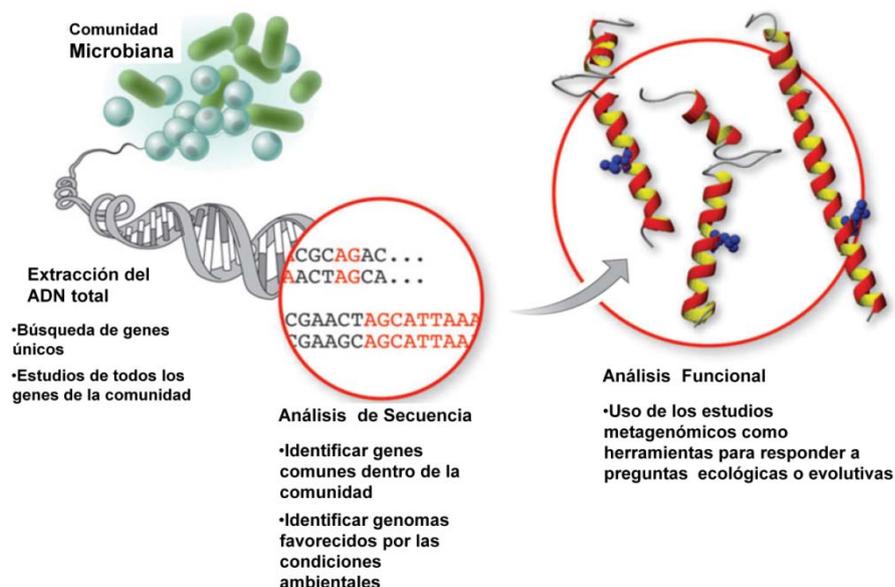
La "metagenómica literalmente" significa "más allá del genoma". A mediados de los años 80 los microbiólogos comenzaron a cambiar los conceptos de la microbiología clásica y a aceptar la idea de la existencia de una vasta vida de microorganismos no cultivables (99,8% no es cultivable) proponiendo la necesidad de disponer de técnicas no tradicionales para entender el mundo microbiano. Entre los métodos diseñados para acceder al conocimiento de la fisiología y genética de organismos no cultivables, la metagenómica se ha convertido en una poderosa herramienta de estudio. Se refiere al análisis funcional y de secuencia independiente de cultivo de toda la colección de genomas microbianos presentes en diferentes nichos o comunidades ambientales, plantas o animales (hombre). En el presente artículo se describen algunos de los avances recientes alcanzados en la aplicación de la metagenómica al conocimiento de la biología humana y ambiental, particularmente a la comprensión del microbioma humano y su potencial uso como herramienta diagnóstica y terapéutica.

## Abstract:

Metagenomics literally means "beyond the genome". In the mid-1980s, microbiologists began to change the concepts of traditional microbiology and to accept the idea of the existence of a vast life of uncultured microorganisms (99.8% is uncultured) proposing the need for non-traditional techniques to understand the microbial world. Among the methods designed to access the knowledge of the physiology and genetics of uncultured organisms, metagenomics has become a powerful tool of study. It refers to functional analysis and sequence independent of cultivation of the entire collection of microbial genomes present in different niches, environmental communities, plants or animals (man). The following article describes some of the recent advances achieved in the application of metagenomics to knowledge of human and environmental biology particularly to the understanding of the Human Microbiome and its potential use as a diagnostic and therapeutic tool.

## Palabras clave

Metagenómica, organismos no cultivables, microbioma humano, ciclo del nitrógeno, microbiología



### Breve Historia

Las raíces de la Microbiología están firmemente asociadas al microscopio. Antonie van Leeuwenhoek observó por primera vez bacterias que recuperó de sus propios dientes a través de un microscopio casero desarrollado por él. El 09 de octubre de 1676 (1) Leeuwenhoek envió una carta a Oldenburg en Londres exponiendo sus ingeniosas observaciones sobre "animáculos" en diversos tipos de agua e infusiones. Ciertas secciones de esta carta que, sin duda, hacen referencia al descubrimiento de Leeuwenhoek de bacterias y otros microorganismos en el agua, son las siguientes: *"Esto fue para mí, lo más maravilloso que he descubierto en la naturaleza, y debo decir que no hay mayor placer que el espectáculo de observar tantos miles de seres vivos en una pequeña gota de agua ... y si digo que hay 100 mil en una gotita... no me equivoco..."*.

Durante 200 años, la microscopía les permitió a microbiólogos ver organismos heterótrofos, autótrofos y parásitos obligados. Desde la década de 1880 en adelante, con los postulados de Robert Koch y su innovación en el desarrollo de medios de cultivo, el mundo microbiológico se dividió entre organismos cultivables y no cultivables. Los microbiólogos concentraron sus esfuerzos en el estudio de bacterias en cultivo puro, y como resultado de ello, la mayoría del conocimiento que llena los libros de texto de Microbiología moderna proviene de organismos mantenidos en cultivo puro. En la edición de 1923 del Manual de Bergey se establece categóricamente que ningún organismo puede clasificarse sino puede ser cultivado (2). La divergencia observada entre el número de células bacterianas que forman colonias en los cultivos en placas y el recuento de células obtenido por el examen microscópico es conocido como "la anomalía del recuento en placa" (3). A mediados de los años 80 los microbiólogos comenzaron a cambiar los conceptos de la microbiología clásica y a aceptar la idea de la existencia de una vasta vida de microorganismos no cultivables (99,8% no es cultivable) proponiendo la necesidad de disponer de técnicas no tradicionales para entender el mundo microbiano (4).

### Metagenómica

Entre los métodos diseñados para acceder al conocimiento de la fisiología y genética de organismos no cultivables, la metagenómica se ha convertido en una poderosa herramienta de estudio. Literalmente la "metagenómica" significa "más allá del genoma". Se refiere al análisis funcional y de secuencia independiente de cultivo de toda la

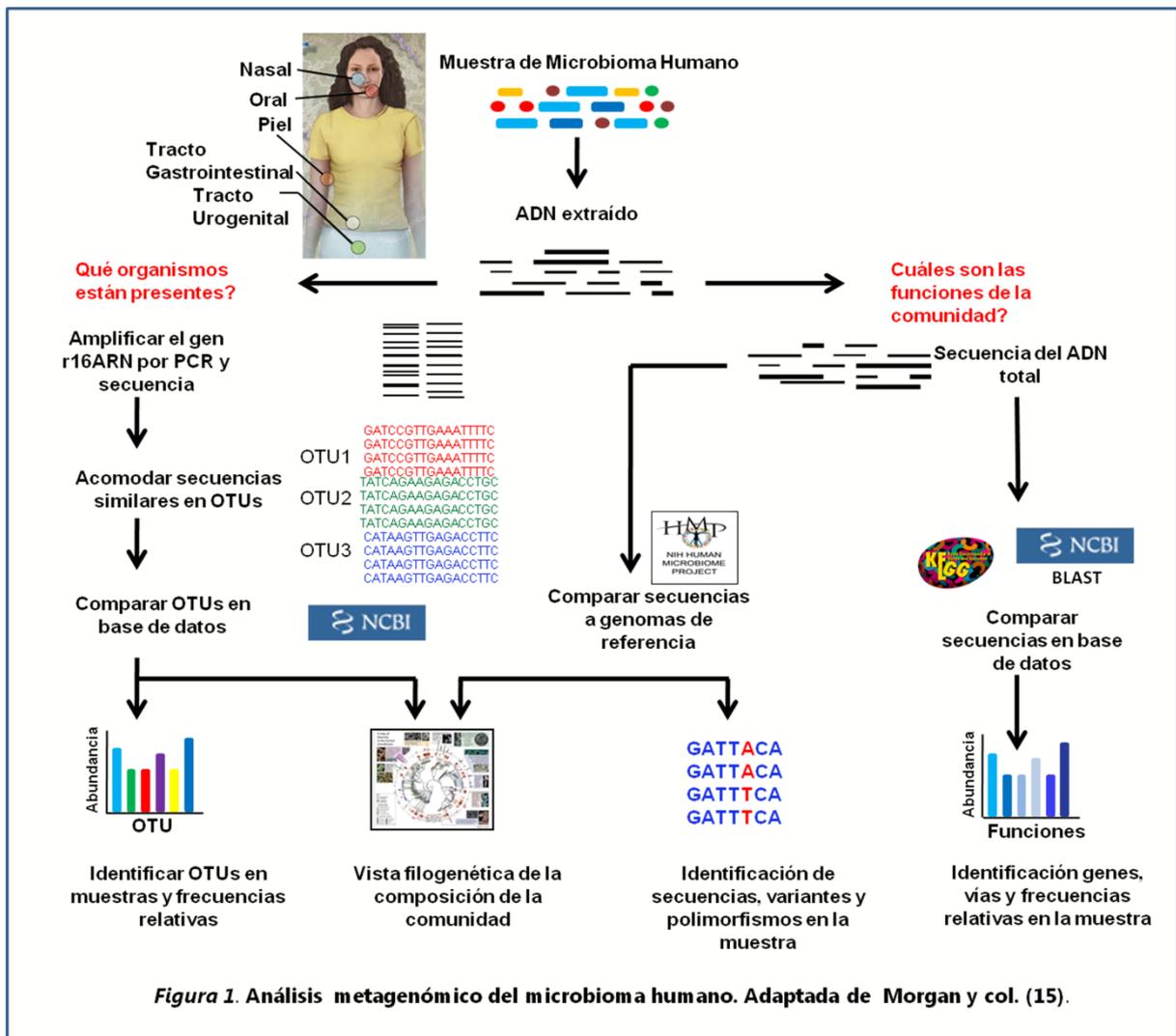
colección de genomas microbianos presentes en diferentes nichos ó comunidades ambientales, plantas ó animales (hombre). Aplica un conjunto de tecnologías genómicas y herramientas bioinformáticas para acceder directamente al contenido genético de comunidades enteras de organismos. Estos métodos "omics" (metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica, metametabolómica) se han utilizado para describir la estructura taxonómica de las comunidades microbianas en diferentes entornos y para descubrir nuevos genes y enzimas de interés industrial y médico. Estas nuevas herramientas nos permiten una mejor comprensión de la diversidad taxonómica microbiana de una comunidad así como establecer su función a los fines de responder a las siguientes preguntas "¿quiénes están allí?" y "¿qué están haciendo?".

El análisis metagenómico consiste en aislar el ADN de una muestra ambiental, clonarlo en un vector adecuado, transformando los clones en una bacteria huésped (Fig. 1). Los clones resultantes pueden ser analizados utilizando marcadores filogenéticos, como el rRNA 16S y recA, o por otros genes conservados mediante hibridación o PCR multiplex (clasificándolos en Unidades Taxonómicas Operacionales –OTU-) o por la expresión de características específicas, tales como actividad enzimática o producción de antibióticos (5-7) o pueden ser secuenciados al azar. Alternativamente, el ADN extraído puede ser amplificado y directamente secuenciado por metodologías de segunda o tercera generación (8). Cada una de estas estrategias tiene sus ventajas y limitaciones.

Los mayores descubrimientos alcanzados con estas tecnologías han permitido avanzar en el conocimiento de la microbiología ambiental sentando las bases ecológicas, fisiológicas, bioquímicas y genómicas para una variedad de procesos microbiológicos que participan en los ciclos biogeoquímicos, incluyendo la oxidación anaeróbica del metano, la fotosíntesis, absorción de fósforo, biodegradación de contaminantes orgánicos y numerosos aspectos de los ciclos de nitrógeno y azufre (9). En este sentido, en el año 2004 Venter y col. iniciaron uno de los proyectos más ambiciosos: "caracterizar las comunidades microbianas del océano en un sitio conocido como Mar de Sargasso (10). A partir de este estudio, se reportaron 1.800 genomas únicos, 48 filotipos bacterianos desconocidos y 1,2 millones de genes previamente desconocidos. Con aproximadamente 1 millón de bacterias por mililitro de agua de mar y un tamaño del genoma promedio estimado de 2 millones de pares de bases, el proyecto del mar de

Sargasso ha secuenciado sólo el 0,05% de la información genómica contenida en un solo mililitro — proverbialmente una gota en el océano—. Estudios posteriores del mismo grupo, por ejemplo, la expedición de muestreo Global del Océano (GOS) analizó muestras del Atlántico noroeste y del Pacífico tropical, y produjeron 6,3 billones de pares de bases de 7,7 millones de secuencias (11, 12). Este

enfoque básico eventualmente permitirá a los investigadores predecir cambios del ecosistema en la micro-biósfera y determinar cómo esos cambios influyen en los procesos globales, tales como el clima.



## El ciclo del Nitrógeno

Los ciclos biogeoquímicos constituyen el intercambio de los elementos químicos que forman parte de la vida entre los componentes abióticos del planeta y los seres vivos. Entre estos se encuentran el carbono, el hidrógeno, el nitrógeno y el oxígeno como elementos mayoritarios.

**El ciclo del nitrógeno** implica el conjunto de procesos mediante los cuales la masa de este elemento se transforma químicamente y se moviliza entre distintos componentes de la biósfera y la atmósfera; esta última representa su mayor reservorio en forma de gas nitrógeno ( $N_2$ ). Se compone de seis procesos principales: la fijación del nitrógeno, la nitrificación, la **desnitrificación**, la oxidación anaeróbica del amoníaco (anammox, por **anaerobic ammonium oxidation**), la asimilación y la mineralización (Fig. 2). En todas ellas, es fundamental el papel que juegan los microorganismos, y en particular, las bacterias.

La reducción disimilatoria de  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$  (DNRA) es un proceso de sumo interés pues interviene en varias transformaciones como la desnitrificación, la DNRA y la anammox. La pérdida del nitrato o, en última instancia, del nitrógeno de la biósfera presenta dos contrararas. Por un lado tiene un efecto perjudicial sobre los campos dedicados a la agricultura donde se produce una disminución de la cantidad de este nutriente, representando una pérdida económica para los productores que deben aplicar un mayor volumen de fertilizantes artificiales. Por la otra parte, la acumulación de nitrato en el agua tiene un efecto tóxico sobre los organismos acuáticos por sí mismo y lleva además al proceso de eutrofización. El nitrato que llega a los cursos de agua proviene principalmente de la actividad agrícola. En este caso, la eliminación del nitrato, siempre que finalice en la formación de dinitrógeno y no en los óxidos de nitrógeno, resulta en un efecto beneficioso para los ambientes acuáticos. Lo mismo ocurre en las plantas de tratamiento de aguas residuales, ya sean hogareñas o industriales, donde la aplicación de estos procesos biológicos son esenciales para la depuración de dichos residuos que luego son volcados a los cursos de agua, lagos o mares.

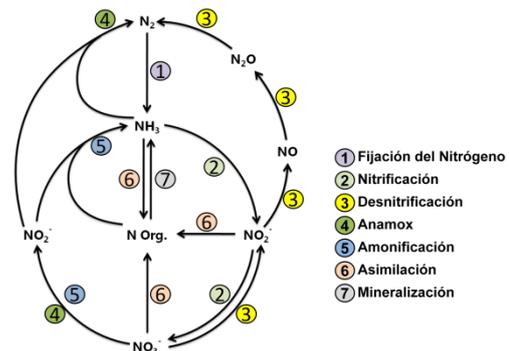


Figura 2. Esquema del ciclo del nitrógeno.

En estudios realizados en el laboratorio se evaluó la población bacteriana reductora de nitrato de sedimentos del río Suquia a través del estudio del gen *narG*, el cual codifica a la subunidad catalítica de la enzima NarGHI (conversión de  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$ , Fig.2, paso 3). Dicha proteína está presente en gran cantidad de filos procariontes, y su gen resulta de gran utilidad para el análisis de los organismos que participan en una de las principales transformaciones dentro del ciclo del nitrógeno.

Se evaluó la diversidad molecular del gen *narG* de sedimentos del río Suquia para establecer el impacto de la concentración de nitrato y la calidad del agua en la composición y estructura de la comunidad bacteriana reductora de nitrato. Para ello, se construyó una biblioteca de una de los seis puntos muestreados, correspondientes a la mayor concentración de nitrato, analizando 118 clones. Las secuencias de nucleótidos se asociaron al gen *narG* de *alfa*, *beta*, *delta*, y *gammaproteobacterias* y *Thermus thermophilus*. El 18% de los clones contenían secuencias *narG* con similitud inferior al 69% de las secuencias *narG* disponibles en bases de datos, indicando la presencia de bacterias reductoras de nitrato conteniendo genes *narG* nuevos. Estas bacterias fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real. Los resultados mostraron un número variable de copias *narG*, que van desde menos de  $1,0 \times 10^2$  a  $5,0 \times 10^4$  copias por ng de ADN. Estas bacterias se asociaron con un índice de calidad de agua disminuida monitoreado a lo largo de la cuenca del río en diferentes momentos (13).

## La metagenómica y el Microbioma Humano

El cambio de milenio se inició con la divulgación del genoma humano completo, dejando un legado de procesos, herramientas e infraestructura. Desde entonces, la atención se ha centrado en el uso de estas herramientas para el mapeo del microbioma

humano facilitado por la organización de consorcios de genómica a gran escala, como el proyecto del microbioma humano (HMP) y metagenoma del tracto Intestinal humano (MetaHIT) (14).

Al nacimiento los seres humanos consisten sólo de sus propias células somáticas pero durante los primeros años de vida, nuestros cuerpos, incluyendo la superficie de la piel, cavidad oral y los intestinos, son colonizados por una enorme variedad de bacterias, archaea, hongos y virus, que forman una comunidad que se conocen colectivamente como el microbioma humano o microbiota. Esta microbiota interactúa con el huésped para colaborar en la alimentación, resistir patógenos y educar al sistema inmunológico. El potencial genético colectivo (metagenoma) del microbioma humano es cien veces mayor que el genoma humano y condiciona profundamente el estado de salud y enfermedad. El conocimiento resultante de la composición del microbioma humano, la función y el rango de variación en diversos sitios del cuerpo ha permitido establecer un cuadro importante de interacciones comensales huésped-microbio y microbio-microbio, así como su rol en la salud humana y la enfermedad y su potencial como herramienta diagnóstica y terapéutica (15).

El HMP es el estudio más grande del microbioma humano realizado hasta la fecha, representa un esfuerzo de cinco años. Determina la diversidad microbiana en individuos libres de enfermedades mediante la secuenciación de más de 5.000 muestras de aproximadamente 250 voluntarios sanos en dos ciudades de Estados Unidos. Cada individuo fue muestreado en 15 ó 18 sitios del cuerpo (nueve en la cavidad oral, cuatro en piel, uno en la cavidad nasal, y tres en la cavidad vaginal), y aproximadamente la mitad de los sujetos fueron muestreados en un máximo de dos puntos adicionales. Las muestras se analizaron mediante secuenciación del amplicon 16S para determinar la composición de la comunidad y aproximadamente el 15% fueron sometidas a secuenciación metagenómica para determinar la función de la comunidad. Además de ampliar el catálogo de genes del proyecto MetaHIT del intestino con casi 1,8 millones de genes y la identificación de un recuento de genes microbianos únicos totales por más de 10 millones, el HMP permitió la detección de asociaciones microbianas y sitios del cuerpo. Un mapa de la diversidad del microbioma humano indica que está dominado principalmente por cuatro filos: actinobacterias, bacteroidetes, firmicutes y proteobacterias (15).

La comprensión de este complejo sistema microbiano y la predicción de su dinámica requieren de la integración de datos obtenidos mediante diferentes metodologías. Por ejemplo, el aislamiento microbiano y la metagenómica permiten la caracterización de las comunidades microbianas, y pueden ser combinados con la metabolómica y modelos de vías de señalamiento para obtener la red metabólica de los organismos de toda la comunidad. El conocimiento de la regulación de estos sistemas microbianos en estados de salud y enfermedad, podrían ser definidos mediante el uso de genómica comparativa *in silico*, y posteriormente validados usando análisis de microarreglos (16).

Esencialmente, “nosotros debemos mirar lo más pequeño e ignorado para entender nuestro futuro sobre el planeta” (9).

### Bibliografía

1. Porter JR. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev* 1976;40(2):260-9.
2. Bergey DH. Society of American Bacteriologists. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. 1923.
3. Staley JT, Konopka A. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 1985;39:321-46.
4. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(20):6955-9.
5. Courtois S, Cappellano CM, Ball M, Francou FX, Normand P, Helynck G, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(1):49-55.
6. Lorenz P, Liebeton K, Niehaus F, Eck J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(6):572-7.
7. Schloss PD, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14(3):303-10.
8. Morey M, Fernandez-Marmiesse A, Castineiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol Genet Metab* 2013;dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.024.

9. Gilbert JA, Dupont CL. Microbial metagenomics: beyond the genome. *Ann Rev Mar Sci* 2011;3:347-71.
10. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 2004;304(5667):66-74.
11. Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biol* 2007;5(3):e77.
12. Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ, Remington K, et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biol* 2007;5(3):e16.
13. Reyna L, Wunderlin DA, Genti-Raimondi S. Identification and quantification of a novel nitrate-reducing community in sediments of Suquia River basin along a nitrate gradient. *Environ Pollut* 2010;158(5):1608-14.
14. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res* 2012;160(4):246-57.
15. Morgan XC, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet* 2013;29(1):51-8.
16. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottiere HM, Raes J, et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut* 2013;62(1):146-58.