

Caracterización de bacterias litobiónticas antárticas



Lic. Valentina Carrasco Muñoz

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA Biología

Orientadora: Dra. Elena Fabiano; Co-orientadora: Dra. Vanesa Amarelle

Tribunal: Dra. Ángela Cabezas; Dra. Silvana Alborés; Dr. Gastón Azziz

MAYO
2022



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS



PEDECIBA
MEC-UDELAR



Ministerio
**de Educación
y Cultura**



iibce

INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
CLEMENTE
ESTABLE



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN



comisión académica
de posgrado

universidad de la república



Bionanotechnology &
Microbiology Lab



Institut Pasteur
de Montevideo

Agradecimientos



Índice

Introducción general	1
Litobiontes	1
Definiciones	1
Litobiontes antárticos	4
Factores de estrés	4
Estrategias de supervivencia	6
Composición de la microbiota	8
Litobiontes y metabolismo de metales	9
Hipótesis	12
Objetivos	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Capítulo I: Aislamiento, identificación y caracterización de las bacterias cultivables	13
Introducción	13
Materiales y métodos	14
Sitio de muestreo y caracterización de las rocas	14
Procesamiento de las muestras, aislamiento de bacterias y generación de la colección	14
Identificación de los aislamientos de la colección	15
Ensayos de tolerancia a metales	16
Resultados	16
Características de las rocas	16
Análisis de bacterias litobióticas cultivables	17
Discusión	31
Capítulo II: Producción de <i>quantum dots</i> de sulfuro de cadmio por la cepa litobiótica antártica <i>Pedobacter</i> sp. UYP1 y su aplicación como fotosensibilizadores en celdas solares	36
Resumen	36
Introducción	37
Materiales y métodos	39
Selección y caracterización de la cepa utilizada en este trabajo	39
Ensayo de detección de H ₂ S	40
Secuenciación del gen 16S rRNA y análisis de su secuencia	40
Biosíntesis de CdS QDs	41
Purificación y concentración de los CdS QDs	41
Caracterización de las NPs biosintetizadas	41
Fabricación de celdas solares sensibilizadas con QDs (QDSSC)	42
Resultados	43
Selección, caracterización e identificación de <i>Pedobacter</i> sp. UYP1	43
Producción de H ₂ S por <i>Pedobacter</i> sp. UYP1	46
Biosíntesis de CdS QDs	47
Caracterización de los CdS QDs biosintetizados	48

CdS QDs biosintetizados por <i>Pedobacter</i> sp. UYP1 como material fotosensibilizador en celdas solares.....	50
Discusión.....	51
Conclusiones.....	54
Contribución al trabajo.....	54
Financiación.....	54
Capítulo III: Análisis metagenómico de la comunidad.....	55
Introducción.....	55
Materiales y métodos.....	56
Extracción de ADN metagenómico.....	56
Evaluación de la calidad del ADN metagenómico.....	60
Metagenómica <i>shotgun</i> y procesamiento de secuencias.....	61
Asignación taxonómica.....	61
Ensamblado y asignación funcional.....	62
Resultados.....	63
Extracción de ADN.....	63
Composición de la comunidad litobiótica.....	64
Análisis funcional de la comunidad litobiótica.....	69
Discusión.....	74
Discusión general y conclusiones finales.....	81
Referencias.....	85
Anexo.....	100

Índice de tablas

Tabla 1: Correlación entre la composición de metales de las rocas y el número de aislamientos crecidos en presencia de metales.....	18
Tabla 2: Asignación taxonómica de los aislamientos.....	19
Tabla 3: Cepas más cercanas a los aislamientos de la colección.....	24
Tabla 4: Producción de H ₂ S y crecimiento bacteriano en medio con Cd ²⁺ de la colección de litobiontes.....	43
Tabla 5: Tolerancia a metales de la cepa UYP1.....	45
Tabla 6: Parámetros fotovoltaicos de las QDSSCs.....	51

Índice de figuras

Figura 1: Representación esquemática de la clasificación de litobiontes.....	2
Figura 2: Rocas de la Antártida marítima.....	6
Figura 3: Colonización endolítica de rocas de tipo cuarzo.....	9
Figura 4: Mecanismos involucrados en la tolerancia a metales.....	11
Figura 5: Sitios de muestreo.....	14
Figura 6: Diagrama TAS para la clasificación de rocas ígneas.....	17
Figura 7: Identificación de las bacterias cultivables.....	29
Figura 8: Tolerancia a metales de los aislamientos obtenidos de las muestras de rocas V6 y V7.....	30
Figura 9: Determinación de MIC de CdCl ₂ para la cepa UYP1.....	44
Figura 10: Análisis filogenético de la cepa UYP1.....	46
Figura 11: Ensayo de liberación de H ₂ S.....	47
Figura 12: Biosíntesis de CdS QDs por <i>Pedobacter</i> sp. UYP1.....	48
Figura 13: Caracterización espectroscópica de los CdS QDs biosintetizados por <i>Pedobacter</i> sp. UYP1.....	48
Figura 14: Caracterización de la composición química y tamaño de los CdS QDs biosintetizados por <i>Pedobacter</i> sp. UYP1.....	50
Figura 15: Asignación de <i>reads</i>	64
Figura 16: Asignación taxonómica de los <i>reads</i> clasificados.....	65
Figura 17: Composición de la comunidad a nivel de filo.....	66
Figura 18: <i>Reads</i> asignados a nivel de género.....	67
Figura 19: Composición de la comunidad a nivel de género.....	68
Figura 20: Asignación funcional de genes basada en la base de datos KO.....	69
Figura 21: Asignación funcional de genes basada en la base de datos COG.....	70
Figura 22: Asignación funcional de genes basada en la base de datos SEED.....	71
Figura 23: Mecanismos de tolerancia a metales.....	72
Figura 24: Genes de tolerancia por metal.....	73
Figura 25: Mecanismos de tolerancia por metal.....	74

Resumen general

Los microorganismos están presentes en los más diversos ambientes del planeta incluso en aquellos considerados, desde nuestro punto de vista, extremos. En este contexto, las rocas constituyen el principal refugio para la vida, brindando protección frente a las condiciones ambientales más adversas, como las presentes en la Antártida.

Los organismos capaces de colonizar las rocas son denominados litobiontes y, pese a estar presentes en casi todos los ambientes, es muy poco lo que se conoce acerca de su dinámica poblacional y de su interacción con el sustrato rocoso.

Partiendo de la hipótesis de que las rocas antárticas albergan una comunidad bacteriana distintiva capaz de interactuar estrechamente con los metales presentes en el sustrato rocoso, se planteó, como objetivo de esta tesis, aportar al conocimiento de la microbiota asociada a las rocas. En particular se propuso conocer la diversidad de la microbiota bacteriana y cuáles son los sistemas relacionados al metabolismo de metales que presenta esta microbiota. Se emplearon estrategias basadas en el aislamiento y estudio de bacterias cultivables, así como la obtención y análisis de metagenomas.

A partir de 2 muestras de roca colectadas en la Península Fildes, Isla Rey Jorge (Antártida) se generó una colección de 86 cepas de bacterias litobióticas cultivables, las cuales fueron identificadas mediante el análisis del gen 16S rRNA. Se detectaron 27 géneros bacterianos pertenecientes a 5 filos, destacándose en ambas muestras el predominio de Actinobacteria y Proteobacterias, con la presencia de un alto número de representantes de los géneros *Arthrobacter*, *Pseudarthrobacter* y *Sphingomonas*. También se destacó la presencia de representantes de Bacteroidetes, como *Mucilaginibacter* e *Hymenobacter*. Al analizar la respuesta de los aislamientos bacterianos a la presencia de metales, se observaron diferentes perfiles de tolerancia a Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Ag^+ . La cepa *Pedobacter* sp. UYP1 fue la que más se destacó debido a su multi-tolerancia, siendo capaz de tolerar AgNO_3 0,1 mM, CdCl_2 0,1 mM, CuSO_4 1 mM, MnCl_2 5 mM y ZnCl_2 5 mM.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la cepa *Pedobacter* sp. UYP1 para evaluar su capacidad de biosintetizar nanopartículas (NPs) como mecanismo de detoxificación de Cd^{2+} . Se elaboró un protocolo de biosíntesis de NPs del tipo *quantum dots* de CdS, las cuales fueron posteriormente caracterizadas. Las NPs emitieron fluorescencia a distintas longitudes de onda dependiendo del tiempo de reacción. Este fenómeno se relacionó con el tamaño de las NPs producidas. Finalmente, se evaluó su aplicación en la construcción de celdas solares, obteniendo parámetros fotovoltaicos similares a los reportados para otras NPs biogénicas. Si bien estos

parámetros no son competitivos con los obtenidos en celdas solares basadas en silicio, se logró validar su aplicación.

Como aproximación independiente de cultivo, se planteó conocer la diversidad presente en el metagenoma litobiótico, así como la presencia de genes posiblemente relacionados a la tolerancia a metales. Con esta finalidad, se realizó la secuenciación *shotgun* de los metagenomas provenientes de ambas muestras de roca. Con esta aproximación se logró profundizar en el conocimiento de la diversidad de la microbiota litobiótica e identificar genes de interés relacionados a la tolerancia a metales allí presentes.

En suma, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis acerca de la relevancia de los nichos litobióticos antárticos como fuente de diversidad taxonómica y funcional, y su potencial para la prospección de bacterias resistentes a metales con aplicaciones biotecnológicas. Por otra parte, se destaca la importancia de utilizar distintas aproximaciones al momento de abordar una determinada pregunta de investigación.

Introducción general

LITOBIONTES

Definiciones

Las rocas pueden ser colonizadas por microorganismos, a los que se les denomina litobiontes (*lithos*: roca; *bios*: vida) [1] y son por consiguiente consideradas como materiales «biorreceptivos», es decir, sustratos con capacidad de alojar vida. La biorreceptividad de una roca dependerá de sus propiedades físicas y químicas, como ser su composición mineral, la estructura de sus poros, su permeabilidad y capacidad de retener agua [2], factores que influyen en que su colonización sea más o menos plausible [3]. Dado que la colonización tiene lugar solamente si existen las condiciones propicias para albergar la vida y permitir su desarrollo, condiciones ambientales como la disponibilidad de agua, temperatura, luz, pH, exposición al clima y disponibilidad de nutrientes son factores que también influyen [4]. No se consideran litobiontes a aquellos organismos que se encuentran de manera casual o transitoria en las rocas, ya que debe existir una relación ecológica entre los organismos y el sustrato [2].

Desde el descubrimiento de los organismos litobiontes en 1914 por el geobotánico alemán Ludwig Diels [5], se han realizado diferentes clasificaciones según las técnicas de estudio empleadas y las características consideradas. Se han tomado en cuenta como criterios la localización de los organismos en relación con el sustrato rocoso, la función que llevan a cabo en el sustrato rocoso, así como aspectos ecológicos. Varios artículos analizan este tema con el principal propósito de universalizar la terminología y facilitar el estudio de los microorganismos que habitan este sustrato y la comunicación de los resultados dentro de la comunidad científica [1, 5–11].

La clasificación de litobiontes actualmente más aceptada tiene en cuenta su localización en la roca. Se distinguen entonces tres categorías: epilotos, hipolitos y endolitos. Los epilotos (*epi*: sobre) se localizan en la superficie externa de las rocas, mientras que los hipolitos (*hypo*: debajo) se encuentran debajo de las rocas [1]. Este último término puede sin embargo resultar algo confuso debido a que algunos autores definen a los hipolitos como aquellos microorganismos que habitan la superficie inferior de las rocas en contacto con el suelo, mientras que otros los definen como aquellos microorganismos que viven debajo de las rocas, ya sea en su superficie o en el suelo que se encuentra debajo del sustrato rocoso y que está influenciado por éste [12]. Por último, los endolitos (*endo*: interior, interno) colonizan el interior de las rocas. Son denominados también endolitos los organismos que viven dentro de corales o exoesqueletos [13].

Dentro de la roca, se encuentran a su vez diferentes nichos factibles de ser colonizados. Los organismos endolíticos referidos como casmoendolíticos (*chasm*: hendidura) colonizan grietas y fisuras de las rocas, mientras que los criptoendolitos (*crypto*: escondido) colonizan poros y cavidades estructurales dentro de las rocas (el «tejido rocoso»), así como los espacios generados por los euendolitos. Los euendolitos (*eu*: bueno, verdadero) son organismos que penetran activamente el sustrato rocoso formando nuevos túneles y cavidades. Esta definición utiliza un criterio más funcional que relativo a la localización. Lo mismo ocurre al momento de definir a los autoendolitos. El término autoendolito (*auto*: uno mismo) es bastante reciente, y según Marlow [12] ciertamente representa «una categoría distintiva de vida alojada en la roca». El metabolismo de los autoendolitos tiene como consecuencia la formación de sustrato rocoso; esto puede ocurrir por productos metabólicos que precipitan como minerales (mecanismo directo) o que promueven y ensamblan la mineralización (mecanismos indirectos). Los autoendolitos permanecen como tales hasta que terminan siendo completamente sepultados como consecuencia de su propio metabolismo. Otro término no tan extendido es el de «hipoendolito» que fue definido por primera vez por Wierzbos *et al.* [4] y se refiere a los endolitos que colonizan los espacios porosos en la parte inferior de la roca que no está en contacto directo con el suelo.

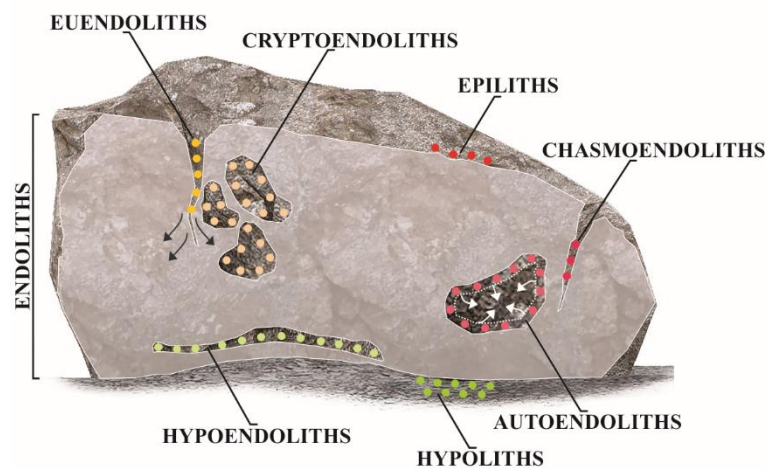


Figura 1. Representación esquemática de la clasificación de litobiontes. Los epiliths (puntos rojos) se localizan en la superficie superior de las rocas, mientras que los hipolitos (verde) se encuentran por debajo de las rocas. Los organismos que colonizan el interior de las rocas se denominan endolitos. Dentro de los endolitos se distinguen los criptoendolitos (naranja) que habitan los poros, los casmoendolitos (fucsia) que se encuentran en grietas o fisuras, y los hipoendolitos (verde claro) que se encuentran dentro de espacios porosos en la parte inferior de las rocas sin entrar en contacto con el suelo. Los autoendolitos (rosa) son endolitos con la capacidad de contribuir a la formación de roca a través de la deposición de minerales, mientras que los euendolitos (amarillo) son aquellos que penetran activamente el sustrato rocoso. Tomado de Amarelle *et al.* [56].

Las categorías descritas con anterioridad y resumidas en la **Figura 1** no son estrictas ni mutuamente excluyentes. Algunos organismos como los líquenes pueden ser parcialmente epilíticos y parcialmente endolíticos, otros pueden colonizar cavidades preexistentes como criptoendolitos o casmoendolitos,

y al mismo tiempo producir productos metabólicos que desgastan las rocas comportándose como los euendolitos [12].

Los sustratos líticos son ubicuos y constituyen una interfase entre la geología y la biología [14]. Como se mencionó anteriormente, los microorganismos son capaces de asociarse al sustrato rocoso y alterarlo, directa o indirectamente, a través de la deposición de compuestos que terminan constituyendo la matriz rocosa (como lo hacen los microorganismos autoendolitos), o mediante un desgaste biótico que deteriora la roca (*bioweathering*; biodeterioro). Los endolitos pueden producir sustancias poliméricas u otras biomoléculas extracelulares (enzimas, sideróforos, ácidos orgánicos, etc.) que alteran el sustrato rocoso, disolviéndolo o secuestrando compuestos que componen la roca [3, 15]. Interesantemente, los biofilms que forman los microorganismos endolíticos pueden perder o absorber agua, contrayéndose o hinchándose, respectivamente, teniendo como resultado fuerzas mecánicas que afectan la estructura de la roca [3]. Debido a que los ambientes endolíticos pueden estar aislados del exterior casi por completo, debe darse un eficiente ciclado de nutrientes dentro de la comunidad para que efectivamente pueda desarrollarse y prosperar la vida. Todas estas interacciones, a gran escala, influyen en el ciclado de los elementos, moldean la biósfera y el clima [14].

Dentro de una misma roca pueden coexistir microorganismos en diferentes estados fisiológicos [4]. Debido a que las condiciones ambientales pueden cambiar drásticamente a lo largo del tiempo, la vida y la muerte, la extinción y la fosilización de microorganismos constituyen fenómenos recurrentes [16], [17]. Asimismo, las alteraciones geomicrobiológicas brindan «firmas biológicas» que se mantienen en el registro biológico (fósiles) y nos pueden dar pistas acerca de la historia de la vida en la Tierra y de los límites de ésta [18]. En este sentido, desde hace ya varias décadas, los Valles Secos de McMurdo (Antártida) han sido considerados el análogo terrestre del ambiente marciano [19], y los estudios de microorganismos endolíticos se han usado como referencia para generar hipótesis acerca de la posibilidad de vida en otros lugares del sistema solar. Si las rocas proveen un microambiente propicio para el desarrollo de la vida bajo las condiciones más hostiles de la Tierra, sin que los organismos tengan que realmente adaptarse al ambiente exterior, es viable que las rocas sean un buen nicho para la búsqueda de evidencia de vida en otros planetas.

LITOBIONTES ANTÁRTICOS

Factores de estrés

El continente antártico es un ambiente especialmente extremo para la vida debido a la baja humedad y sequedad, bajas temperaturas y sus fluctuaciones, alta radiación UV, períodos extensos de oscuridad y fuertes vientos. Sin embargo, los microorganismos han desarrollado estrategias y adaptaciones específicas que les permiten sobrevivir en la Antártida y sobrellevar estas condiciones extremas [4].

Las rocas constituyen uno de los principales refugios para la vida en los ambientes más extremos e inhóspitos del planeta, como ser los desiertos cálidos y fríos de todas partes del mundo, donde no existen formas de vida visibles a simple vista [20]. El interior de las rocas provee de un microclima apropiado para el desarrollo de la vida en la medida que amortigua las severas condiciones externas. Sin embargo, deben darse ciertas condiciones que permitan la colonización y subsistencia de los microorganismos dentro de ellas.

La temperatura es un factor clave ya que puede interrumpir la actividad metabólica si es demasiado baja o incidir directamente en el estado líquido del agua. Algunas rocas son capaces de absorber el calor mejor que otras, amortiguando las fluctuaciones de temperatura. Cuando estas fluctuaciones se dan en el entorno de los 0 °C, ocurren múltiples eventos de congelamiento y descongelamiento que pueden afectar severamente a los microorganismos [21].

La insolación también afecta la temperatura de las rocas. Durante el invierno prácticamente no hay radiación solar incidente y las temperaturas son extremadamente bajas, mientras que, durante el verano, la temperatura del aire aumenta siendo aún más alta en la superficie de las rocas. En este sentido, se ha visto que existe una correlación entre la exposición de la superficie de la roca respecto a la dirección de los rayos del sol, la temperatura, y la colonización por los microorganismos [22].

La disponibilidad de luz es una condición importante para sostener la vida endolítica, ya que la disponibilidad de carbono en la comunidad está mediada principalmente por la actividad de microorganismos fotoautótrofos que actúan como productores primarios. Estos organismos utilizan la luz solar que penetra las rocas, existiendo un gradiente de luz que delimita la zona donde pueden establecerse y desarrollarse. La actividad fotosintética depende de la cantidad de radiación fotosintéticamente activa («*Photosynthetic Active Radiation*» o PAR, en inglés) la cual depende del color de la roca, de su mineralogía y de su estructura. Como consecuencia, las comunidades endolíticas se desarrollan preferentemente en aquellas rocas que son más claras y traslúcidas [22]. Sin embargo, demasiada radiación solar puede ser perjudicial [4].

El agua es otro factor vital para la supervivencia. Su disponibilidad depende de factores geográficos y topológicos. De acuerdo a su índice de aridez (*Aridity Index* o AI, en inglés), definido en base al balance hídrico (relación entre las precipitaciones medias anuales y el potencial de evapotranspiración medio anual), regiones de la Antártida como los Valles Secos de McMurdo se clasifican como desiertos hiper áridos ($AI < 0,05$), al igual que zonas del Desierto de Atacama (Chile) o del Desierto de Negev (Israel) [4]. Sin embargo, las condiciones de aridez de la Antártida marítima son menos extremas que en el resto del continente, debido a la mayor disponibilidad de agua en estado líquido. Cuando las temperaturas lo permiten, la nieve derretida es la principal fuente de agua líquida, por lo que la acumulación de nieve o hielo sobre las rocas favorece el desarrollo de organismos. La estructura de las rocas también es importante debido a que rocas más porosas retienen mejor el agua y actúan como reservorio de ésta [3]. En suma, el tamaño y la estructura de los poros influye sobre la humedad relativa del interior de las rocas, amortiguando las condiciones del exterior. No obstante, los organismos deben ser capaces de sobrellevar los sucesivos ciclos de desecación y rehidratación [14].

Los vientos tienen un efecto directo e indirecto, al mismo tiempo benéfico y perjudicial sobre las comunidades litobióticas. Por un lado, pueden transportar nieve que provee a las rocas de agua, así como arrastrar y depositar partículas entre las grietas de las rocas, protegiendo a los microorganismos endolíticos de las condiciones ambientales del exterior y favoreciendo el desarrollo de la vida en el interior [22]. La corteza generada por estos depósitos puede tornarse permeable al agua y a los gases, pero no a otros organismos del exterior. Esto tiene como consecuencia un microclima distinto y separado con limitada influencia de las condiciones externas [19]. Por otro lado, los vientos catabáticos («de bajada») secos, característicos de la Antártida, propician las condiciones desérticas ya que favorecen los flujos de calor. Además, los vientos fuertes pueden llevar a la evaporación de agua, lo que trae como consecuencia el depósito de alta concentración de sal sobre algunas rocas y constituye otro factor de estrés. De la misma forma, aerosoles de sal pueden ser transportados y depositados sobre las rocas, y esto, junto con la erosión por el viento, dificulta el establecimiento de organismos [23].

En regiones costeras las condiciones ambientales son más moderadas, sumándose a esto la presencia de animales (**Figura 2**). Los animales constituyen una fuente importante de nutrientes como fósforo y nitrógeno, mientras que el polvo transportado por los vientos puede ser también fuente de otros nutrientes. En la Antártida continental una alta disponibilidad de nutrientes puede no ser tan limitante para el crecimiento. Muchas rocas son ambientes oligotróficos habiéndose reportado incluso que algunas bacterias aisladas de rocas crecen mejor en medios de cultivo oligotróficos. Interesantemente,

en algunos casos se ha observado que el agregado de extracto de roca mejora su crecimiento, indicando que los compuestos allí presentes son importantes para su metabolismo [3, 24].



Figura 2. Rocas de la Antártida marítima. Las rocas de la Antártida marítima se encuentran visiblemente colonizadas por líquenes. Se observa también la presencia de animales. Tomado de Amarelle *et al.* [56].

Estrategias de supervivencia

Todos los factores mencionados anteriormente tienen impacto sobre la abundancia y la distribución de los organismos, así como en su tasa de crecimiento, moldeando la estructura de toda la comunidad. ¿Cómo resisten los microorganismos estas condiciones? La respuesta es que debe existir una combinación de adaptaciones fisiológicas en conjunto con las propiedades protectoras inherentes de las rocas para que la colonización y la supervivencia sea exitosa [25]. Desde el punto de vista funcional, para prosperar en ambientes fríos las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes requieren de enzimas activas a bajas temperaturas para su metabolismo y generación de energía en esas condiciones. Desde el punto de vista estructural, requieren mantener la integridad de la membrana celular, su fluidez y sus funciones a bajas temperaturas. Acortando el largo de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos que conforman los fosfolípidos de membrana, e introduciendo más ácidos grasos insaturados (dobles enlaces en *cis*) en éstos, se logra una menor interacción entre las cadenas, y una menor temperatura de fusión (y por tanto un aumento en la fluidez de la membrana), con respecto a la presencia de ácidos grasos saturados y/o de cadena más larga [26]. Por otro lado, las proteínas y en particular las enzimas, son capaces de compensar los efectos de la congelación mediante el uso de determinados aminoácidos que otorgan mayor flexibilidad en regiones claves de su estructura molecular, logrando así llevar a cabo las diversas funciones celulares a bajas temperaturas. Las adaptaciones funcionales están codificadas genéticamente y son resultado de la adaptación a largo

plazo, mientras que, las que son a nivel estructural involucran la regulación de vías de biosíntesis preexistentes [27]. Sin embargo, ninguna de estas adaptaciones básicas es suficiente, debido a que las temperaturas por debajo de los 0 °C inducen restricciones fisicoquímicas del medio. Las bajas temperaturas reducen el transporte e incrementan la viscosidad del agua y del citoplasma, dificultando en gran medida los procesos biológicos [25].

Los microorganismos litobióticos de ambientes fríos son entonces capaces de activar o desactivar su metabolismo rápidamente en respuesta a cambios repentinos en las condiciones ambientales. Pueden entrar en criptobiosis o inactividad en un estado equivalente a «liofilizado» (y sobrellevarlo sin sufrir daño), hasta que la temperatura se eleve lo suficiente, la nieve se derrita y la humedad aumente a niveles de hidratación suficientes para activar a los microorganismos [14, 22]. Como consecuencia, la actividad metabólica está limitada a esos cortos períodos donde existen las condiciones ambientales propicias. Lo mismo ocurre con la ventana de tiempo en la que puede llevarse a cabo la fotosíntesis, dependiente de la disponibilidad de luz solar según la época del año. A nivel general, cuando las condiciones en la superficie exterior son demasiado extremas, se tiende a la colonización endolítica o sublítica [19].

Para sobrellevar la desecación, los microorganismos Antárticos pueden valerse de la producción de biofilms y de la síntesis de osmolitos. La formación de biofilms y sustancias poliméricas extracelulares además de tener un rol importante en el mantenimiento de estructuras, en la adsorción de compuestos orgánicos e iones, y como barreras protectoras, también favorecen la retención de agua y reducen la difusión de vapor de agua al mismo tiempo [28]. Cabe destacar que la síntesis de otro tipo de moléculas que retienen agua (como la sacarosa y la trehalosa) es también frecuente en organismos cultivables provenientes de la Antártida [29].

Para protegerse de la radiación o de las bajas temperaturas, algunos microorganismos son capaces de sintetizar pigmentos que absorben la radiación solar de manera de incrementar la temperatura, a la vez que pueden actuar como fotoprotectores contra la radiación UV [29, 30, 31]. En concreto, se ha encontrado que el ambiente antártico posee un diverso grupo de bacterias resistentes a la radiación UV-C (la más perjudicial para la vida) y algunas de ellas con la capacidad de producir fotoliasas altamente activas, las cuales pueden revertir el daño en el ADN ocasionado por este tipo de radiación [34].

Composición de la microbiota

Resulta interesante cómo a pesar de las condiciones ambientales que limitan la supervivencia y el desarrollo de organismos en los ambientes extremos, los ecosistemas líticos pueden presentar una

alta diversidad de microorganismos. En las palabras de Wei [32], uno puede pensar en las comunidades líticas como «islas de productividad dentro del paisaje generalmente depauperado de los suelos desérticos».

Los primeros estudios sobre comunidades litobióticas Antárticas se realizaron, principalmente, mediante técnicas de microscopía [19, 21, 36] y aislamiento de microorganismos cultivables [24]. En estos trabajos se determinó la prevaencia de líquenes, y cianobacterias de los géneros *Gloecapsa*, *Chroococcidiopsis* y *Plectonema*. Con el devenir y el desarrollo de los métodos de biología molecular, basados en el análisis de ácidos nucleicos, para el estudio de las comunidades bacterianas, la diversidad identificada en estos nichos creció de manera significativa. Una característica a destacar es la baja abundancia de archaeas en estos ambientes, la cual se ha observado consistentemente independientemente del método utilizado para su estudio [35–37].

La composición de la microbiota litobiótica varía de acuerdo a su localización en la roca; esto se ha demostrado tanto por observación directa como a través de microscopía y análisis moleculares [38], [39]. Los musgos, líquenes y cianobacterias suelen encontrarse como colonizadores epilíticos, siendo los líquenes altamente frecuentes en las rocas de la Antártida marítima [21, 25, 42]. En cuanto a las comunidades hipolíticas, Cowan *et al.* [41] las diferencian entre aquellas dominadas por Cyanobacteria (Tipo I), las dominadas por hongos (Tipo II) y las dominadas por musgos (Tipo III). Diversos estudios realizados en los Valles Secos de McMurdo concuerdan en que Cyanobacteria es el filo hipolítico más abundante (seguido por Acidobacteria y Actinobacteria), y su abundancia sugiere que este grupo es el principal productor primario en este ecosistema [35, 44]. Por el contrario, las comunidades hipolíticas de los Tipos II y III, están dominadas por el grupo de las Alphaproteobacterias [38]. Un aspecto interesante es que a pesar del contacto estrecho que existe entre las comunidades hipolíticas y las comunidades del suelo, varios estudios han encontrado diferencias significativas en la composición de ambas comunidades [25, 35, 38, 45]. Esto sugiere que la roca es un nicho con propiedades específicas y que no todos los microorganismos que están en contacto estrecho con este sustrato son capaces de colonizarlo. La colonización endolítica de rocas del tipo cuarzo puede visualizarse a simple vista como bandas de colores paralelas a la superficie de la roca, como consecuencia de la presencia de microorganismos fotosintéticos y hongos (**Figura 3**) [19, 25]. Análisis de metagenomas criptoendolíticos de muestras del Supergrupo Areniscas Beacon, Valle University (Valles Secos), revelaron que alrededor de la mitad de la comunidad estaba compuesta por Eucariotas (filos Ascomycota, Basidiomycota, Chlorophyta y Streptophyta). En cuanto a la diversidad bacteriana, Actinobacteria resultó ser el filo dominante, aunque también se encontraron representantes de Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes [36]. En este caso, Cyanobacteria se vio muy poco

representado, siendo *Trebouxia* (alga asociada a líquenes) el predominante entre los fotoautótrofos de este tipo de comunidades, algo que ya había sido reportado por de la Torre *et al.* [44]. Adicionalmente, el análisis de otros dos metagenomas endolíticos provenientes de areniscas del Valle Victoria, mostraron como filo dominante a *Actinobacteria* [43], lo que concuerda con estudios previos de Goordial *et al.* [36].

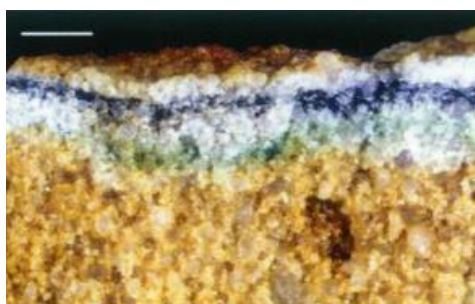


Figura 3. Colonización endolítica de rocas de tipo cuarzo. Franjas de colores paralelas a la superficie dan cuenta de la presencia de distintos microorganismos endolíticos. Extraído de Friedmann (1982). [19]

LITOBIONTES Y METABOLISMO DE METALES

Los ambientes polares, como el Ártico y la Antártida, son sitios de ocurrencia natural de altas concentraciones de metales pesados, principalmente como resultado de la meteorización o desgaste (*weathering*) biogeoquímico de minerales que contienen metales [45, 46]. En particular, las comunidades litobióticas, en su estrecho vínculo con las rocas, son capaces tanto de degradar o disolver el sustrato rocoso (*bioweathering*), como de favorecer la formación de minerales (autoendolitos). Estas alteraciones se traducen en cambios en la especiación, movilidad y toxicidad de los metales que se encuentran en la roca teniendo como consecuencia a gran escala una contribución a los ciclos biogeoquímicos de los elementos [47].

Para sobrevivir y perdurar, los organismos que habitan estos ambientes han tenido que desarrollar mecanismos de tolerancia a los metales allí presentes. Esto ha sido evidenciado en el trabajo de Chan *et al.*, donde tras analizar el potencial metabólico de una comunidad endolítica antártica mediante una aproximación metagenómica funcional, encontraron un importante número de genes implicados en la tolerancia/resistencia a metales [42]. Por otra parte, Romaniuk *et al.*, aislaron más de 200 cepas de bacterias cultivables de distintos puntos de la Isla Rey Jorge con fenotipos de resistencia a varios metales pesados. A partir de los aislamientos amplificaron genes previamente reportados como responsables de algunos de esos mecanismos de tolerancia [48].

No todos los metales tienen la misma importancia para los seres vivos, ya que cada elemento tiene sus propias características fisicoquímicas y son estas las que definen las posibles interacciones, y por tanto su rol biológico. De acuerdo con su función biológica, su potencial toxicidad y su concentración en las células vivas, se pueden distinguir cuatro categorías: (i) metales que se encuentran en altas concentraciones (mM) intracelulares y que son imprescindibles para la supervivencia por estar involucrados en el metabolismo celular básico (Na, Mg, K y Ca); (ii) metales de transición presentes en concentraciones menores (μM) en las células pero también involucrados en procesos celulares esenciales (Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn); (iii) los metales tóxicos con pocas funciones biológicas conocidas, como el V y el Mo; y (iv) resto de los metales, sin función biológica conocida y altamente tóxicos para las células, por lo que deben ser eliminados dado que su presencia puede ser letal incluso a concentraciones extremadamente bajas [49].

Mantener una homeostasis de metales adecuada es crucial para los microorganismos ya que estos pueden afectar su crecimiento, actividad y supervivencia, especialmente para los organismos unicelulares por encontrarse en contacto directo con el medio. Muchas enzimas requieren de metales como cofactores y la falta de estos elementos puede afectar significativamente el metabolismo celular. Sin embargo, el ingreso y acumulación de concentraciones elevadas de metales, incluso de aquellos esenciales (del primer y segundo grupo), puede causar toxicidad por interacciones inespecíficas y afectar la viabilidad celular. Por esta razón, diversos sistemas están involucrados en sensor, controlar y mantener las concentraciones intracelulares de metales, restringiendo el ingreso, regulando el transporte hacia y desde la célula, o detoxificando desde el interior celular [47, 50], como se resume en la **Figura 4**. En particular, existen tres principales tipos de mecanismos para la detoxificación de metales: (i) el eflujo de iones tóxicos, (ii) la transformación enzimática de metales, y (iii) la incorporación de metales en complejos por parte de proteínas de unión a metales [48]. Los sistemas de transporte de eflujo constituyen el grupo más extenso de mecanismos de tolerancia a metales y se caracterizan por realizar un transporte activo de los metales desde el citoplasma hacia el exterior celular. Las proteínas involucradas principalmente suelen ser proteínas de la superfamilia RND (*Resistance-nodulation-cell division*), de la familia CDF (*cation diffusion facilitators*) y ATPasas tipo P [51]. Los mecanismos de secuestro o complejación de metales se dan a través de proteínas de unión a metales (metalotioneínas), las cuales se caracterizan por tener un bajo peso molecular y ser ricas en cisteína [52]. Por último, las transformaciones enzimáticas de los metales incluyen la detoxificación a formas menos tóxicas (incluso volátiles), a través de reacciones de oxidación, reducción o metilación [47].

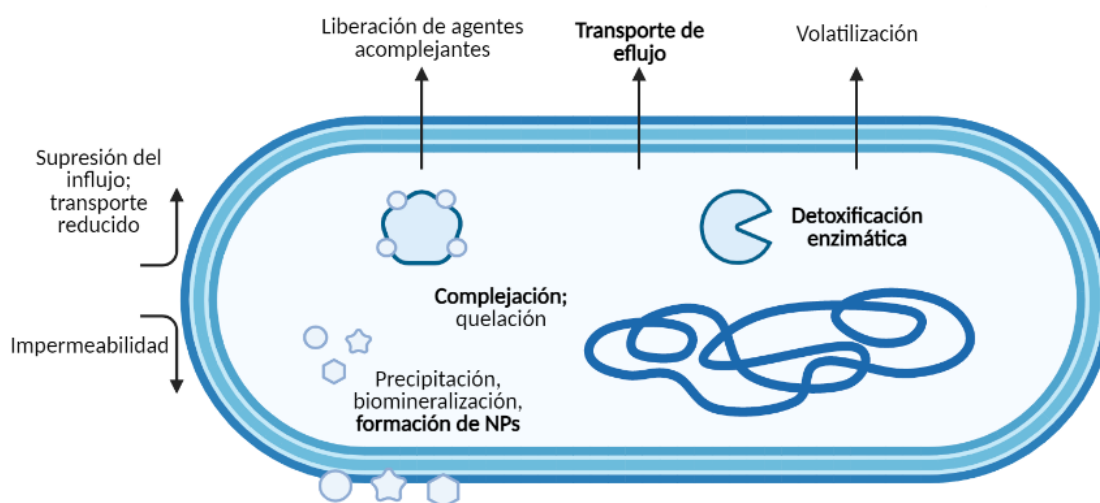


Figura 4. Mecanismos involucrados en la tolerancia a metales.

La biotransformación de los metales pesados en nanopartículas (NPs; partículas con dimensiones menores a 100 nm) ha sido sugerida como uno de los mecanismos llevados a cabo por los microorganismos para lidiar con estos [53]. Tanto los que se encuentran en el medio intracelular como los atrapados en la superficie celular pueden ser transformados en nanopartículas mediante acción enzimática, por lo general a través de reductasas y la unión de péptidos estabilizantes que contienen aminoácidos como cisteína, metionina, arginina y lisina [52, 54]. No obstante, los mecanismos biosintéticos aún no han sido del todo dilucidados. Como consecuencia de su tamaño nanométrico, las nanopartículas poseen propiedades diferentes a los mismos materiales en escala micrométrica, ya que a esta escala las propiedades de los átomos y sus ensamblajes están dominadas por efectos cuánticos. Las nanopartículas no sólo tienen mayor área superficial, lo que las hace buenas catalizadoras y adsorbentes, sino que también cambian las propiedades eléctricas de los materiales, en relación a su contraparte de mayor tamaño [47]. Estas características hacen de las nanopartículas un material interesante para el desarrollo de productos tecnológicos novedosos en áreas como la optoelectrónica, la biomedicina, biosensores, energía, entre otras [55-58].

Hipótesis

Las rocas de la Antártida marítima albergan una comunidad bacteriana diversa con capacidad de participar en los ciclos biogeoquímicos de metales.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de las comunidades bacterianas litobióticas de ambientes fríos, en particular su diversidad y metabolismo de metales, utilizando estrategias complementarias que involucren aproximaciones de microbiología clásica en bacterias cultivables, así como aproximaciones metagenómicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar una colección de bacterias litobióticas antárticas, identificarlas a nivel de género y evaluar su tolerancia a diferentes metales.
2. Evaluar el potencial de la colección de producir nanopartículas metálicas y su posible aplicación biotecnológica.
3. Conocer la diversidad de bacterias presentes en la comunidad litobiótica y los genes relacionados a la tolerancia a metales que estos organismos poseen.

Capítulo I: Aislamiento, identificación y caracterización de las bacterias cultivables

INTRODUCCIÓN

El continente Antártico ha sido clasificado en tres principales grandes regiones de acuerdo a características climáticas y bióticas. Estas son la sub-antártica, la Antártida marítima (la cual incluye a las Islas Shetland del Sur, entre otras islas, y parte de la Península Antártica occidental hasta el paralelo 72 S) y la Antártida continental (que incluye a la parte oriental de la Península Antártica al sur del paralelo 63 y al resto del continente) [55]. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios de litobiontes antárticos fueron realizados a partir de rocas colectadas en la Antártida continental, en particular, de las provenientes del Desierto de Ross [38], [56]. Esta zona comprende un área de aproximadamente 4800 km² (la mayor área de suelo descubierto de hielo de la Antártida) y es también conocida como los «Valles Secos» o «Valles Secos de McMurdo», en referencia a la gran cantidad de valles que se encuentran entre las Montañas Transantárticas [56]. Sus suelos se caracterizan por presentar superficies poligonales que contienen permafrost y rocas del tipo arenisca, granito y cuarzo [35]. Otras regiones de la Antártida continental donde se investigaron organismos litobióticos incluyen las colinas Vestfold, las montañas Sør Rondane y la Isla Alexander. En estos sitios se estudiaron litobiontes provenientes de los mismos tipos de roca ya mencionados, así como de cortezas de yeso [56]. Por su parte, los reportes de litobiontes de la Antártida marítima son escasos, quizás por no despertar tanto interés como aquellos de regiones más extremas. Se destaca un trabajo de Ascaso *et al.* de 1990 focalizado en el estudio de líquenes provenientes de andesitas volcánicas de la Isla Rey Jorge [57].

El principal objetivo planteado en este trabajo de Maestría fue contribuir al conocimiento de las comunidades bacterianas litobióticas de ambientes fríos. Dada la posición privilegiada de Uruguay en el continente Antártico, el trabajo se centró en rocas colectadas en la Península Fildes de la Isla Rey Jorge, en sitios cercanos a la base uruguaya. En este capítulo, se propuso abordar este objetivo mediante una estrategia de microbiología clásica. Se realizó el aislamiento de cepas bacterianas litobióticas, su identificación a nivel de género y la caracterización de algunos aspectos fisiológicos de interés. En particular, se propuso la evaluación de su capacidad de tolerar metales, para así obtener una visión más profunda de su vínculo con los elementos que componen el sustrato rocoso donde habitan. La colección de bacterias cultivables generada supone a futuro un interesante insumo de diversidad genética y funcional para el estudio de su ubicación taxonómica y evolutiva, de diversos aspectos fisiológicos, así como su potencial aplicación biotecnológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo y caracterización de las rocas

Dos muestras de rocas (V6 y V7) fueron colectadas en mayo de 2014 en las cercanías del Glaciar Collins, en la Península Fildes de la Isla Rey Jorge, la mayor en superficie del archipiélago de las Islas Shetland del Sur ($62^{\circ}10'53.5''\text{S}$ $58^{\circ}54'31.9''\text{W}$ y $62^{\circ}10'52.2''\text{S}$ $58^{\circ}54'34.0''\text{W}$, respectivamente) (**Figura 5**). Las muestras fueron colectadas asépticamente, transportadas a la Base Científica Antártica Artigas en bolsas de plástico estériles, y mantenidas a 4°C hasta su procesamiento. Los análisis cuantitativos de la composición química de las rocas se realizaron mediante Espectroscopía de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) por la compañía Bureau Veritas (Canadá).

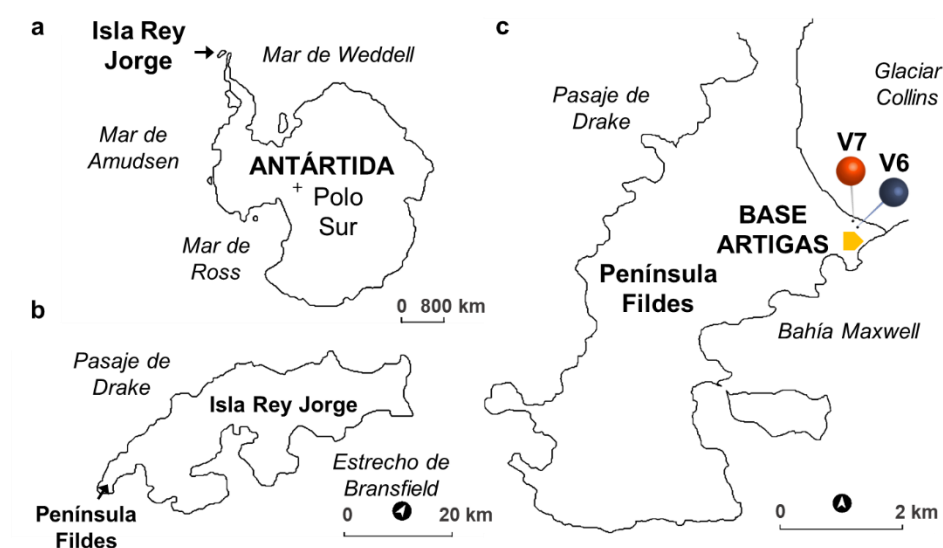


Figura 5. Sitios de muestreo. Mapas de la Antártida (a), Isla Rey Jorge (b) y Península Fildes, con sus respectivas escalas. Los sitios de muestreo para las rocas V6 y V7 se destacan con pines azul y rojo, respectivamente. En amarillo, la ubicación de la Base Científica Antártica Artigas (BCAA).

Procesamiento de las muestras, aislamiento de bacterias y generación de la colección

Aproximadamente 50 g de cada muestra de roca fueron desinfectados por inmersión en etanol (EtOH) 70% (v/v) durante 1 minuto, y luego se realizaron dos lavados con agua destilada estéril (H_2O d.e.). Las rocas desinfectadas en su superficie fueron maceradas con un mortero de cerámica estéril. El pulverizado de roca resultante se resuspendió en 15 mL de H_2O d.e.

Cien microlitros de las suspensiones obtenidas fueron sembrados en placas con medio R2A sólido (Difco) y en medio R2A suplementado con AgNO_3 50 μM , CdCl_2 100 μM , CoCl_2 500 μM , CuSO_4 500 μM , MnCl_2 1mM, NiCl_2 500 μM o ZnCl_2 500 μM . Se agregó cicloheximida 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a todos los medios, de manera de prevenir el crecimiento fúngico. Una vez inoculados los medios, las placas se incubaron a

4 °C durante 30 días para permitir el desarrollo de colonias. Para generar la colección de bacterias cultivables provenientes de ambas muestras de roca, se seleccionaron las colonias que presentaban fenotipos distintos (color, forma, tamaño, entre otros), las cuales fueron re-aisladas en medio R2A. Los aislamientos seleccionados se crecieron en medio R2A líquido (**Tabla suplementaria 1, Anexo**) a 4 °C y se almacenaron en glicerol 25% (v/v) a -80 °C.

Los aislamientos recuperados de cultivos frescos y puros, se ordenaron en R2A sólido según un patrón de 48 cepas por placa de Petri, de manera de construir un molde que permitiese trabajar posteriormente con un *replica plater*.

Identificación de los aislamientos de la colección

Para la identificación de los aislamientos a nivel de género, se amplificó el gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S casi completo, utilizando los *primers* universales Eub27F y Eub1492R [58]. A partir de colonias aisladas de cultivos puros, se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de colonia. Para ello, se picaron colonias con palillos estériles y se depositaron las células en tubos de PCR conteniendo la mezcla de reacción sin la Taq polimerasa (para evitar su inactivación en el paso de lisis). Para disponibilizar el ADN genómico se realizó la lisis térmica de las células mediante incubación a 95 °C, durante 20 minutos. El lisado es utilizado como molde en la reacción de PCR sin la necesidad de pasos posteriores de purificación. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento con un palillo estéril. La mezcla de reacción y el programa de PCR utilizado se detallan en el **Anexo (Tabla suplementaria 2, Tabla suplementaria 3 y Tabla suplementaria 4)**.

Para comprobar la presencia de amplicones del tamaño esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) en *buffer* TAE 1X (**Tabla suplementaria 5, Anexo**). Para la visualización de los fragmentos de ADN se utilizó el agente intercalante SYBR® Safe (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante, y la posterior exposición del gel a luz ultravioleta. El marcador de peso molecular empleado como referencia fue el GeneRuler® 1kb (ThermoScientific).

Los amplicones fueron purificados y posteriormente secuenciados mediante tecnología Sanger por el servicio MacroGen (Corea del Sur) con los mismos *primers* ya mencionados. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y depuradas mediante la utilización del software DNABaser, de manera de eliminar regiones terminales ambiguas y de seleccionar los fragmentos con mejor calidad para los análisis posteriores. Las identidades de las secuencias nucleotídicas y las cepas tipo más cercanas fueron determinadas utilizando el servidor online EZBioCloud [59], filtrando por «nombres validados». Las cepas «genéricas» más cercanas se obtuvieron a través de la búsqueda en la base de datos no redundante de secuencias nucleotídicas del NCBI y mediante el algoritmo BLAST. Las secuencias

nucleotídicas de los aislamientos de la colección fueron incorporados a la base de datos GenBank del NCBI bajo los números de acceso indicados en la **Tabla 2**.

Ensayos de tolerancia a metales

La tolerancia o susceptibilidad de los aislamientos a metales fue evaluada como crecimiento o ausencia de crecimiento bacteriano, respectivamente, en medio R2A sólido suplementado con diferentes metales. Las soluciones de metales filtradas se adicionaron al medio en las siguientes concentraciones: AgNO₃ 100μM, CdCl₂ 100μM, CoCl₂ 1mM, CuSO₄ 1mM, MnCl₂ 5mM, NiCl₂ 1mM o ZnSO₄ 1mM. Las cepas se crecieron en medio R2A líquido a 4 °C hasta fase exponencial media (DO_{620nm} de 0,8-1) y se plaquearon gotas de 5 μL de cultivo bacteriano en todos los medios a ensayar. Los experimentos se realizaron por triplicado y se incluyó como control de crecimiento el medio R2A sólido sin agregado de metales. Las placas se incubaron a 4 °C, y a los 25 días se evaluó el crecimiento bacteriano.

RESULTADOS

Características de las rocas

Para poder establecer si existe alguna correlación entre la tolerancia a metales de las comunidades litobióticas y el sustrato que habitan, es imprescindible conocer la composición química de las rocas. Tras el análisis geoquímico y el estudio de los elementos mayores a través de un diagrama de clasificación TAS (*Total Alkali Silica*, Sílice vs. Álcalis Totales)[60], Vivanco *et al.* [61] determinaron que la muestra V6 se trataba de una dacita, mientras que la muestra V7 fue identificada como un basalto traqui-andesítico (**Figura 6**), siendo ambas rocas de origen volcánico.

El análisis de los elementos mayores y menores se detalla en el **Anexo (Tabla suplementaria 7 y Tabla suplementaria 8)**. En la **Tabla 1** se muestra la composición de cada roca en relación a los metales que fueron evaluados en la colección de bacterias cultivables. La muestra V7 contuvo significativamente más As, Co, Cs, Cu, Mn, Ni, Pb y Sr que la muestra V6.

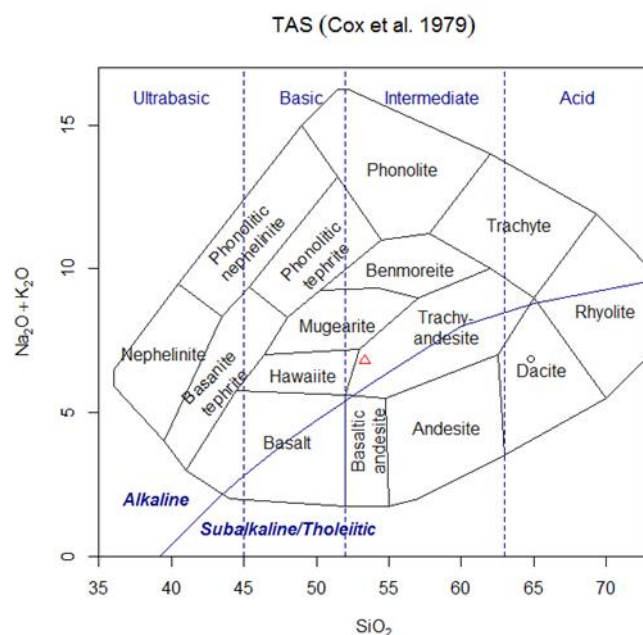


Figura 6. Diagrama TAS para la clasificación de rocas ígneas. Círculo negro: V6; triángulo rojo: V7.

Análisis de bacterias litobióticas cultivables

Tras 30 días de incubación a 4 °C en medio R2A, se obtuvo un promedio de 10^4 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de roca para cada muestra. Cuando las placas con R2A fueron suplementadas con sales metálicas, el número de aislamientos que se recuperaron fue menor, ya que en estas condiciones sólo crecieron los aislamientos capaces de tolerar los metales agregados (**Tabla 1**). El porcentaje de aislamientos que creció en presencia de un metal en particular en relación a los aislamientos crecidos en medio R2A sin metal, difirió entre metales y entre muestras.

En comparación con los aislamientos obtenidos sin agregado de metal, en presencia de MnCl_2 1mM o de CuSO_4 500 μM , se obtuvo un 99,9% menos aislamientos en la roca V6, mientras que en V7 solamente se obtuvo una disminución de 10%. En presencia de CoCl_2 500 μM se obtuvo un 95% menos de aislamientos para V6 y un 80% menos para V7, y en presencia de NiCl_2 500 μM , un 90% menos en V6 y 50% menos en V7. En medio conteniendo ZnCl_2 500mM, en ambas muestras se obtuvo un 10% menos de aislamientos, mientras que en presencia de AgNO_3 50 μM se obtuvo un 90% menos a partir de la roca V7 y ningún aislamiento a partir de V6.

En la muestra V7, que en general resultó contener mayores concentraciones de metales, la proporción de bacterias cultivables capaces de crecer en presencia de metales fue mayor que en la muestra V6.

Particularmente, se obtuvo una mayor cantidad de aislamientos en medio con CoCl_2 y con NiCl_2 que en la muestra V6 en estas condiciones, lo que coincide con una mayor abundancia de estos metales en la roca V7 (**Tabla 1**).

Cabe destacar que en ambas muestras se encontró un alto número de colonias pigmentadas, en tonos desde el amarillo al naranja, y del rojo al rosa. La pigmentación de las colonias no presentó una correlación con la presencia de sales metálicas en el medio. Este rasgo fenotípico, así como otras características morfológicas de las colonias (forma, elevación, márgenes, tamaño, brillo, etc.) fueron tomadas en cuenta para la selección de aislamientos distintos para la generación de la colección de bacterias litobióticas cultivables.

Tabla 1. Correlación entre la composición de metales de las rocas y el porcentaje de aislamientos obtenidos en presencia de metales.

Metal ^a	V6		V7	
	% aislamientos ^b	composición [ppm] ^c	% aislamientos ^b	composición [ppm] ^c
Co	5	8,8	20	23,1
Cu	0,1	30,3	90	38,4
Mn	0,1	0,13 ^d	90	0,15 ^d
Ni	10	2,8	50	20,3
Zn	10	64	10	50
Ag	0	<0,1	10	<0,1

^a Sales de metales y concentraciones empleadas para el aislamiento de bacterias: CoCl_2 500 μM ; CuSO_4 500 μM ; MnCl_2 1mM; NiCl_2 500 μM ; ZnCl_2 500 μM ; AgNO_3 50 μM .

^b Porcentaje de aislamientos crecidos en presencia de metal en relación a los aislamientos crecidos en R2A

^c Concentración del metal en la roca, en partes por millón.

^d Concentración del metal en la roca, en partes por millón en porcentaje masa-masa (%m/m)

Tabla 2. Asignación taxonómica de los aislamientos.

Muestra	Cepa	NCBI Accession number	Filo	Género	Cepa tipo más cercana EZBioCloud (NCBI Accession number)	% Identidad
V6	UYEF1	KU060846	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i> DSM 20136(T) (X80741)	98,86
V6	UYEF2	KU060847	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> GP3(T) (AJ810896)	96,62
V6	UYEF3	KU060848	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i> ALL(T) (AF235091)	98,77
V6	UYEF4	KU060849	Actinobacteria	<i>Marisediminicola</i>	<i>Marisediminicola antarctica</i> ZS314(T) (GQ496083)	99,86
V6	UYEF5	KU060850	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus endophyticus</i> YIM 56238(T) (EU005372)	95,90
V6	UYEF6	KU060851	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> GP3(T) (AJ810896)	97,34
V6	UYEF7	KU060852	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> 4J27(T) (CAQI01000001)	96,36
V6	UYEF8	KU060853	Gammaproteobacteria	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea brenneri</i> LMG 5343(T) (MIEI01000169)	99,43
V6	UYEF9	KU060854	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> 4J27(T) (CAQI01000001)	99,55
V6	UYEF10	KU060855	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i> ALL(T) (AF235091)	98,93
V6	UYEF11	KU060856	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> GP3(T) (AJ810896)	95,85
V6	UYEF12	KU060857	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665(T) (CP001628)	99,50
V6	UYEF13	KU060858	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i> ALL(T) (AF235091)	99,00
V6	UYEF14	KU060859	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter scleromae</i> YH- 2001(T) (AF330692)	99,54
V6	UYEF15	KU060860	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC 17751(T) (EU103629)	96,67
V6	UYEF16	KU060861	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas monteilii</i> NBRC 103158(T) (BBIS01000088);	99,57

V6	UYEF17	KU060862	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas monteilii</i> NBRC 103158(T) (BBIS01000088);	99,64
V6	UYEF18	KU060863	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> 4J27(T) (CAQI01000001)	99,54
V6	UYEF19	KU060864	Actinobacteria	<i>Nakamurella</i>	<i>Nakamurella panacisegetis</i> DSM 26919(T) (LT629710)	96,86
V6	UYEF20	KU060865	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter bambusae</i> GM18(T) (KF150696)	96,68
V6	UYEF21	KU060866	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter scleromae</i> YH-2001(T) (AF330692)	96,46
V6	UYEF22	KU060867	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Mucilaginibacter fluminis</i> TTM-2(T) (HG942367)	98,35
V6	UYEF23	KU060868	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas glacialis</i> C16y(T) (GQ253122)	99,74
V6	UYEF24	KU060869	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	<i>Deinococcus claudionis</i> PO-04-19-125(T) (EF635406)	98,19
V6	UYEF25	KU060870	Gammaproteobacteria	<i>Phytobacter</i>	<i>Phytobacter diazotrophicus</i> LS 8(T) (DQ821583)	99,07
V6	UYEF27	KU060871	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas qilianensis</i> X1(T) (KT000387)	98,29
V6	UYEF29	KU060872	Alphaproteobacteria	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i> NBRC 12165(T) (BCWM01000033);	99,70
V6	UYEF30	KU060873	Alphaproteobacteria	<i>Polymorphobacter</i>	<i>Polymorphobacter fuscus</i> D40P(T) (KF737330)	94,82*
V6	UYEF31	KU060874	Actinobacteria	<i>Kitasatospora</i>	<i>Kitasatospora nipponensis</i> HKI 0315(T) (AY442263)	94,00*
V6	UYEF32	KU060875	Gammaproteobacteria	<i>Phytobacter</i>	<i>Phytobacter diazotrophicus</i> LS 8(T) (DQ821583)	99,08
V6	UYEF33	KU060876	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> NBRC 103083(T) (BCXH01000047)	99,28
V6	UYEF35	KU060877	Bacteroidetes	<i>Spirosoma</i>	<i>Spirosoma spitsbergense</i> DSM 19989(T) (ARFD01000223)	93,14*
V6	UYEF36	KU060878	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> 4J27(T) (CAQI01000001)	99,29
V6	UYEF37	KU060879	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas paeninsulae</i> YZ-8(T) (CP032828)	92,11*

V6	UYP1	KU060818	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	<i>Pedobacter cryoconitis</i> A37(T) (AJ438170)	99,71
V6	UYP2	KU060819	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter citreus</i> DSM 20133(T) (X80737)	99,21
V6	UYP3	KU060820	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter citreus</i> DSM 20133(T) (X80737)	99,23
V6	UYP4	KU060821	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter agilis</i> DSM 20550(T) (X80748)	99,49
V6	UYP5	KU060822	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> NBRC 103083(T) (BCXH01000047)	98,71
V6	UYP6	KU060823	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter citreus</i> DSM 20133(T) (X80737)	99,27
V6	UYP7	KU060824	Bacteroidetes	<i>Kaistella</i>	<i>Kaistella jeonii</i> DSM 17048(T) (JSYL01000002)	97,60
V6	UYP8	KU060825	Bacteroidetes	<i>Kaistella</i>	<i>Kaistella jeonii</i> DSM 17048(T) (JSYL01000002)	97,83
V6	UYP9	KU060826	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> NBRC 103083(T) (BCXH01000047)	98,91
V6	UYP10	KU060827	Actinobacteria	<i>Agrococcus</i>	<i>Agrococcus jenensis</i> DSM 9580(T) (X92492)	99,71
V6	UYP11	KU060828	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i>	<i>Massilia arenae</i> GEM5(T) (KT369857)	98,44
V6	UYP12	KU060829	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter citreus</i> DSM 20133(T) (X80737)	99,35
V6	UYP13	KU060830	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> 4J27(T) (CAQI01000001)	98,63
V6	UYP14	KU060831	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> NBRC 103083(T) (BCXH01000047)	99,18
V6	UYP15	KU060832	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter citreus</i> DSM 20133(T) (X80737)	99,11
V6	UYP16	KU060833	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter citreus</i> DSM 20133(T) (X80737)	99,41
V6	UYP18	KU060834	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus niacini</i> IFO 15566(T) (AB021194)	98,87
V6	UYP20	KU060835	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> 4J27(T) (CAQI01000001)	98,82

V6	Mn621	MN865726	Actinobacteria	<i>Glaciihabitans</i>	<i>Glaciihabitans tibetensis</i> MP203(T) (KC256953)	97,61
V7	Ag731	MN865703	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	<i>Hymenobacter glacialis</i> CCM 8648(T) (KX611466)	97,23
V7	Ag732	MN865704	Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i>	<i>Cryobacterium psychrotolerans</i> 0549(T) (DQ515963)	98,91
V7	Ag733	MN865705	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas alpina</i> S8-3(T) (GQ161989)	99,62
V7	Co721	MN865706	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> DSM 20119(T) (X83408)	98,92
V7	Co722	MN865707	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	<i>Hymenobacter antarcticus</i> VUG-A42aa(T) (EU155012)	97,11
V7	Co724	MN865708	Actinobacteria	<i>Mycolicibacterium</i>	<i>Mycolicibacterium hodleri</i> DSM 44183(T) (X93184)	98,24
V7	Co726	MN865709	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas pruni</i> NBRC 15498(T) (BCYZ01000050)	97,49
V7	Co731	MN865710	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	<i>Hymenobacter glaciei</i> VUG-A130(T) (GQ454806)	97,27
V7	Co732	MN865711	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> 4J27(T) (CAQI01000001)	98,98
V7	Cu711	MN865714	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Mucilaginibacter panaciglaebae</i> BXN5-31(T) (EU423302)	97,53
V7	Cu712	MN865715	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i> ALL(T) (AF235091)	98,62
V7	Cu716	MN865716	Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i>	<i>Cryobacterium psychrotolerans</i> 0549(T) (DQ515963)	98,99
V7	Cu721	MN865717	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> DSM 20119(T) (X83408)	98,99
V7	Cu722	MN865718	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Mucilaginibacter rigui</i> WPCB133(T) (EU747841)	98,34
V7	Cu723	MN865719	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> DSM 20119(T) (X83408)	98,99
V7	Cu731	MN865720	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Mucilaginibacter phyllosphaerae</i> PP-F2F-G21(T) (KU878873)	97,78
V7	Mn731	MN865727	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas alpina</i> S8-3(T) (GQ161989)	99,34

V7	Ni721	MN865728	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> 4J27(T) (CAQI01000001)	98,48
V7	Ni722	MN865729	Actinobacteria	<i>Parafrigoribacterium</i>	<i>Parafrigoribacterium mesophilum</i> MSL-08(T) (EF466126)	97,48
V7	Ni723	MN865730	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> DSM 20119(T) (X83408)	98,26
V7	Ni724	MN865731	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Mucilaginibacter rigui</i> WPCB133(T) (EU747841)	98,40
V7	Ni731	MN865732	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> DSM 20119(T) (X83408)	98,20
V7	Zn731	MN865733	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	<i>Devosia limi</i> DSM 17137(T) (LAJF01000157)	98,22
V7	Zn732	MN865734	Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i>	<i>Cryobacterium psychrotolerans</i> 0549(T) (DQ515963)	98,85
V7	UYP22	KU060836	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	<i>Hymenobacter metallilatus</i> 9PBR-2(T) (MH229471)	97,90
V7	UYP23	KU060837	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas glacialis</i> C16y(T) (GQ253122)	99,41
V7	UYP24	KU060838	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	<i>Pedobacter panaciterrae</i> Gsoil 042(T) (AB245368)	96,46
V7	UYP25	KU060839	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Mucilaginibacter rigui</i> WPCB133(T) (EU747841)	98,35
V7	UYP26	KU060840	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Mucilaginibacter fluminis</i> TTM-2(T) (HG942367)	98,94
V7	UYP27	KU060841	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Mucilaginibacter rigui</i> WPCB133(T) (EU747841)	98,35
V7	UYP34	KU060845	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i>	<i>Massilia arenae</i> GEM5(T) (KT369857)	98,65

Nota: Los porcentajes en rojo y con asterisco corresponden a valores por debajo del valor de porcentaje de identidad corte considerado para pertenecer a un determinado género (94,8%). Los porcentajes en rojo, sin asterisco, corresponden a aquellos porcentajes de identidad por encima del valor de corte para un determinado género, pero por debajo del valor de corte para una determinada especie (98,7%), de acuerdo a Rosselló-Móra & Amann [62].

Tabla 3. Cepas más cercanas a los aislamientos de la colección.

Cepa de la colección de litobiontes	Pariente más cercano (NCBI Accession number)	% Identidad	Tipo de muestra	Referencia
UYEF1	<i>Arthrobacter</i> sp. strain BIS1066 (MN810167)	99,93	Suelo antártico	n/p
UYEF2	<i>Arthrobacter</i> sp. strain F3-1 (KY476584)	96,98	Suelo antártico	n/p
UYEF3	<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i> strain A-90 (MF467828)	99,71	Suelo antártico	n/p
UYEF4	<i>Marisediminicola</i> sp. TMT3-48 (JX949952)	99,93	Glaciar (China)	n/p
UYEF5	<i>Micrococcus</i> sp. strain 70027 (MF045106)	97,91	Sedimento oceánico (China)	n/p
UYEF6	<i>Arthrobacter</i> sp. strain BIS1066 (MN810167)	97,78	Suelo antártico	n/p
UYEF7	<i>Arthrobacter scleromae</i> strain T-50 (HQ202866)	97,05	Suelo de montaña (China)	n/p
UYEF8	<i>Pantoea vagans</i> strain A17 (KT375340)	99,72	Trigo	n/p
UYEF9	<i>Arthrobacter</i> sp. strain BIS1042 (MN810230)	99,91	Suelo antártico	n/p
UYEF10	<i>Arthrobacter</i> sp. strain BIS1066 (MN810167)	99,79	Suelo antártico	n/p
UYEF11	<i>Arthrobacter</i> sp. strain BIS1066 (MN810167)	96,52	Suelo antártico	n/p
UYEF12	<i>Micrococcus</i> sp. strain DSM (MN537502)	99,86	Excremento de cerdo	n/p
UYEF13	<i>Arthrobacter</i> sp. strain BIS1066 (MN810167)	99,79	Suelo antártico	n/p
UYEF14	<i>Arthrobacter</i> sp. strain BIS1116 (MN810185)	99,81	Suelo antártico	n/p
UYEF15	Bacterium strain BS1795 (MK824983)	97,39	Rizósfera de tomate	n/p

UYEF16	<i>Pseudomonas</i> sp. KT111 (KJ733977)	100,00	Suelo minero	n/p
UYEF17	<i>Pseudomonas putida</i> strain JS1014 Soil 3_F5 (KX507138)	99,93	Rizósfera de maní	n/p
UYEF18	<i>Arthrobacter</i> sp. strain BIS1042 (MN810230)	99,91	Suelo antártico	n/p
UYEF19	Antarctic bacterium 3C6 (EU636020)	98,83	Glaciar Collins (Antártida)	[63]
UYEF20	<i>Pseudarthrobacter</i> sp. strain InS502 (MN315436)	97,29	Suelo antártico	n/p
UYEF21	Uncultured bacterium clone HL201308-111 (KU515348)	98,14	Agua de lluvia (China)	n/p
UYEF22	Uncultured <i>Mucilaginibacter</i> sp. clone 2pm7 (KU925712)	99,91	Suelo Península Fildes (Antártida)	n/p
UYEF23	<i>Sphingomonas</i> sp. AAP5 (CP037913)	99,93	Lago de los Alpes (Austria)	n/p
UYEF24	<i>Deinococcus</i> sp. strain PAMC 29285 (MW507692)	98,99	Líquén antártico	n/p
UYEF25	Enterobacteriaceae bacterium ENNIH3	99,50	Drenaje	n/p
UYEF27	Uncultured bacterium clone 16slp108-1b01.w2k (GQ157980)	99,10	Intestino humano	[64]
UYEF29	<i>Brevundimonas</i> sp. strain BIS1084 (MN810196)	99,85	Suelo antártico	n/p
UYEF30	<i>Polymorphobacter</i> sp. strain PAMC 29368 (MW507631)	99,93	Líquén antártico	n/p
UYEF31	<i>Streptomyces</i> sp. strain R379 (MH817407)	95,60	Suelo (Corea del Sur)	n/p
UYEF32	<i>Sphingomonas</i> sp. PDD-26b-16 (HQ256808)	96,73	Agua de nube (Francia)	[65]
UYEF33	<i>Rhodococcus</i> sp. strain BIS1079 (MN810181)	99,91	Suelo antártico	n/p
UYEF35	<i>Spirosoma</i> sp. strain JK06 (MK606077)	93,13*	-	n/p
UYEF36	<i>Arthrobacter</i> sp. RKS6-4 (GQ477171)	99,93	Glaciar (India)	n/p

UYEF37	<i>Sphingomonas</i> sp. strain YZ-8 (MH091345)	92,54*	Suelo Península Fildes (Antártida)	n/p
UYP1	<i>Pedobacter cryoconitis</i> strain A37 (NR_025534)	99,78	Glaciar	[66]
UYP2	<i>Arthrobacter</i> sp. strain PLR-18-2 (MH018925)	99,93	Suelo antártico	n/p
UYP3	<i>Arthrobacter</i> sp. strain RSAP25 (MH348990)	99,87	Ártico, Noruega	n/p
UYP4	<i>Arthrobacter</i> sp. B055-24 (KJ191008)	100,00	Agua subterránea (China)	n/p
UYP5	<i>Rhodococcus</i> sp. strain BIS1079 (MN810181)	99,93	Suelo antártico	n/p
UYP6	<i>Arthrobacter</i> sp. strain PLR-18-2 (MH018925)	100,00	Suelo antártico	n/p
UYP7	<i>Chryseobacterium</i> sp. strain InS411 (MN315423)	99,49	Suelo antártico	n/p
UYP8	<i>Chryseobacterium</i> sp. strain InS411 (MN315423)	99,49	Suelo antártico	n/p
UYP9	<i>Rhodococcus</i> sp. strain BIS1079 (MN810181)	99,93	Suelo antártico	n/p
UYP10	<i>Agrococcus jenensis</i> strain B16 (EU169180)	99,93	Rizósfera de bambú	n/p
UYP11	Uncultured bacterium clone BJ201306-2 (KX507897)	99,29	Agua de lluvia	n/p
UYP12	<i>Arthrobacter</i> sp. strain PLR-18-2 (MH018925)	100,00	Suelo antártico	n/p
UYP13	<i>Pseudarthrobacter</i> sp. strain Z22-20 (MN384970)	99,42	Suelo antártico	n/p
UYP14	<i>Rhodococcus</i> sp. strain BIS1079 (MN810181)	99,85	Suelo antártico	n/p
UYP15	<i>Arthrobacter</i> sp. strain PLR-18-2 (MH018925)	99,87	Suelo antártico	n/p
UYP16	<i>Arthrobacter</i> sp. strain PLR-18-2 (MH018925)	99,90	Suelo antártico	n/p
UYP18	<i>Bacillus</i> sp. JG-TB14 (FR849926)	99,09	Suelo de mina de uranio	[67]

UYP20	<i>Arthrobacter</i> sp. 22 (GU213364)	100,00	Arena de los Alpes (Suiza)	n/p
Mn621	<i>Glaciihabitans tibetensis</i> strain SD-70 (MF555712)	99,50	Crioconita en Himalayas (India)	n/p
Ag731	<i>Hymenobacter</i> sp. R-36364 (FR682724)	98,03	Suelo antártico	[68]
Ag732	<i>Cryobacterium</i> sp. strain E6-10 (KY476540)	99,49	Suelo antártico	n/p
Ag733	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i> strain ERG5 (JX131016)	99,55	Acuífero subterráneo	n/p
Co721	<i>Arthrobacter</i> sp. SIIA_Zn_R9 (KX036596)	99,71	Rizósfera de aliso	n/p
Co722	Uncultured bacterium clone ARKCRY2 (AY198110)	98,78	Crioconita (Ártico)	n/p
Co724	<i>Mycobacterium neglectum</i> strain: GMC128 (AB741467)	98,61	Suelo de pastizal (Japón)	n/p
Co726	<i>Sphingomonas</i> sp. strain Ap03E (KX990223)	99,93	Suelo antártico	n/p
Co731	<i>Hymenobacter</i> sp. R-36364 (FR682724)	97,91	Suelo antártico	[68]
Co732	Uncultured bacterium clone HL201308-111 (KU515348)	99,64	Agua de lluvia	n/p
Cu711	Uncultured bacterium clone Hswb- 118 (GU113038)	98,84	Suelo de mina de carbón	[69]
Cu712	<i>Arthrobacter</i> sp. FB21 isolate FB21 (AM933512)	99,64	Suelo antártico	n/p
Cu716	<i>Cryobacterium</i> sp. strain E6-10 (KY476540)	99,64	Suelo antártico	n/p
Cu721	<i>Arthrobacter oxydans</i> strain B18 (JN377664)	100,00	Meseta tibetana (China)	n/p
Cu722	<i>Mucilaginibacter rigui</i> strain PAMC 29201 (MW507687)	100,00	Líquén antártico	n/p
Cu723	Uncultured soil bacterium clone A045 (JX489864)	99,78	Rizósfera de pepino	n/p
Cu731	Uncultured <i>Mucilaginibacter</i> sp. clone 2pm7 (KU925712)	99,78	Suelo Península Fildes (Antártida)	n/p

Mn731	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i> strain ERG5 (JX131016)	99,71	Acuífero subterráneo	n/p
Ni721	<i>Arthrobacter siccitolerans</i> strain 24 (KF923434)	99,42	Suelo de permafrost (China)	n/p
Ni722	Antarctic bacterium G081 (EU636018)	98,15	Glaciar Collins (Antártida)	[63]
Ni723	<i>Arthrobacter</i> sp. IRB22 (JF778718)	99,42	Suelo de permafrost (China)	n/p
Ni724	<i>Mucilaginibacter rigui</i> strain PAMC 29201 (MW507687)	99,42	Líquén antártico	n/p
Ni731	<i>Pseudarthrobacter scleromae</i> strain Q9 (MK719882)	99,71	Desierto de Taklamakán	n/p
Zn731	Antarctic bacterium R13 (EU636036)	99,78	Glaciar Collins (Antártida)	[63]
Zn732	Antarctic bacterium N88 (EU636017)	99,07	Glaciar Collins (Antártida)	[63]
UYP22	<i>Taxeobacter</i> sp. GIC34 (AY439245)	98,75	Glaciar (Groenlandia)	[70]
UYP23	<i>Sphingomonas glacialis</i> strain PAMC 29214 (MW507634)	99,85	Líquén antártico	n/p
UYP24	Uncultured bacterium clone 3_E10 (FN421692)	98,42	Filósfera de soja	[71]
UYP25	<i>Mucilaginibacter rigui</i> strain PAMC 29201 (MW507687)	99,93	Líquén antártico	n/p
UYP26	<i>Mucilaginibacter rigui</i> strain PAMC 29201 (MW507687)	100,00	Líquén antártico	n/p
UYP27	<i>Mucilaginibacter rigui</i> strain PAMC 29201 (MW507687)	99,93	Líquén antártico	n/p
UYP34	Uncultured bacterium clone BJ201306-2 (KX507897)	99,29	Agua de lluvia	n/p

Nota: ^a Corresponde a la referencia del pariente más cercano de cada aislamiento; ^b n/p: No publicado. Los porcentajes en rojo y con asterisco corresponden a valores por debajo del valor de porcentaje de identidad corte considerado para pertenecer a un determinado género (94,8%). Los porcentajes en rojo, sin asterisco, corresponden a aquellos porcentajes de identidad por encima del valor de corte para un determinado género, pero por debajo del valor de corte para una determinada especie (98,7%), de acuerdo a Rosselló-Móraa & Amann [66].

De los 84 aislamientos seleccionados en base al aspecto de sus colonias, 53 provenían de la muestra V6 y 31 de la muestra V7. Para la identificación de los aislamientos se realizó una PCR del gen 16S rRNA. Las secuencias obtenidas se analizaron y se buscaron contra las disponibles en bases de datos online para luego ser subidas e incorporadas al GenBank. Los números de acceso obtenidos para cada cepa de la colección de litobiontes antárticos cultivables, así como los géneros determinados en base a las cepas tipo más cercanas y su porcentaje de identidad con las secuencias de 16S rRNA de estas últimas, se detallan en la **Tabla 2**. Por otro lado, los parientes más cercanos e identidades de secuencia para cada aislamiento se detallan en la **Tabla 3**. En esa tabla también podemos ver que una gran cantidad de nuestras cepas (67,9%) poseen alta identidad de secuencia con cepas aisladas de ambientes fríos (polares o alpinos).

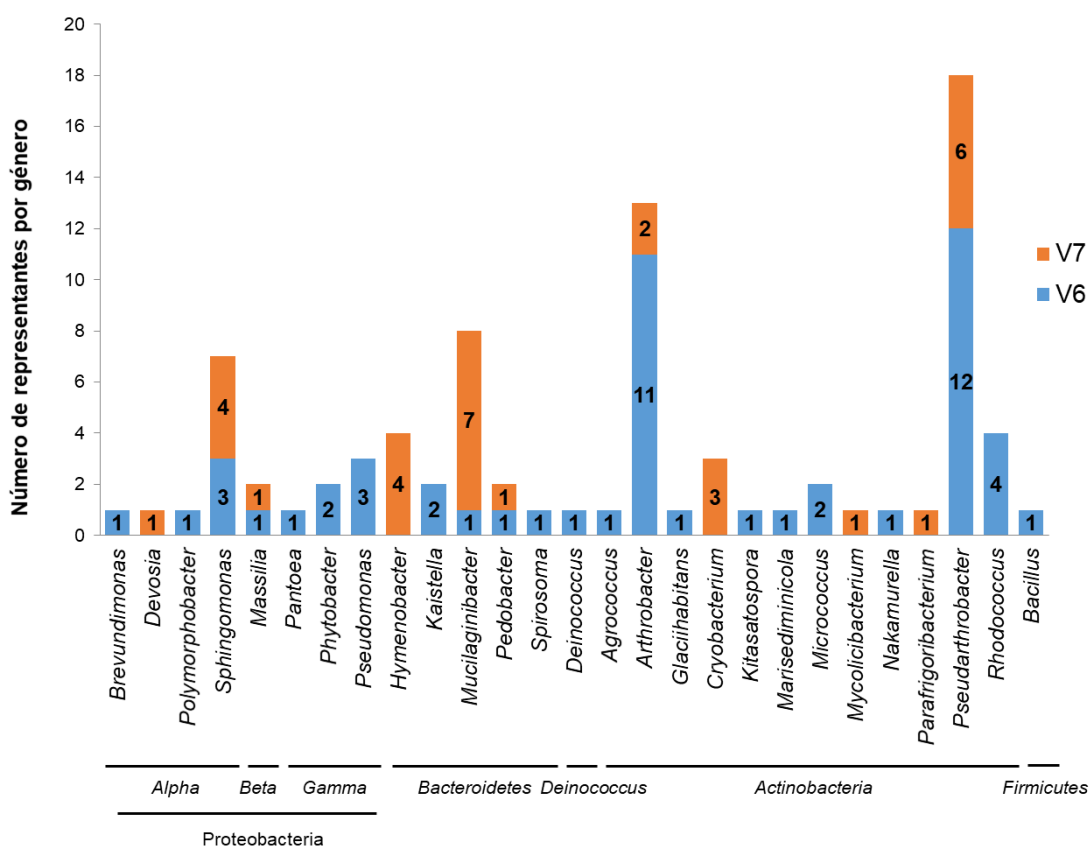


Figura 7. Identificación de las bacterias cultivables. En base a la asignación taxonómica, se determinó el número de representantes por género y por muestra. Los números dentro de las barras indican la cantidad de aislamientos obtenidos de cada género en las distintas muestras de roca.

En la **Figura 7** se muestra la asignación taxonómica de los aislamientos seleccionados en cada muestra a nivel de filo y de género. Los representantes de Proteobacteria constituyeron un 22,64% (pertenecientes a las clases Alpha, Beta y Gamma Proteobacteria) del total para la muestra V6, mientras que para V7 representaron un 19,35% (encontrándose las clases Alpha y Beta únicamente). Los filos Bacteroidetes (9,43% para V6, 38,71% para V7) y Actinobacteria (V6: 64,15%; V7: 41,94%)

fueron encontrados en ambas muestras. También se recuperó 1 aislamiento del filo Deinococcus y 1 del filo Firmicutes en la muestra V6. Se identificaron 27 géneros distintos dentro de la colección (22 en V6 y 11 en V7), y compartieron ambas muestras representantes de 6 géneros (*Sphingomonas*, *Massilia*, *Mucilaginibacter*, *Pedobacter*, *Arthrobacter* y *Pseudarthrobacter*). *Arthrobacter* y *Pseudarthrobacter* fueron los de mayor número de representantes en ambas muestras, y los principales responsables del predominio de Actinobacteria. Los siguientes géneros con más representantes en la colección fueron *Sphingomonas*, *Mucilaginibacter*, *Hymenobacter* y *Rhodococcus*. En resumen, a pesar del bajo número de aislamientos de la colección, y considerando el sesgo de la selección, se obtuvo una diversidad taxonómica relativamente alta con 27 géneros bacterianos distintos.

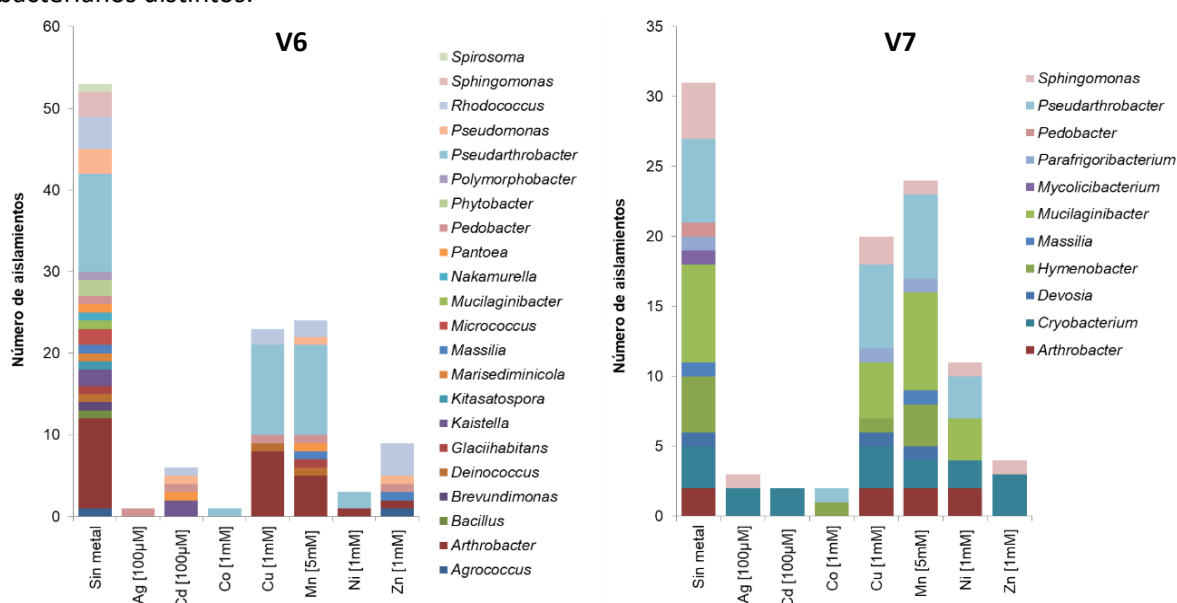


Figura 8. Tolerancia a metales de los aislamientos obtenidos de las muestras de rocas V6 y V7. Se evaluó la tolerancia a metales de la colección en medio R2A suplementado con AgNO_3 100 μM , CdCl_2 100 μM , CoCl_2 1mM, CuSO_4 1mM, MnCl_2 5mM, NiCl_2 1mM o ZnSO_4 1mM. Se muestra para ambas rocas el número de aislamientos por género capaces de crecer en cada condición, así como en medio R2A sin metal agregado (sin metal) para su comparación.

Las diferencias fenotípicas entre las cepas también se evidenciaron al realizar los ensayos de tolerancia a metales. Al analizar la tolerancia a metales en medio sólido (Figura 8), el 75% de los aislamientos de la colección (V6: 69,81%; V7: 83,87%) exhibió algún nivel de tolerancia hacia al menos 1 de los metales ensayados. Más de la mitad de los aislamientos fueron tolerantes a Cu^{2+} (47,17% en V6 y 64,51% en V7) o Mn^{2+} (49,06% en V6 y 77,42% en V7). Porcentajes menores de cepas fueron capaces de crecer en con ZnSO_4 , NiCl_2 , CoCl_2 , CdCl_2 Y AgNO_3 . Cabe destacar que, interesantemente, algunas cepas crecieron en presencia de diferentes metales, lo que se conoce como multi-tolerancia. Casi la mitad de los aislamientos provenientes de V6 (44,64%) exhibieron tolerancia a 2 o más metales, mientras que el número para los aislamientos de V7 fue un poco mayor (64,52%). Al analizar la afiliación taxonómica de las cepas tolerantes, encontramos que pertenecían a 17 géneros distintos, y que no todas las cepas de un género en particular tenían el mismo perfil de resistencia. Esto podría significar

que los aislamientos de un mismo género son únicos entre ellos, y que los mecanismos de tolerancia a metales de los litobiontes están distribuidos en diferentes taxones.

DISCUSIÓN

Este capítulo tuvo como objetivo profundizar en el conocimiento de las bacterias que integran las comunidades microbianas litobióticas antárticas mediante una aproximación de microbiología clásica, en particular, a través del aislamiento y caracterización taxonómica y funcional de bacterias cultivables. Para ello se partió de 2 muestras de rocas colectadas en las cercanías del Glaciar Collins, en la Península Fildes de la Isla Rey Jorge, Antártida Marítima. Para de evitar la contaminación por arrastre de restos de suelo y materia orgánica que pudiese ir en detrimento de la obtención de bacterias litobióticas, se decidió realizar lavados sucesivos de las rocas previo a su pulverización. Por otra parte, no se hicieron controles de esterilidad (incubar los fragmentos de roca lavados en placas con medio de cultivo) que permitieran evaluar la eliminación de las bacterias de la superficie superior o inferior de las rocas (epilitos e hipolitos), por lo que no se puede afirmar que se haya obtenido únicamente la fracción endolítica de la comunidad, sino que se trabajó con la totalidad de las bacterias litobiontes. Tras la pulverización de las muestras de roca se procedió a resuspender el material resultante en H₂O d.e. para facilitar tanto la siembra en los medios sólidos como la preparación de las diluciones necesarias. El medio de cultivo utilizado para el aislamiento de bacterias cultivables fue R2A, ya que está reportado para el aislamiento de bacterias heterótrofas de crecimiento lento que, en otros medios, podrían no llegar a obtenerse por verse superadas por bacterias de crecimiento más rápido [72]. Asimismo, se decidió utilizar también medio R2A suplementado con sales de distintos metales pues otro interés de este trabajo estaba enfocado en la relación de las bacterias con los minerales y consiguientes metales de las rocas. Con esto, se pudo tener una idea de la fracción de la comunidad bacteriana cultivable capaz de lidiar con ciertas concentraciones de determinados metales, en base a su capacidad tolerar y de crecer en presencia de estos. Los resultados obtenidos muestran que se encontraron aproximadamente 10⁴ UFC/g de roca, provenientes de cada muestra, mientras que al agregar sales metálicas al medio de cultivo se recuperó un menor número de aislamientos. Debido a que al momento de aislar se utilizaron concentraciones arbitrarias para cada metal, no se puede discutir en este punto la relación entre la cantidad de aislamientos obtenidos en cada condición, con respecto a lo obtenido en R2A, en base a la toxicidad de cada metal. Por el interés de caracterizar, en particular, bacterias litobióticas de ambientes fríos, en concreto de muestras de origen antártico, fue que se decidió incubar las placas a una temperatura de 4 °C y, una vez obtenidos los aislamientos, se continuó trabajando a esa temperatura en los ensayos realizados en este capítulo.

En base a la morfología de las colonias, se generó una colección de 84 aislamientos (53 provenientes de la muestra V6 y 31 de la muestra V7). Una característica que llamó la atención fue la significativa proporción de colonias pigmentadas (**Tabla suplementaria 13** y **Tabla suplementaria 14, Anexo**). Como se mencionó en la **Introducción general**, existen reportes que dan cuenta de esta particularidad en bacterias provenientes de ambientes fríos [30, 31, 73], y es explicado como una estrategia para sobrellevar el estrés ambiental, en particular, con un rol crioprotector, o como fotoprotector frente a la intensa radiación UV [30, 73-75].

Los aislamientos fueron identificados mediante la amplificación, secuenciación y análisis de un fragmento de la secuencia que codifica para la subunidad ribosomal 16S. Para la mayoría de los aislamientos se obtuvieron secuencias de calidad de unos 1400 pb aproximadamente. Sin embargo, hubo casos en los que las secuencias fueron más cortas (en concreto las cepas UYEF35 y UYEF37), lo que explica la baja identidad de secuencia con las secuencias de cepas depositadas en las bases de datos. Para la determinación de los géneros bacterianos a los cuales pertenecían las cepas de la colección se utilizaron 2 bases de datos distintas: GenBank del NCBI y la plataforma EZBiocloud. Si bien GenBank tiene disponible una gran cantidad de secuencias, muchas son incorporadas por investigadores cuyas anotaciones están basadas en búsquedas de secuencias similares previamente anotadas, lo que en ocasiones puede arrastrar y amplificar errores (ej.: nombre de la cepa en base a género mal anotado o desactualizado). Además, no suelen estar asociados los valores de calidad, lo que también puede llevar a error. Por último, la incorporación («subida») de secuencias muy similares por parte de múltiples investigadores lleva a que la base de datos sea redundante. Sin embargo, existe la ventaja de que se encuentren secuencias más similares a la que uno busca identificar, pudiendo encontrar cepas estrechamente relacionadas provenientes de diferentes ambientes, sin ser necesariamente las cepas tipo de cada especie. Por otro lado, la plataforma EZBiocloud permite la búsqueda por similitud contra secuencias de bases de datos que controlan la calidad de las secuencias de 16S rRNA, que están actualizadas y que poseen nombres validados (ej.: cepas tipo con resultados experimentales y publicaciones que avalan su identificación). En el total de 84 aislamientos se obtuvieron representantes de 27 géneros bacterianos. Varios de los aislamientos presentaron la mayor identidad con secuencias provenientes de ambientes fríos, en particular de la Antártida. Estos resultados sugieren la adaptabilidad de determinados microorganismos a los ecosistemas fríos, independientemente del tipo de muestra del que provienen. Considerando estos resultados y lo establecido por Rosselló-Móra & Amann [62], quienes sugieren como valor de corte para definir un nuevo género una identidad de secuencia de 16S rRNA menor a 94,8 %, es posible que algunas cepas de la colección constituyan nuevos géneros. También, de acuerdo a los parámetros definidos por los autores para nuevas especies (98,7%), la colección podría contar con especies novedosas. Para

demonstrarlo deberían realizarse otro tipo de análisis bioquímicos, moleculares y genómicos más exhaustivos para su caracterización. En esta línea, existen múltiples reportes de nuevas cepas aisladas en la Antártida en los últimos años, incluso algunas de estas litobióticas [76-79].

A nivel de filo, el predominante fue Actinobacteria seguido por las Proteobacterias y, en menor medida, se destaca la presencia del filo Bacteroidetes. Estudios previos de diversidad basados en el análisis del ARN ribosomal de comunidades litobióticas antárticas, dan cuenta de la presencia de los filos y géneros identificados en nuestra colección, principalmente el predominio de Actinobacteria y Alphaproteobacteria [44, 80]. En concordancia con nuestros resultados, se ha reportado la presencia de *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Deinococcus* y *Sphingomonas* (entre otros) en bacterias cultivables aisladas de rocas [24, 81, 82]. Sin embargo, se da una discordancia en cuanto a la ausencia de Cyanobacteria, las cuales son habituales en estos nichos, particularmente en las comunidades de Tipo I, descritas en la **Introducción general**. Esto puede deberse al sesgo introducido por la utilización de un único medio de cultivo que quizás no esté promoviendo el crecimiento de este tipo de microorganismos. Otro factor que puede explicar esta ausencia es el tipo de roca. Como se mencionó con anterioridad, el sustrato rocoso, de acuerdo a su mineralogía, permite en mayor o en menor medida el pasaje de luz para el desarrollo de microorganismos fotoautótrofos. En rocas de tipo volcánico, en concreto en andesitas basálticas de la Antártida marítima, sólo se encuentra un reporte de Ascaso *et al.* de 1990 [57]. En este trabajo se estudiaron líquenes y su vínculo con el biodeterioro del sustrato, utilizando técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de rayos-X (XRD) y espectroscopía infrarroja (IR). Si bien lograron detectar bacterias, no fueron identificadas ya que el foco del trabajo no era ese. En base a estos resultados se podría especular que en estos tipos de rocas los productores primarios principales serían los líquenes, aunque no se puede descartar la presencia de otros organismos fotosintéticos. Según nuestro conocimiento no hay publicaciones previas sobre la taxonomía de las bacterias presentes en muestras de rocas de origen volcánico. En este contexto, nuestro aporte resulta significativo. En todo caso, para un estudio más exhaustivo de la diversidad presente en las rocas V6 y V7, deberían emplearse otras técnicas como *amplicon sequencing* (amplificación y secuenciación del gen del 16S rRNA u otro marcador molecular) o *shotgun sequencing* del ADN metagenómico, las cuales permitirían además acceder a la amplia y poco explorada diversidad de microorganismos no cultivables.

De acuerdo a Romaniuk *et al.* [48], la presencia de metales pesados en la Antártida es un hecho relevante. En los suelos de estas regiones es común encontrar altas concentraciones de metales pesados principalmente como consecuencia del desgaste (bio)geoquímico de fuentes terrígenas (derivados de rocas), como minerales ricos en metales; y, en menor medida, debido a actividades

antropogénicas [45, 46]. En este sentido, resulta interesante explorar el origen del deterioro de las rocas a través del estudio de los microorganismos litobióticos y su vínculo con el sustrato rocoso. Por otro lado, se sabe que la liberación de metales podría estar moldeando e influyendo en la diversidad taxonómica y funcional de las comunidades microbianas allí presentes [83], [84], lo que se traduce en un interés para el estudio de la ecología en general, y de los mecanismos para el metabolismo y biotransformación de metales tóxicos que llevan a cabo los microorganismos resistentes a metales, en particular.

Se propuso entonces evaluar la capacidad de tolerar diferentes metales por parte de los aislamientos de la colección. Si bien se ensayaron múltiples concentraciones para cada metal (**Tabla suplementaria 13** y **Tabla suplementaria 14, Anexo**), se decidió destacar en la sección de **Resultados** únicamente concentraciones (en órdenes aproximados) a partir de las cuales se suele considerar que una bacteria es tolerante [51, 85]. En base a los criterios reportados, se detectaron cepas tolerantes a Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . De hecho, un 75% de las cepas exhibieron resistencia hacia al menos 1 metal y aproximadamente el 50% presentaron multi-tolerancia, lo que habla de la prevalencia de los mecanismos de tolerancia dentro de estos ambientes. Una posible explicación al fenómeno de multi-tolerancia podría ser la existencia de mecanismos que sirven para detoxificar varios tipos de metales a la vez (ej.: bombas de eflujo capaces de expulsar distintos agentes antimicrobianos y/o metales), así como la ocurrencia de otro tipo de mecanismos no específicos, es decir, que no han sido vinculados a genes de tolerancia a metales *per se*, sino que tienen que ver con cambios en la permeabilidad de la envoltura celular o con la formación de *biofilms* capaces de retener o disminuir la entrada de los metales [48, 86]. Para conocer en profundidad los mecanismos involucrados, podría recurrirse al análisis de los genomas de estas bacterias multi-resistentes y/o a la detección de los genes de resistencia habitualmente reportados mediante PCR, o al análisis de expresión de esos mismos genes (transcriptómica) en presencia de metales.

Si bien estos resultados pueden resultar llamativos para un ambiente relativamente prístino como la Antártida, concuerdan con análisis previos realizados en suelos, en agua marina y en lagos de este continente [48, 87-89], lo que habla de la capacidad «natural» de las bacterias para adaptarse o enfrentarse a metales, mecanismos que están distribuidos en los distintos ambientes, independientemente del impacto o de la presión antropogénica. De todos modos, incluso contando con datos de la composición de metales de la muestra (como en este caso), no es posible establecer un vínculo certero entre los resultados experimentales obtenidos (proporción de UFC recuperadas en medios con metales, fenotipos de tolerancia a metales de las bacterias de la colección), ya que el análisis realizado no da cuenta de lo que efectivamente está biodisponible o a lo que se ve enfrentada

la bacteria realmente, ni distingue en qué estado de oxidación se encuentra el metal, todos factores que influyen en la toxicidad que pueda tener para el microorganismo.

Por último, el hecho de que bacterias de un mismo género posean distintos perfiles de tolerancia a metales sugiere que los fenotipos de tolerancia no son específicos de un determinado género, sino que varían según la cepa, no descartándose la posibilidad que estén codificados a nivel plasmídico y sean factibles de procesos de transferencia horizontal.

Capítulo II: Producción de *quantum dots* de sulfuro de cadmio por la cepa litobiótica antártica *Pedobacter* sp. UYP1 y su aplicación como fotosensibilizadores en celdas solares

Valentina Carrasco, Vanesa Amarelle, Sebastián Lagos-Moraga, Carolina Quezada, Rodrigo Espinoza-González, Ricardo Faccio, Elena Fabiano y José Manuel Pérez Donoso. “Production of cadmium sulfide quantum dots by the lithobiontic Antarctic strain *Pedobacter* sp. UYP1 and their application as photosensitizer in solar cells”. *Microbial Cell Factories* Volume 20, Article number: 41 (2021).

RESUMEN

La microbiota litobiótica, y en particular antártica, es poco conocida por lo que podía representar una novedosa fuente de diversidad y de funciones de interés biotecnológico. Estos microorganismos han desarrollado distintas adaptaciones para enfrentar los factores de estrés ambiental. Por su estrecho vínculo con el sustrato rocoso, los litobiontes se encuentran en un entorno con gran disponibilidad de metales. Es de esperar entonces que posean mecanismos de tolerancia a metales, hecho que pudimos verificar en la colección de bacterias cultivables en el **Capítulo I** y que ha sido reportado por Chan *et al.* a partir de datos metagenómicos [42]. El objetivo de este trabajo fue analizar la colección de bacterias litobióticas antárticas para determinar el potencial de los aislamientos de biosintetizar *quantum dots* de sulfuro de cadmio (CdS QDs) como posible mecanismo de tolerancia a este metal.

La cepa *Pedobacter* sp. UYP1 fue seleccionada debido a su alta tolerancia al cadmio y capacidad de producción de H₂S. Se desarrolló y optimizó un protocolo para la biosíntesis de CdS QDs. Luego de 20 y 80 minutos de síntesis, se observaron emisiones de fluorescencia bajo luz UV en los tonos amarillo verdoso y naranja rojizo, respectivamente, indicando una correcta biosíntesis de QDs. Los QDs fueron posteriormente caracterizados mediante técnicas espectroscópicas, análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (EDX). Se determinó que los QDs obtenidos presentaban un tamaño de 3,07 nm y una composición de 51,1% (m/m) de Cd y 48,9% (m/m) de S. Al ser empleados como material fotosensibilizador en la construcción de celdas solares, se logró la conducción de electrones a través de las mismas, obteniendo una tensión de circuito abierto de 162 mV, densidad de corriente de cortocircuito de 0,0110 mA·cm⁻², y una eficiencia de conversión de hasta un 0,0016%. Estos valores

son similares a los reportados en estudios previos para celdas solares sensibilizadas con QDs (QDSSCs) empleando QDs biosintetizados por microorganismos.

En resumen, se obtuvo un protocolo relativamente barato, rápido y amigable con el ambiente, para la producción de CdS QDs a partir de una bacteria litobiótica Antártica perteneciente al género *Pedobacter*, del cual no había reportes previos acerca de su capacidad para producir QDs. Cabe destacar que los datos obtenidos indican que los QDs producidos pueden ser usados como material sensibilizador en celdas solares.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades fisicoquímicas únicas que poseen las nanopartículas (NPs) (**Introducción General**) las convierten en un material fascinante para su utilización en el desarrollo de diversos productos tecnológicos, lo que ha dado lugar a una gran expansión en el número de estudios relacionados al uso de nanomateriales en los últimos años [90, 91]. En este sentido, las NPs basadas en metales han sido empleadas en la construcción de dispositivos optoelectrónicos, en el desarrollo del área de la biomedicina (aplicaciones en diagnóstico y terapia), en la industria energética, y en el control de microorganismos, entre otros usos [90, 92–96].

En particular, los quantum dots (QDs) son un tipo de NPs metálicas de entre 1 y 6 nm [97], compuestas por elementos semiconductores de los grupos II-VI o III-V [98]. Su tamaño y composición, a través de un efecto de confinamiento cuántico [99, 100], les da propiedades optoelectrónicas únicas como ser un amplio espectro de absorción y un espectro de emisión estrecho y sintonizable con una fuerte luminiscencia [99, 101]. Los QDs han sido utilizados en diversas aplicaciones tecnológicas, como por ejemplo el marcaje fluorescente de muestras biológicas de interés para la medicina [102] y para la confección de celdas solares [103].

Las celdas solares sensibilizadas con QDs (QDSSCs) son dispositivos especiales capaces de cosechar luz solar utilizando QDs semiconductores fluorescentes, para la posterior conversión de energía lumínica en eléctrica [104–107]. La luz solar constituye la principal y más abundante fuente de energía renovable y, debido a esto, el desarrollo de la tecnología fotovoltaica ha emergido en los últimos años como una prometedora fuente de energía «verde» [108]. En particular, el alto rendimiento de los QDs y su fabricación relativamente simple los convierte en muy buenos candidatos como material para la absorción de energía en celdas solares. Debido a que las eficiencias en cuanto al rendimiento en la conversión de energía de las QDSSCs (0,003-10%) [90, 109], aun no son tan elevadas como las de las celdas solares de silicio (alrededor de 25%) o como las de celdas construidas con otros materiales

semiconductores similares a las celdas de silicio [110], los trabajos que tienen como objetivo mejorar los materiales, la fabricación y la eficiencia de las QDSSCs constituyen un campo activo de investigación.

Por lo general, los QDs son producidos a través de procesos físicos o químicos con protocolos de nanomanufactura *top-down* o *bottom-up* [111]. El enfoque *top-down* se refiere al fraccionamiento sucesivo del material de partida (*bulk*), primero en polvo y posteriormente en NPs, mediante el desbastado (desgaste) o la molienda. En la aproximación *bottom-up* se parte de unidades básicas de átomos o moléculas que se van condensando y ensamblando en *clusters* o agregados que compondrán las NPs. La síntesis química requiere instalaciones específicas, con condiciones operacionales complejas como altas temperaturas, altas presiones, y ambientes inertes. También se necesitan materiales de partida de alta pureza que suelen ser costosos, solventes orgánicos tóxicos y sustancias químicas ácidas o básicas [112–114]. Con la finalidad de mitigar estas desventajas se han empezado a desarrollar métodos biomiméticos para la producción de QDs, los cuales emplean condiciones de síntesis más suaves y utilizan moléculas de origen biológico que no sólo hacen a la síntesis más simple, barata y amigable con el ambiente, sino que también proveen a los QDs de mayor estabilidad y biocompatibilidad, haciéndolos más adecuados para las aplicaciones biológicas [115–120]. En los últimos años ha habido un creciente interés en la síntesis biológica de QDs. Los procesos de síntesis biológica requieren condiciones suaves de presión y temperatura, y ofrecen la posibilidad de escalar la producción y de variar las características de las NPs modificando las condiciones en las que se crecen los cultivos celulares, o mediante ingeniería genética [111, 121]. Poco se sabe sobre el proceso de biosíntesis de los QDs y, a la fecha, las moléculas biológicas involucradas, los mecanismos moleculares y el papel biológico del proceso no se conocen por completo.

Mantener una apropiada homeostasis de metales es crucial para los microorganismos, y es común que estos posean diversos mecanismos para controlar las concentraciones intracelulares de metales [47, 50, 85]. En particular, la biotransformación de metales pesados en NPs ha sido sugerido como uno de los mecanismos utilizados para lidiar con los metales [53]. Generalmente, la síntesis de NPs implica la acción de reductasas y la unión de péptidos estabilizadores que contienen cisteína, metionina, arginina y lisina [51, 52, 54, 122, 123]. No obstante, los mecanismos responsables del proceso de biotransformación aún no se han dilucidado por completo.

Los QDs de sulfuro de cadmio (CdS QDs) están entre las NPs de sulfuro de metal más estudiadas y caracterizadas debido a sus potenciales aplicaciones tecnológicas [124, 125]. Se ha visto que algunas bacterias producen CdS NPs frente a concentraciones tóxicas de Cd^{2+} y en presencia de aniones sulfuros [98, 126, 127]. Usualmente estas CdS NPs están cubiertas por biomoléculas que les otorgan

una mayor estabilidad, solubilidad en agua y/o ciertas características de biocompatibilidad distintivas [124, 128, 129]. En particular, el uso de microorganismos extremófilos para la producción de QDs ha sido propuesto como alternativa para generar nanocristales semiconductores con propiedades novedosas. Utilizando bacterias poliextremófilas halófilas y acidófilas, se han podido obtener CdS QDs estables a altas concentraciones de sal y a valores bajos de pH, respectivamente [125, 130].

Los ambientes polares, como la Antártida, son sitios de ocurrencia natural de altas concentraciones de metales pesados, principalmente como consecuencia del desgaste o meteorización biogeoquímica (*biogeochemical weathering*) [131]. Al mismo tiempo, el hecho de que muchas bacterias antárticas tengan temperaturas óptimas de crecimiento en el entorno de los 20 °C las hace atractivas para su utilización en procesos industriales. En este contexto, se ha reportado recientemente la biosíntesis a bajas temperaturas de QDs basados en Cd (CdS, CdTe y CdSe) por cepas antárticas de *Pseudomonas* psicrotolerantes [132, 133].

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este trabajo seleccionamos una bacteria litobiótica antártica por su capacidad de biosintetizar CdS QDs y evaluamos su potencial aplicación en QDSSCs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y caracterización de la cepa utilizada en este trabajo

Con la finalidad de seleccionar las cepas más promisorias para la biosíntesis de CdS QDs, se realizaron ensayos de tolerancia a Cd^{2+} en medio sólido para 11 cepas representativas de la colección generada en el **Capítulo I**. Brevemente, se crecieron las cepas en R2A líquido a 4 °C hasta fase exponencial media ($\text{DO}_{620\text{nm}}$ de 0,8-1 aproximadamente) y se sembraron gotas de 5 μL de cultivo en placas con medio R2A sólido suplementado con CdCl_2 10 μM o 100 μM . Las placas se incubaron a 4 °C y se evaluó el crecimiento bacteriano a los 30 días.

Para conocer la concentración mínima inhibitoria (MIC), la cepa seleccionada, denominada UYP1, fue crecida en medio R2A líquido a 21 °C hasta fase exponencial media y se realizaron diluciones 1:20 en medio R2A líquido suplementado con concentraciones crecientes de CdCl_2 . Los cultivos se incubaron a 21 °C durante 72 h y se determinó la $\text{DO}_{620\text{nm}}$. La máxima concentración de CdCl_2 a la cual la cepa fue capaz de crecer se consideró su MIC.

Cabe destacar que la cepa UYP1 demostró ser psicrotolerante ya que fue capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas. A pesar de que la cepa fue aislada a 4 °C, su crecimiento óptimo fue a los

21 °C. Por motivos prácticos y debido al equipamiento disponible se decidió continuar realizando los experimentos siguientes a 21 y 28 °C.

Ensayo de detección de H₂S

La liberación de H₂S por parte de las cepas bacterianas fue detectada mediante la visualización de la formación de sulfato de plomo (PbS) en presencia de acetato de plomo, de acuerdo al método descrito por Shatalin *et al.* [134]. Resumidamente, las cepas fueron crecidas en medio R2A líquido a 28 °C hasta fase exponencial media en un tubo cónico de 15 mL; a los cultivos se les añadió cisteína 1 mM y se les fijó a las tapas un papel de filtro, el cual fue previamente humedecido con una solución de acetato de plomo 100 mM y secado a 60 °C, para luego cerrar los tubos firmemente. Luego de 72 h de incubación a 28 °C se evidenció la liberación de H₂S a través de la aparición de un precipitado negro en el papel de filtro, debido a la formación de PbS. Como controles negativos se incluyeron tubos con R2A líquido con y sin cisteína, así como los cultivos bacterianos sin cisteína agregada. La intensidad de color de los píxeles fue analizada mediante el *software* ImageJ.

Secuenciación del gen 16S rRNA y análisis de su secuencia

El gen 16S rRNA casi completo (1384 pb) se amplificó mediante PCR de colonia (**Tabla suplementaria 3** y **Tabla suplementaria 4, Anexo**), utilizando los *primers* universales Eub27F y Eub1492R (**Tabla suplementaria 2, Anexo**). El amplicón se secuenció en ambos sentidos (Macrogen Inc., Corea del Sur) y las secuencias fueron ensambladas y curadas utilizando el programa DNA Baser V3 Sequence Assembler [135]. La secuencia resultante fue depositada en la base de datos GenBank del NCBI con el número de acceso KU060818. La identificación del género bacteriano se realizó utilizando la herramienta «*Identify*» del EZBioCloud server 3.0 [59]. Para el análisis filogenético se seleccionaron y descargaron del sitio web del NCBI [136] las secuencias del gen 16S rRNA correspondientes a las cepas tipo (T) más similares de acuerdo a la base de datos del EZBioCloud, y de las cepas más similares de acuerdo al servidor web del RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Las secuencias se alinearon mediante el algoritmo MUSCLE (<http://www.drive5.com/muscle/>) incorporado en el programa MEGA6 (www.megasoftware.net) [137]. Las distancias evolutivas fueron calculadas de acuerdo al modelo Kimura de dos parámetros con un valor $\gamma=0,45$ [138]. Los *gaps* se editaron con el programa BioEdit [139]. Los árboles filogenéticos se construyeron con el método *neighbor-joining* [140]. La robustez de las ramas se estimó por *bootstrap* con un valor de 1000 pseudorréplicas.

Biosíntesis de CdS QDs

La cepa UYP1 se creció en R2A líquido a 28 °C y 200 rpm, hasta fase exponencial media. Posteriormente, las células fueron cosechadas mediante centrifugación a 4100 x g durante 10 min, se lavaron con H₂O d.e. y se concentraron 1,25X en *buffer* bórax-citrato (bórax 30 mM, citrato 15 mM, pH 9,3). Alícuotas de suspensiones celulares fueron suplementadas con CdCl₂ 0,1 mM y cisteína 1 mM, o con CdCl₂ 0,2 mM y cisteína 2 mM. Las suspensiones fueron incubadas a 28 °C y 200 rpm, y la producción de QDs fue evaluada luego de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos. Con esta finalidad, a los distintos tiempos se sedimentaron las células por centrifugación a 27.670 x g durante 3 minutos y se expusieron los tubos de reacción bajo luz UV (λ_{exc} 360nm) en un transiluminador. Como controles negativos se utilizaron tubos conteniendo suspensiones celulares sin CdCl₂, sin cisteína, o sin ninguno de los dos compuestos. También se incluyeron tubos de reacción con *buffer* bórax-citrato suplementado con CdCl₂ y cisteína como controles abióticos.

Purificación y concentración de los CdS QDs

Para la caracterización de los CdS QDs, se seleccionaron NPs en una etapa temprana y en otra tardía de biosíntesis (20 min y 80 min, respectivamente). Para purificar las NPs extracelulares, una vez llevada a cabo la reacción como se detalló anteriormente, se filtró el sobrenadante con un filtro de 0,22 μ m de manera de remover células intactas remanentes. Posteriormente, los QDs se concentraron 10X por centrifugación, utilizando un filtro de 3,2 kDa de corte (Amicon® Ultra 15 mL Centrifugal Filters).

Caracterización de las NPs biosintetizadas

Para la caracterización espectroscópica de las NPs purificadas, se determinaron los espectros de absorbancia, emisión y excitación a 25 °C con un lector de placas Synergy H1 (Biotek). Los espectros de absorbancia se registraron en el rango entre los 300 y 500 nm. Los espectros de emisión se obtuvieron excitando con una longitud de onda de 360 nm y registrando entre los 300 y 700 nm, mientras que los espectros de excitación se midieron como la emisión a 550 nm al excitar con longitudes de onda entre 300 y 500 nm.

El rendimiento cuántico (*Quantum yield*; QY) de las NPs biosintetizadas fue determinado siguiendo el protocolo previamente descrito por Venegas y colaboradores [141]. Brevemente, las CdS NPs se disolvieron en H₂O d.e. y, para el caso de la fluoresceína en etanol (QY = 0,91) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, se prepararon muestras con valores de absorbancia entre 0,01 y 0,1 U.A. (λ_{exc} =360nm), y se registraron los espectros de fluorescencia para así obtener la intensidad de fluorescencia integrada (IFI). Se graficó la IFI en función de la absorbancia de las soluciones. En este

método comparativo, se calcula el QY a través de la pendiente de la curva (m) que queda determinada por el gráfico anterior a través de la ecuación

$$QYNPs = QYR[mNPs/mR][nNPs/n2R]-1,$$

utilizando los índices de refracción de los solventes (n) (n_{agua} : 1,333, y n_{etanol} : 1,335), y considerando a la fluoresceína como referencia (R).

Las medidas de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) se realizaron en cubetas de 4 caminos ópticos utilizando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern Institute Ltd).

Para determinar el tamaño de las NPs se realizó microscopía electrónica de alta resolución (HR-TEM) de acuerdo al protocolo descrito por Ulloa *et al.* [125]. Brevemente, se colocó una alícuota de la suspensión de NPs purificadas en una gradilla de cobre y se analizó con un microscopio FEI Tecnai G2 F20 S-Twin operado a 200 kV.

La caracterización química de las NPs sintetizadas se llevó a cabo por espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDX) acoplado a HR-TEM. Para estos estudios se colocaron 2 μL de la solución de CdS QDs concentrados en una grilla HC300-Cu donde se dejó secar.

Las imágenes obtenidas se procesaron y analizaron utilizando los paquetes de *software* Digital Micrograph 3.9.0 (Gatan Inc) y The GIMP 2.4.0.

Fabricación de celdas solares sensibilizadas con QDs (QDSSC)

Las celdas solares sensibilizadas con QDs se construyeron de acuerdo al protocolo descrito por Órdenes-Aenishanslins *et al.* [142] con modificaciones menores. Se utilizaron electrodos de vidrio recubiertos de óxido de estaño dopado con flúor (FTO) TEC15, con una resistencia superficial de 13 Ω sq-1 y 82-84.5% de transmitancia (Sigma-Aldrich). Para remover contaminantes orgánicos se sometió a los vidrios conductores a sonicación en agua desionizada durante 10 minutos. Los ánodos se prepararon por deposición de dos capas de una suspensión de NPs de TiO_2 de 35 μL cada una mediante centrifugación (*spin-coating*) sobre los vidrios FTO (área activa de 1 cm^2) y un posterior proceso de sinterización a 465 $^{\circ}\text{C}$ durante 25 minutos. Los contraelectrodos (cátodos) se construyeron por *spin-coating* de 10 μL de una solución de $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50 mM en isopropanol sobre un vidrio FTO y calentándolo a 400 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. La sensibilización del film de TiO_2 se realizó por adsorción directa de los CdS QDs. Previo al ensamblaje de la celda se agregaron 14 μL de la solución de electrolito. La solución utilizada fue de sulfuro/polisulfuro ($\text{S}^{2-}/\text{S}_n^{2-}$), la cual se preparó con concentraciones finales de Na_2S 1 M, S 0,1 M y NaOH 0,1 M, en agua ultrapura. Las medidas de los

parámetros fotovoltaicos se realizaron bajo condiciones constantes de irradiación (filtro AM1.5G-FT-3) a una intensidad de $\sim 100 \text{ mW cm}^{-2}$ como fuente de luz.

RESULTADOS

Selección, caracterización e identificación de *Pedobacter* sp. UYP1

Con el objetivo de seleccionar la cepa más prometedora para la síntesis de CdS QDs entre las 11 bacterias litobióticas antárticas pre-seleccionadas de la colección, se evaluó la habilidad para tolerar la presencia de CdCl_2 y de producir H_2S . La cepa UYP1 fue la única capaz de tolerar CdCl_2 $100 \mu\text{M}$ y fue buena productora de H_2S (Tabla 4), por lo cual fue seleccionada para continuar trabajando.

Tabla 4. Producción de H_2S y crecimiento bacteriano en medio suplementado con Cd^{2+} 11 aislamientos representativos de la colección de litobiontes.

Cepa	Cys (-) ^a	Cys (+) ^a	Crecimiento en R2A + CdCl_2 $10 \mu\text{M}^b$	Crecimiento en R2A + CdCl_2 $100 \mu\text{M}^b$
UYP1			+	+
UYP4			+	-
UYP5			+	-
UYP6			-	-
UYP10			+	-
UYP33			+	-
Co721			-	-
Co732			-	-

Cu511		-	-
Cu512		-	-
MM211		-	-
Control ^c		NA ^d	NA ^d

^a Cys (-), sin cisteína agregada al medio; Cys (+), 1 mM de cisteína agregada al medio

^b Crecimiento bacteriano en medio R2A sólido con CdCl₂ 10 o 100 µM

^c Condición control sin bacteria

^d NA, No aplica

De acuerdo al ensayo de determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), la cepa UYP1 fue capaz de crecer en presencia de CdCl₂ 5 mM, mientras que concentraciones mayores afectaron en gran medida su crecimiento (**Figura 9**).

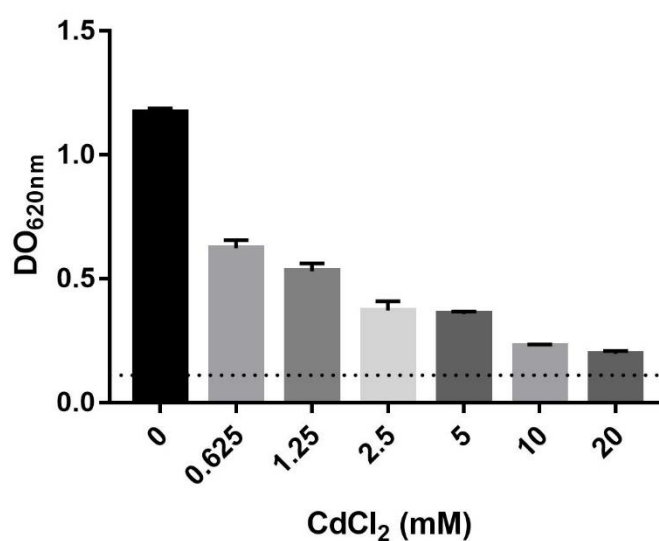


Figura 9. Determinación de MIC de CdCl₂ para la cepa UYP1. Los gráficos de barras representan la densidad óptica promedio ($\pm$ la desviación estándar, SD) de las condiciones experimentales ensayadas, cada una ensayada por triplicado. La línea punteada horizontal corresponde a la densidad óptica de partida.

UYP1 también fue capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de manganeso, hierro, zinc, cobre y níquel (**Tabla 5**), lo que indica que UYP1 es tolerante a múltiples metales.

Tabla 5. Tolerancia a metales de la cepa UYP1.

Componente metálico	MIC (mM)
MnCl ₂	>5
ZnSO ₄	>5
CoCl ₂	0,5
FeCl ₃	5
CuSO ₄	1
NiCl ₂	1
CdCl ₂	5

De acuerdo con el análisis del gen 16S rRNA, el aislamiento UYP1 pertenece al género *Pedobacter*. La mayor identidad de secuencia se obtuvo con una cepa de *Pedobacter cryoconitis* (99,7 % de identidad de secuencia con la cepa tipo *P. cryoconitis* A37). Cabe destacar que las secuencias más similares provenían de bacterias psicrófilas como por ejemplo la cepa tipo A37 y la KOPRI 25599 que fueron aisladas de crioconitas de regiones alpinas, las cepas BG5 y ANT H31B aisladas en la Antártida, la cepa gbl10 proveniente de hielo de un glaciar en Alemania, y la cepa R20-57 obtenida de suelos alpinos de Austria (Figura 2). Los análisis filogenéticos del gen 16S rRNA también agruparon a UYP1 con otras cepas de *P. cryoconitis*, pero los valores bajos de *bootstrap* obtenidos no permitieron la diferenciación filogenética con *Pedobacter lusitanus*, *Pedobacter himalayensis*, *Pedobacter hartorius* o *Pedobacter westerhofensis*. Basado en estos resultados nombramos a la cepa como *Pedobacter* sp. UYP1.

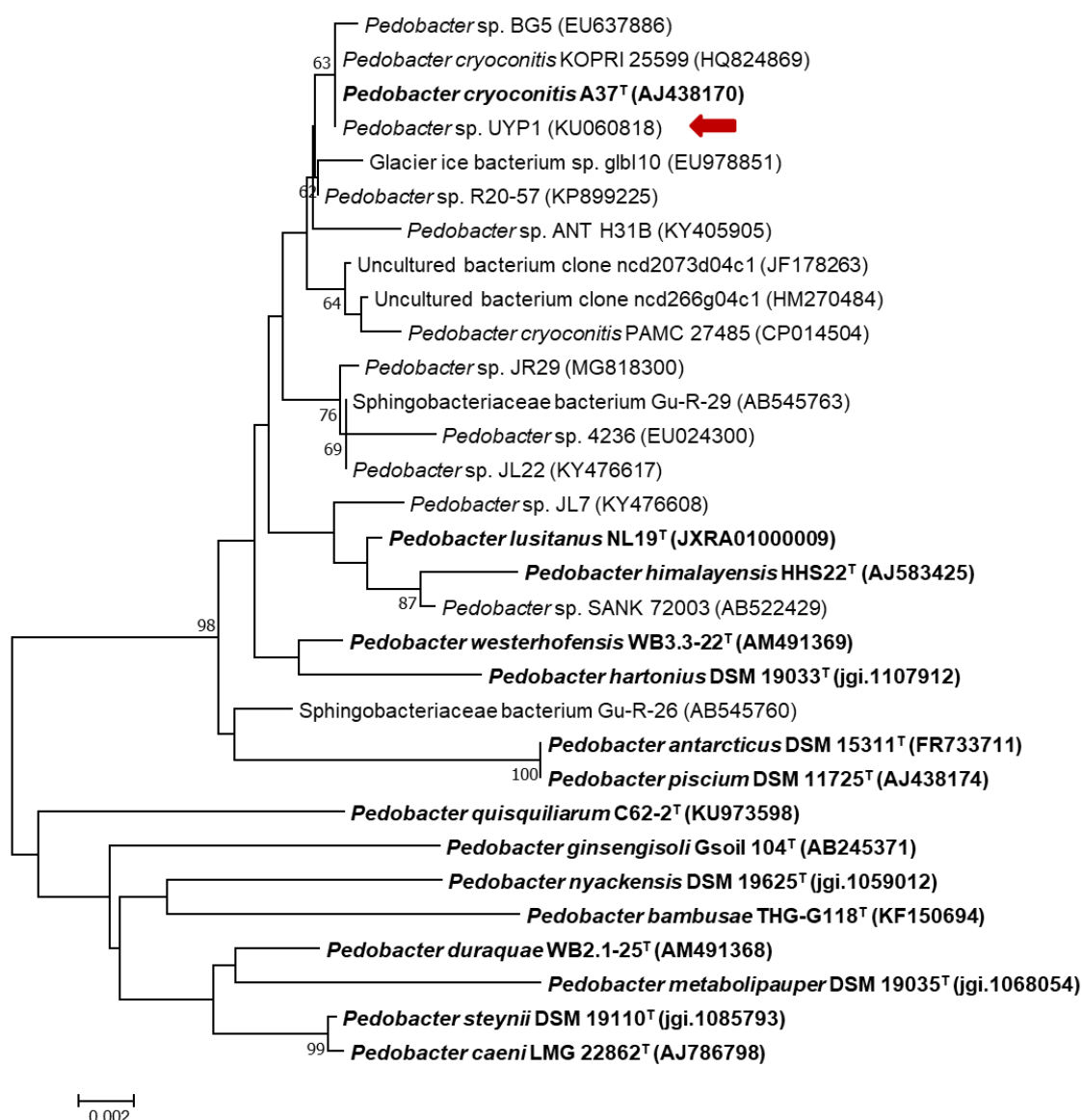


Figura 10. Análisis filogenético de la cepa UYP1. Árbol construido por el método de neighbor-joining a partir de las secuencias nucleotídicas del gen 16S rRNA de 15 cepas tipo de *Pedobacter* extraídas del EZBioCloud (resaltadas en negrita) y de las 15 cepas más similares en secuencia a UYP1, obtenidas del RDP y descargadas de los servidores del NCBI. La ubicación filogenética de *Pedobacter* sp. UYP1 se indica con una flecha. Los números de acceso en el NCBI de todas las cepas se detallan entre paréntesis. La robustez de las ramas se estimó por *bootstrap* con un valor de 1000 pseudorréplicas y sólo se muestran los valores mayores a 50.

Producción de H₂S por *Pedobacter* sp. UYP1

La mayoría de los métodos descritos para la biosíntesis de NPs de sulfuro de metal requieren la incorporación de moléculas que contengan sulfuro con alta afinidad por el metal, como tioles antioxidantes o compuestos volátiles de sulfuro. Algunas bacterias son capaces de liberar sulfuro de hidrógeno (H₂S) como estrategia para atrapar iones metálicos exógenos de manera de transformarlos en formas menos tóxicas e insolubles de sulfuro de metal, y esta estrategia ha sido ampliamente

utilizada en la biosíntesis de QDs en los últimos años [98, 126, 143, 144]. La cisteína puede ser utilizada como fuente de sulfuro para la producción de H_2S [134], por lo que evaluamos la capacidad de UYP1 de producir H_2S agregándole cisteína. En estas condiciones, UYP1 fue capaz de producir H_2S de acuerdo al método del acetato de plomo, evidenciado a través de la aparición de un precipitado negro indicativo de la formación de PbS (**Tabla 4**). La cantidad de PbS producido fue determinada mediante análisis de imagen (**Figura 11**).

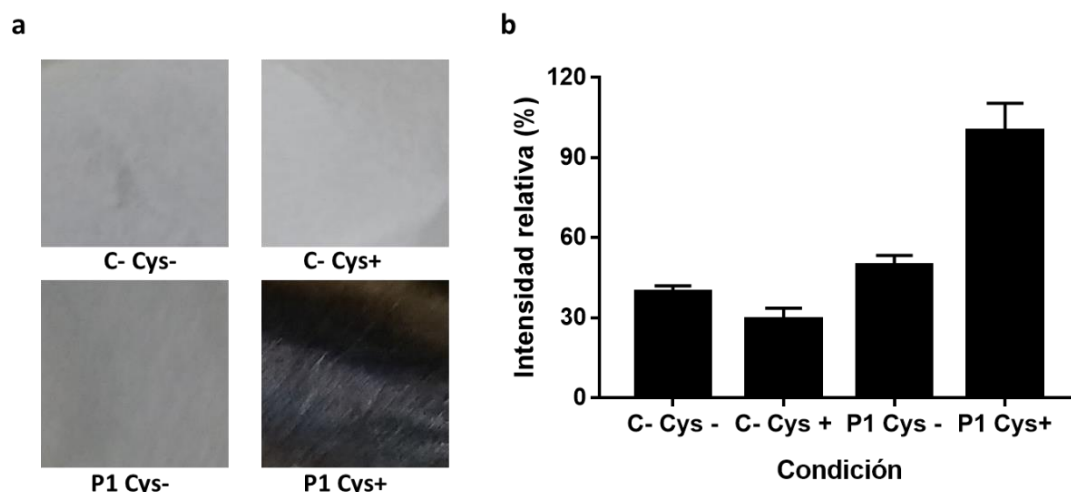


Figura 11. Ensayo de liberación de H_2S . Se embebieron papeles de filtro blanco con una solución de acetato de plomo 100 mM, se secaron a 60 °C y se fijaron al interior de las tapas de los tubos conteniendo diferentes condiciones de cultivo. La liberación de H_2S fue evidenciada por un precipitado negro, resultado de la formación de PbS. **a.** Papeles de filtro correspondientes a los controles negativos [medio R2A con 1 mM de cisteína (C- Cys+) o sin cisteína (C- Cys-)], y a la cepa *Pedobacter* sp. UYP1 crecida en medio R2A con el agregado de cisteína 1 mM (P1 Cys+) o sin cisteína (P1 Cys-). **b.** Valores promedio ($\pm$ desviación estándar, SD) de intensidad relativa obtenidos del análisis de la intensidad de los píxeles de las imágenes en **a.**, realizados por triplicado.

Biosíntesis de CdS QDs

Con la finalidad de evaluar si la cepa UYP1 era capaz de sintetizar CdS QDs a partir de $CdCl_2$ y cisteína, se realizaron experimentos de biosíntesis preliminares a 28 °C. Como se muestra en la **Figura 12a**, al exponer las células y el sobrenadante celular a la luz UV se observó emisión de fluorescencia, lo que es característico de los QDs [129, 132, 133, 145]. El hecho que la fluorescencia se observara únicamente en el sobrenadante y no en el sedimento celular, sugiere que la síntesis de las NPs es extracelular. Como se aprecia, la emisión de fluorescencia fue cambiando del verde al rojo al ir incrementando los tiempos de incubación, un comportamiento típico de los QDs y que está relacionado con el tamaño del nanocrystal [120, 141, 146, 147]. Como se muestra en la **Figura 12b**, no se observó fluorescencia en los cultivos crecidos sin aditivos (UYP1), ni cuando fueron suplementados únicamente con cisteína (UYP1+Cys) o con $CdCl_2$ (UYP1+ $CdCl_2$), tampoco en el control abiótico (C-, condiciones de síntesis sin células). Los sobrenadantes amarillo-verdoso ($t=20$ min) y naranja-rojizo

($t=80$ min) (**Figura 12c**) fueron colectados para los siguientes pasos de purificación, concentración y caracterización de QDs.

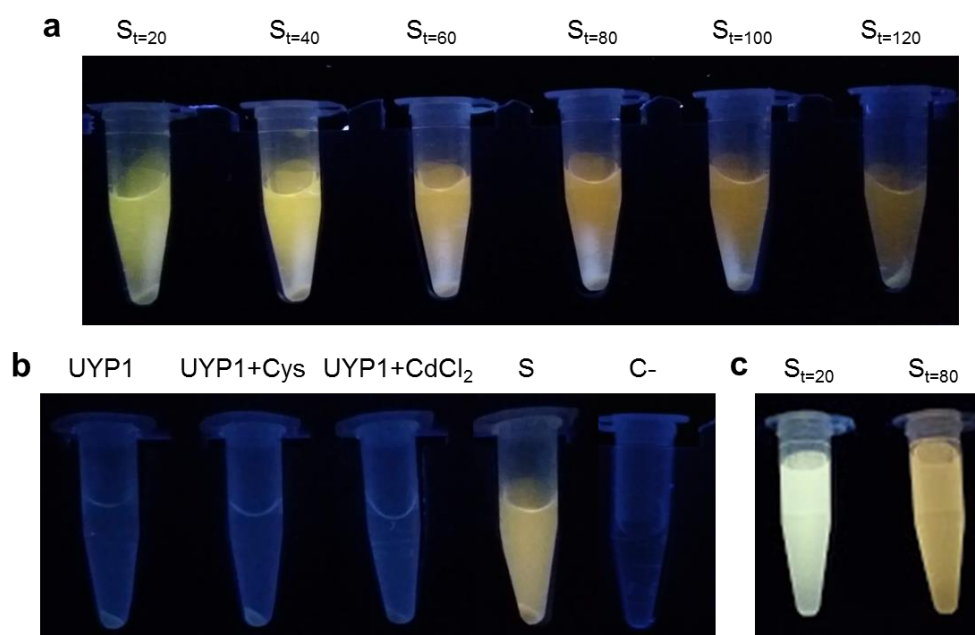


Figura 12. Biosíntesis de CdS QDs por *Pedobacter* sp. UYP1. **a.** Evaluación de la biosíntesis en función del tiempo. Luego de centrifugar los cultivos celulares, los tubos con las células decantadas fueron expuestos a luz UV de manera de seguir la formación de los QDs por medio de la fluorescencia que exhiben. **b.** Ausencia de fluorescencia en las condiciones control (UYP1, UYP1+Cys, UYP1+CdCl₂, C-) en comparación con una condición de síntesis (S). El control negativo (C-) contiene los componentes para la biosíntesis, pero no células bacterianas. **c.** CdS QDs purificados y concentrados luego de dos tiempos diferentes de biosíntesis.

Caracterización de los CdS QDs biosintetizados

Los QDs purificados fueron analizados por espectroscopía UV-visible. Como se muestra en la **Figura 13a**, los espectros de absorbancia de las NPs amarillo-verdosas y naranja-rojizas resultaron ser similares en forma, presentando picos de absorbancia a 380nm y 390nm, respectivamente. Como es esperable para los CdS QDs, ambos espectros revelaron niveles altos de absorción en el rango del UV. Tras excitar las NPs a 360nm, se observaron picos de emisión a 550nm y a 585nm para aquellas biosintetizadas en 20 y 80 minutos, respectivamente (**Figura 13b**). Esto concuerda con los colores

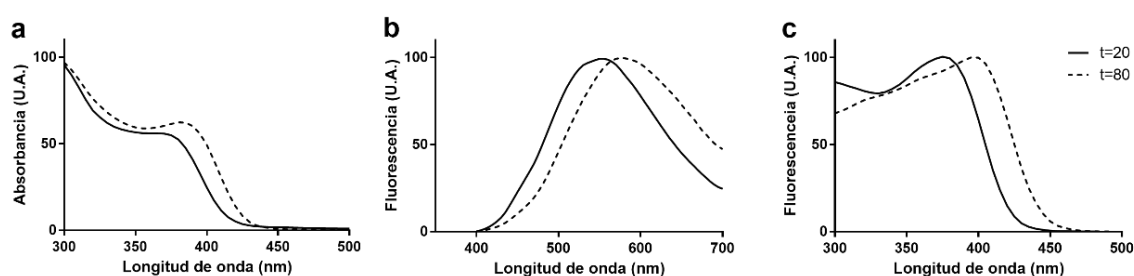


Figura 13. Caracterización espectroscópica de los CdS QDs biosintetizados por *Pedobacter* sp. UYP1. **a.** Espectro de absorbancia, **b.** espectro de emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 360$ nm) y **c.** espectro de excitación ($\lambda_{emi} = 550$ nm) de QDs amarillo-verdosos ($t=20$; línea sólida) y QDs naranja-rojizos ($t=80$; línea punteada).

observados y mostrados en la **Figura 12c**. Se observaron picos de excitación a 380nm y a 400nm para las NPs sintetizadas en 20 y 80 minutos, respectivamente (**Figura 13c**)

Basado en los espectros de absorción y considerando el modelo empírico de Henglein [148–150], se estimaron los diámetros de los QDs siendo de 2,8nm para las NPs biosintetizadas en 20 minutos, y de 4,9nm para las NPs sintetizadas en 80 minutos (**Figura 14a**). Para confirmar el tamaño, se realizó un análisis por microscopía electrónica de alta resolución (HR-TEM). Los QDs producidos por *Pedobacter* sp. UYP1 a los 80 minutos presentaron un tamaño de 3,07nm (**Figura 14b**), lo que concuerda con el tamaño aproximado estimado por la ecuación de Henglein. El tamaño determinado para los QDs a través del análisis por DLS (**Figura 14a**) resultó ser mayor en comparación al obtenido por los otros métodos. Los QDs biosintetizados suelen poseer una capa superficial de moléculas de origen biológico, lo que incrementa su radio hidrodinámico, una propiedad descrita con anterioridad para los nanocristales producidos por bacterias [98].

Los análisis con espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDX) mostraron que los QDs estaban compuestos por un 51,1 % de Cd y 48,9 % de S, confirmando que se tratan de NPs de CdS, mientras que la matriz amorfa se encontraba compuesta principalmente por materia orgánica, con presencia de C, O y otros elementos menores (**Figura 14c**). Cabe destacar que el pico en el elemento Cu corresponde a la grilla utilizada para el ensayo, mientras que el pico de Na probablemente corresponda a componentes remanentes del *buffer* utilizado en la biosíntesis.

Para evaluar la eficiencia de conversión de luz absorbida a luz emitida que ocurre en la nanoestructura semiconductor, se determinó el QY de las NPs biosintetizadas. Para los QDs producidos por *Pedobacter* sp. UYP1 se obtuvo un QY de 12,23%, similar a lo reportado para CdS NPs biológicas producidas por otros microorganismos [98, 130].

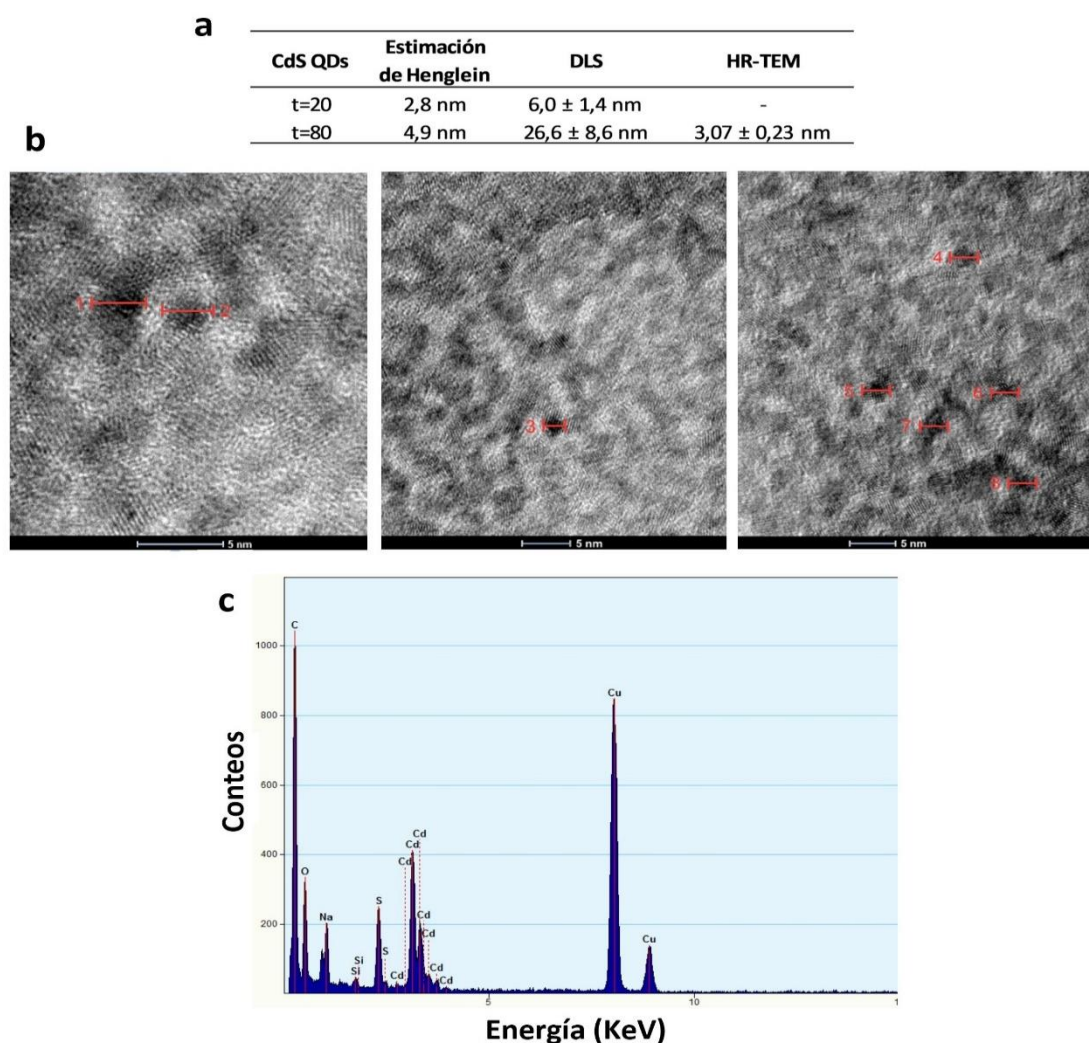


Figura 14. Caracterización de la composición química y tamaño de los CdS QDs biosintetizados por *Pedobacter* sp. UYP1. a. Comparación de los tamaños obtenidos por diferentes metodologías. **b.** QDs naranja-rojizos (t=80) visualizados bajo HR-TEM. **c.** Análisis de la composición química por espectroscopia EDX de las NPs visualizadas en b.

CdS QDs biosintetizados por *Pedobacter* sp. UYP1 como material fotosensibilizador en celdas solares

Considerando las propiedades exhibidas por los CdS QDs sintetizados por UYP1, nos propusimos evaluar su potencial aplicación como fotosensibilizador en celdas solares. Con este propósito, se construyeron QDSSCs y se evaluó su desempeño. Las celdas solares sensibilizadas con CdS QDs fueron capaces de conducir electrones y presentaron una corriente en circuito abierto (V_{oc}) de 162 mV, una densidad de corriente de cortocircuito (I_{sc}) de $0,0110 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, y una eficiencia (η) de 0,0016% (**Tabla 6**). Para poder evaluar el desempeño de nuestros CdS QDs de origen biológico, se compararon los resultados con los obtenidos en estudios previos donde emplearon el mismo tipo de fotosensibilizador.

Tabla 6. Parámetros fotovoltaicos de las QDSSCs. Los CdS QDs sintetizados por *Pedobacter* sp. UYP1 fueron empleados como material fotosensibilizador en celdas solares. Se realizaron cuatro experimentos y se obtuvieron los parámetros fotovoltaicos a partir de las curvas de intensidad-voltaje (I-V). Se muestran los valores promedio y desviaciones estándar de los ensayos, así como resultados de trabajos previos para su comparación.

Cepa productora de CdS QD	Densidad de corriente de cortocircuito Jsc [mA.cm ⁻²]	Voltaje en circuito abierto Voc [mV]	Eficiencia η [%]	Referencia
<i>Pedobacter</i> sp. UYP1	0,0110 ± 0,0005	162 ± 10	0,0016	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> BW25113	0,0819 ± 0,0035	279 ± 26	0,0080	[142]
<i>Escherichia coli</i> BW25113	0,0238 ± 0,0046	155	0,0027	[151]

DISCUSIÓN

Las comunidades litobióticas están compuestas por microorganismos capaces de colonizar rocas, las cuales los protegen de condiciones extremas de viento, desecación, alta radiación UV y fluctuaciones en la temperatura; condiciones usuales en la Antártida. En base a la hipótesis de que las rocas Antárticas albergan una comunidad bacteriana particular y no del todo explorada, en términos de diversidad y fisiología, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar una bacteria litobiótica antártica capaz de biosintetizar CdS QDs con propiedades prometedoras como material fotosensibilizador en la construcción de QDSSCs.

De las 11 cepas litobióticas analizadas, la cepa *Pedobacter* sp. UYP1 resultó ser la más prometedora para la biosíntesis de CdS QDs, debido a su capacidad de tolerar concentraciones altas de diversas sales metálicas, entre ellas CdCl₂ (**Figura 9 y Tabla 5**). Las bacterias pertenecientes al género *Pedobacter* han sido consideradas superbacterias ambientales (*environmental superbugs*), ya que muchas bacterias de este género son tolerantes a diversos agentes antimicrobianos, hidrocarburos y metales pesados [48, 152, 153]. Por otro lado, UYP1 resultó ser una gran productora de H₂S en comparación con los otros litobiontes antárticos ensayados (**Tabla 4**). La liberación de sulfuro de hidrógeno por bacterias constituye uno de los mecanismos implicados en la tolerancia al Cd como

consecuencia de la formación de sulfuros de metal insolubles, entre los cuales están las CdS NPs, las cuales son menos tóxicas para las células. El pH alcalino del *buffer* bórax-citrato favorece la desprotonación del H₂S y la concomitante liberación de aniones sulfuro (S²⁻) los cuales son capaces de atrapar el Cd²⁺ exógeno. Además del H₂S, otras moléculas que contienen sulfuro como el glutatión, algunos péptidos, y la cisteína misma, pueden ser utilizadas como fuente de sulfuro para la producción de CdS NPs [129, 144]. En el caso de la cisteína, la enzima cisteína desulfhidrasa ha sido reportada como responsable de la producción de sulfuro a partir de cisteína [154]. En este trabajo encontramos que la cisteína favorece la producción de CdS NPs por *Pedobacter* sp. UYP1 (**Figura 12**). No obstante, hasta el momento no han habido reportes acerca de la presencia de la enzima cisteína desulfhidrasa en *Pedobacter* spp. Futuros esfuerzos deben ser realizados de manera de confirmar su presencia en UYP1.

Nuestros resultados demuestran que, bajo las condiciones de biosíntesis utilizadas, UYP1 produce CdS NPs extracelulares en tan solo 20 min de incubación con un pico de emisión máximo a longitudes de onda en el rango del espectro del verde y amarillo, mientras que luego de 80 min de incubación el pico máximo de emisión de las CdS NPs se encontró en el rango del naranja y rojo (**Figura 13b**). Una de las principales características de los QDs es el corrimiento hacia el rojo (*red-shift*), o aumento de la longitud de onda de la emisión de fluorescencia, dependiendo del tiempo de incubación. Esta propiedad está directamente relacionada con el aumento de tamaño de los nanocristales [120, 141, 146, 147]. Las estimaciones de tamaño realizadas a través de la ecuación de Henglein, así como los datos obtenidos por DLS muestran que las NPs biosintetizadas con un tiempo de síntesis de 20 min son más chicas que aquellas obtenidas tras 80 min de síntesis, lo que concuerda con el comportamiento esperado (**Figura 14a**).

Los espectros de emisión obtenidos presentaron picos de absorción anchos (**Figura 13b**), indicativos de poblaciones de QDs con diferentes tamaños en las fracciones analizadas. De acuerdo a Gallardo *et al.* [132], los picos con un ancho mayor a 100 nm pueden ser causados por compuestos orgánicos que se encuentran rodeando a las NPs. Los resultados obtenidos por DLS también indican polidispersidad en el tamaño de las NPs obtenidas (**Figura 14a**). Dado que los análisis por DLS consideran el radio hidrodinámico de las partículas, los tamaños calculados con este método suelen ser mayores a aquellos calculados con el modelo empírico de Henglein, el cual sólo considera el tamaño del nanocristal (*core* metálico). La alta polidispersidad en el tamaño de las NPs ha sido reportada como un rasgo común de las NPs biosintetizadas por bacterias [98, 129]. Asimismo, se ha visto que las NPs extracelulares se encuentran, por lo general, cubiertas con compuestos orgánicos, lo que las termina haciendo más grandes que las NPs intracelulares [111]. El rendimiento cuántico determinado para los

QDs producidos por *Pedobacter* sp. UYP1 (12,23%) está en el rango de los QY más altos determinados para QDs producidos por bacterias. Previamente se han determinado valores de 15,8%, 23,53%, y de 7,81% a 21,04% para *E. coli*, *Halobacillus* sp., y una *Pseudomonas* sp. antártica, respectivamente [98, 130, 141].

Con la finalidad de seguir caracterizando los CdS QDs, se realizaron análisis por HR-TEM y EDX. El tamaño de los *cores* metálicos de QDs individuales determinados por HR-TEM resultó estar en concordancia con lo estimado por la ecuación de Henglein (**Figura 14**). Los resultados obtenidos del análisis de la composición química demostraron que los QDs biosintetizados están compuestos por Cd y S en una relación estequiométrica cercana a 1:1. Adicionalmente, se demostró que estas NPs presentan una capa orgánica compuesta de elementos que ya han sido descritos en otros ensayos de síntesis biológica de QDs [125], explicada por proteínas producidas por la propia bacteria. Podríamos especular entonces que en el caso de *Pedobacter* sp. UYP1 esta capa orgánica también derive de proteínas producidas de forma endógena.

En cuanto a la aplicación de QDs de síntesis biológica como material fotosensibilizador en la construcción de celdas solares, según la bibliografía disponible hay muy pocos estudios previos. En Spangler *et al.* [155], se utilizó una cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* modificada genéticamente para la producción de PbS NPs, mientras que en los trabajos de Órdenes-Aenishanslins *et al.* [142, 151], la bacteria utilizada fue una cepa de *E. coli* capaz de producir CdS QDs. Los QDs biosintetizados por la cepa *Pedobacter* sp. UYP1 exhibieron parámetros fotovoltaicos en los mismos órdenes de magnitud de los reportados en dichos estudios. Los parámetros fotovoltaicos obtenidos utilizando QDs de origen biológico como fotosensibilizadores son todavía muy bajos para su aplicación real. Para mejorar su eficiencia pueden explorarse distintas alternativas, como la pasivación con otro semiconductor, mejorar las características del dispositivo engrosando la capa de TiO₂, o modificando los QDs biosintetizados. En este contexto, nuestro grupo ha desarrollado recientemente dos protocolos para producir CdS/CdSe QDs de tipo *core shell* (QDs con «centro» y «cáscara» de distintos materiales) y CdSAg₂ QDs ternarios utilizando células de *E. coli*. Ambos tipos de QDs fueron caracterizados y aplicados en QDSSCs, donde se determinaron los parámetros fotovoltaicos correspondientes. Como era de esperar, tanto las celdas solares con QDs *core shell* como las de QDs ternarios mejoraron 10 veces sus eficiencias en relación a los CdS QDs (0,0222 vs. 0,00271 %) [142, 151]. De todos modos, las eficiencias obtenidas con estos métodos novedosos aún están lejos de aquellas obtenidas con QDs de origen químico (1-3 %).

Los microorganismos que habitan en ambientes extremos poseen un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas, particularmente aquellos provenientes de la Antártida que hasta la fecha han sido

escasamente utilizados. El presente trabajo valida la importancia de aislar nuevos microorganismos para ser aprovechados en procesos como la generación de energía. Los parámetros fotovoltaicos de las celdas solares que utilizan QDs de origen biológico reportados hasta la fecha no son lo suficientemente buenos para su utilización en la producción de energía. Sin embargo, comprender su composición y cómo las moléculas biológicas definen sus propiedades contribuirá al desarrollo de dispositivos fotovoltaicos ecológicos sustentables.

CONCLUSIONES

Este trabajo constituye el primer reporte de biosíntesis de QDs por una cepa del género *Pedobacter*. *Pedobacter* sp. UYP1 resultó ser una buena candidata para la biosíntesis de nanopartículas semiconductoras por su alta tolerancia al Cd, producción de H₂S y crecimiento en un amplio rango de temperaturas. Describimos un protocolo para la producción de CdS QDs por una bacteria litobiótica antártica relativamente barato, rápido y amigable con el ambiente. Las NPs biosintetizadas exhibieron fluorescencia de distintos colores debido a su tamaño y como resultado de diferentes tiempos de reacción. Su aplicación en QDSSCs fue validada, aunque serían necesarias futuras optimizaciones de forma de obtener mejores resultados en los parámetros fotovoltaicos.

CONTRIBUCIÓN AL TRABAJO

En este trabajo fui responsable de gran parte de las actividades prácticas. VA colaboró con el trabajo experimental vinculado al muestreo, aislamiento de la cepa y parte de su posterior caracterización. SLM determinó el QY. CQ y REG estuvieron encargados de la obtención de imágenes por HR-TEM y el análisis por EDX. RF realizó los análisis de XRD. Participé activamente de la interpretación y discusión de los resultados, así como de la redacción del manuscrito. JPD y EF concibieron el trabajo y supervisaron la parte experimental.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y por una beca de posgrado de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Capítulo III: Análisis metagenómico de la comunidad

INTRODUCCIÓN

Se estima que hay en el orden de 5×10^{30} células procariotas en nuestro planeta [156], pero a pesar de su abundancia en cantidad y en diversidad, sólo una pequeña fracción de los microorganismos provenientes de una muestra ambiental dada, pueden ser aislados y cultivados para su estudio en el laboratorio, lo que deja un enorme potencial sin explorar [157]. Este fenómeno se conoce hace varios años y se denomina «la gran anomalía del recuento en placa» [158]. En muestras ambientales, existe una diferencia de varios órdenes de magnitud entre los microorganismos que se pueden contar por visualización al microscopio, en relación al número de microorganismos capaces de ser aislados en medios de cultivo. En diversos ambientes estudiados se comprobó que únicamente alrededor de un 1% de la diversidad microbiana es cultivable [158, 159]. Una de las principales causas es el desconocimiento de los requisitos para su crecimiento, así como la existencia de consorcios de bacterias relacionadas íntimamente mediante simbiosis, lo que no permite su vida en forma aislada [26, 160].

Debido a los sesgos que existen para el aislamiento y estudio de microorganismos, y a la pérdida de información que esto representa, es que se recurre a las técnicas independientes de cultivo. En los últimos años, con el advenimiento del desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*; NGS), su automatización y disminución en los costos de secuenciación, los estudios del ADN proveniente de muestras ambientales en su globalidad se han disparado [161]. En este contexto surge la metagenómica, un conjunto de herramientas que permiten acceder a la información genética de una comunidad sin la necesidad de aislar y cultivar cada uno de los miembros que la componen. La metagenómica descriptiva se basa en el análisis de secuencias obtenidas a partir del ADN extraído de una determinada muestra ambiental (ADN metagenómico), es decir el conjunto de genomas de los miembros de esa comunidad. Posteriormente, tras la secuenciación masiva del ADN metagenómico, la información genética es procesada *in silico* mediante la utilización de bases de datos, permitiendo responder preguntas en cuanto a qué organismos están presentes (diversidad) y qué potencial funcional tiene esa comunidad (qué genes y vías metabólicas están presentes), e incluso inferir cómo se relacionan entre ellos y con su ambiente.

En el presente capítulo, con el objetivo de profundizar en el conocimiento de las comunidades litobióticas, dejando de lado los sesgos introducidos por el empleo de métodos dependientes de

cultivo, se propuso realizar un análisis metagenómico descriptivo. Si bien el foco fue detectar genes relacionados a la tolerancia a metales, también se planteó la oportunidad de aprovechar los datos generados para evaluar la presencia de otras funciones celulares y vías metabólicas, así como para conocer la diversidad taxonómica de la comunidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN metagenómico

De manera de obtener ADN metagenómico en cantidad y calidad suficientes se puso a punto el protocolo de extracción. Se ensayaron 12 métodos diferentes, incluyendo el enriquecimiento de la muestra de partida en células bacterianas (gradiente de sacarosa, precultivo de la muestra), diferentes métodos de ruptura celular (mecánica, química, enzimática), el uso de tres kits comerciales (MOBIO Power Soil, Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit de Zymo Research, y FastDNA™ SPIN Kit for Soil de MP Biomedicals) así como la metodología clásica de extracción de ADN (fenol/cloroformo), y combinaciones entre los diferentes métodos. Se evaluó también el empleo de una solución con leche para inhibir la adhesión del ADN al sustrato rocoso una vez lisadas las células, y el uso de materiales adsorbentes de ADN como tierras de diatomeas, entre otras aproximaciones. En todos los casos se empleó como material de partida el macerado de roca obtenido según el procedimiento descrito en el Capítulo I. Los diversos métodos empleados se detallan a continuación.

Método 1: Kit comercial MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit

Este método se ensayó a fin de evaluar el rendimiento del kit comercial MOBIO PowerSoil. En este kit la lisis celular se lleva a cabo mediante disrupción por métodos mecánicos y químicos. Se resuspendieron 50 g del macerado de roca en 15 mL de H₂O d.e. y se utilizaron 250 µL de esta suspensión como material de partida para la extracción del ADN metagenómico, según las instrucciones del fabricante. Se eluyó el ADN en 100 µL de solución C6.

Método 2: Método clásico de extracción de ácidos nucleicos con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y disrupción mecánica

Se siguió el protocolo para extracción de ácidos nucleicos de muestras de suelo descrito por Reeve, *et al.* [162], modificado de Griffiths *et al.* [163]. Se omitió la parte final del protocolo de remoción de ácidos húmicos. Brevemente, se partió de 1 g de macerado de roca al cual se le adicionó 0,5 mL de *buffer* de extracción (CTAB 5%, fosfato de potasio 120 mM, pH 8,0) y 0,5 mL de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) en tubos con cuentas de vidrio. Se realizó la disrupción

mecánica de la muestra mediante el instrumento FastPrep -24™ Classic Instrument (MP Biomedicals), durante 30 segundos a velocidad 5,5 m/s. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 16.000 x g durante 5 minutos y la capa acuosa superior fue traspasada a un nuevo tubo al cual se le adicionó 0,5 mL de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), y se emulsionó mediante agitación con vórtex. Se repitió la centrifugación, se colectó la fase acuosa, y los ácidos nucleicos se precipitaron con 1 mL de solución de polietilenglicol 30% (p/v). Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, se realizó una nueva centrifugación, se descartó el sobrenadante, y se lavó el pellet 2 veces con EtOH 70% (v/v). El *pellet* final conteniendo el ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL de *buffer* T.E. (Tris-HCl 10 mM/EDTA 1 mM, pH 8,5).

Método 3: Método combinando el uso de kit comercial MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit con metodología clásica de extracción de ADN

Esta aproximación tuvo como objetivo realizar la lisis química y mecánica de acuerdo al kit comercial MOBIO PowerSoil, y precipitar el ADN por método clásico. Se resuspendió 1 g de macerado de roca en 1 mL de H₂O d.e., se agregaron 500 µL de la solución de lisis C2 del kit y se homogeneizó durante 10 min en vortex con adaptador. Luego, la suspensión se llevó a un volumen final de 10 mL con H₂O d.e. y se centrifugó a 5.000 x g durante 10 minutos. Se colectó el sobrenadante y se precipitó el ADN con el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol y 0,2 volúmenes de acetato de sodio 7,5 M, durante 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 10.000 x g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet conteniendo el ADN en 50 µL de H₂O d.e.

Método 4: Método combinando el uso de kit comercial MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit con paso previo de agitación y pre-filtrado de la suspensión de roca

Este método tuvo como objetivo eliminar restos de material de roca que pudieran estar interfiriendo con la extracción de ADN. Se resuspendió 1 g de macerado de roca en 50 mL de H₂O d.e. y se agitó con vortex durante 5 minutos para liberar las células bacterianas retenidas en la matriz rocosa. Posteriormente, se filtró la suspensión con algodón y papel de filtro estériles a fin de eliminar los restos de roca. Se centrifugó el filtrado durante 10 minutos a 10.000 x g, de manera de sedimentar las células presentes. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 200 µL de H₂O d.e., que fue utilizado como material de partida para el kit comercial MOBIO PowerSoil DNA isolation kit, según las especificaciones del fabricante. Se eluyó el ADN en 100 µL de solución C6.

Método 5: Uso de kit comercial Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit de Zymo Research

Este método se ensayó a fin de evaluar el rendimiento del kit comercial Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit de Zymo Research. Se resuspendieron 50 g de macerado de roca en 15 mL de H₂O d.e. y se utilizaron 250 µL de esta suspensión como material de partida para la extracción de ADN metagenómico según las instrucciones del fabricante. Se eluyó el ADN en 100 µL del *buffer* de elución provisto por el *kit*.

Método 6: Método combinando el uso de kit comercial Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit de Zymo Research con enriquecimiento previo

Con el objetivo de enriquecer la muestra en los integrantes bacterianos de la comunidad, una alícuota de la suspensión de roca del apartado anterior (Método 5) se incubó durante 20 días a 10 °C y 200 r.p.m. Transcurrido este tiempo, la extracción de ADN se realizó a partir de 250 µL de la suspensión con el *kit* comercial Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit de Zymo Research según las instrucciones del fabricante, en forma similar al método anterior. Se eluyó el ADN en 100 µL del *buffer* de elución provisto por el *kit*.

Método 7: Método clásico con enriquecimiento previo y paso adicional de lisis mecánica

En este caso, el objetivo también fue enriquecer la muestra en células bacterianas y a la vez ensayar el uso de bolitas de zirconio para la lisis mecánica de las células. Se siguió el protocolo descrito por Walker [164], modificado de Dojka *et al.* [165], con algunos cambios. Se partió de una alícuota de suspensión de roca (obtenida según el Método 5) la cual se incubó durante 30 días a 10 °C y a 200 r.p.m. Posteriormente, se tomaron 300 µL de la suspensión enriquecida, se agregaron 0,5 g de bolitas de zirconio estériles, 0,4 mL de *buffer* de extracción (Tris 200 mM/EDTA 50 mM/NaCl 0,1 M/SDS 2%, pH 8) y 0,6 mL de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1). Se homogeneizó con vortex durante 2 minutos y se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min. Se colectó la fase acuosa en un nuevo tubo estéril, se adicionó una mezcla de cloroformo/isoamílico (24:1) en igual volumen y se agitó brevemente en vortex. Luego, se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min, se colectó la fase acuosa y se precipitó el ADN con el agregado de 0,2 volúmenes de acetato de sodio 7,5 M y 1 volumen de isopropanol. Se agitó con vortex brevemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugó durante 8 min a 6.500 x g, se descartó el sobrenadante, y se lavó el pellet con EtOH

70% (v/v). Finalmente, se secó el pellet mediante la evaporación del EtOH remanente en un rotavapor, y se resuspendió el ADN en 50 µL de *buffer* T.E. (Tris-HCl 10 mM/EDTA 1 mM, pH 8,5).

Método 8: Método clásico con enriquecimiento previo y agregado de leche en el *buffer* de extracción

Para este método, se incorporó leche en el *buffer* de extracción pensando en la posibilidad de que el ADN estuviese quedando retenido en la matriz rocosa una vez que las células se rompieran. Como sugieren Guthrie *et al.* [166] y Barton *et al.* [167] para muestras de corales y rocas, respectivamente, se incluyó leche en polvo en el *buffer* de extracción de manera de bloquear la formación de uniones no específicas entre el ADN y componentes de la roca, y así aumentar el rendimiento de la extracción. Una suspensión de 7 g de roca macerada en 3 mL de H₂O d.e. se incubó durante 10 días a 10 °C y 200 r.p.m. A 300 µL de dicha suspensión se le agregaron 0,4 mL de *buffer* de extracción (detallado en el Método 7) conteniendo leche en polvo en una concentración de 40 mg de leche en polvo por g de roca y 0,5 g de bolitas de zirconio estériles. Posteriormente, se procedió como se detalló en el Método 7. Como prueba de concepto y control positivo, se adicionó una ansada de *E. coli* (cultivo *overnight* a 37 °C en medio LB sólido) a 300 µL de la suspensión, y se procedió de la misma manera que para la muestra problema. En ambos casos se eluyó el ADN en 50 µL de *buffer* T.E. (Tris-HCl 10 mM/EDTA 1 mM, pH 8,5).

Método 9: Método clásico sin enriquecimiento previo con agregado de leche en el *buffer* de extracción

Se tomaron 3 g de macerado de roca a los que se agregó 1 mL de H₂O d.e. de manera de humedecer todo el material. De ese homogenizado de roca se tomaron aproximadamente 350 mg y se colocaron en un tubo de microcentrífuga junto con 0,4 mL del *buffer* de extracción del Método 8 y 0,6 mL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1). Se homogeneizó con vortex a máxima velocidad durante 2 min, se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min, y se colectó la fase acuosa. Se adicionó una mezcla de cloroformo/isoamílico (24:1) en igual volumen y se homogeneizó brevemente en vortex. Luego, se centrifugó a 6.500 x g durante 8 min, se colectó la fase acuosa y se precipitó el ADN con el agregado de 0,2 volúmenes de acetato de sodio 7,5 M y 1 volumen de isopropanol, durante 5 min a temperatura ambiente.

Se centrifugó durante 8 minutos a 6.500 x g, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con EtOH 70% (v/v). El EtOH remanente se evaporó mediante en rotavapor, y se resuspendió el ADN en 50 µL de *buffer* T.E.

Método 10: Método clásico con enriquecimiento previo y separación de células con gradiente de sacarosa

Este método tuvo como objetivo enriquecer las muestras en bacterias y separar las células bacterianas de la matriz rocosa mediante centrifugación en gradiente de sacarosa, previo a la ruptura de éstas. Se tomaron 3 g de macerado de roca, se agregaron 4 mL de H₂O d.e. y se incubó la suspensión durante 20 h a 10 °C y 200 r.p.m. En tubos Corex de 15 mL se colocaron cuidadosamente 3 mL de suspensión sobre 7 mL de una solución de sacarosa 1,25 g/mL y se centrifugó a 10.970 r.p.m. durante 20 min a 24 °C, obteniéndose una capa opalescente correspondiente a la capa bacteriana. Se colectó la capa opalescente (aproximadamente 4 mL) y se colocó sobre 7 mL de sacarosa 1,25 g/mL para volver a centrifugar en las mismas condiciones. Nuevamente se tomó la capa opalescente (aproximadamente 3 mL), se adicionaron 3 mL de H₂O d.e. y se centrifugó a 10.970 r.p.m. durante 20 min a 24 °C. El *pellet* celular se resuspendió en 0,2 mL de H₂O d.e. y se utilizó como material de partida para la extracción de ADN mediante el protocolo descrito en el Método 9, sustituyendo al homogenizado de roca. Se resuspendió el ADN en 50 µL de buffer T.E.

Método 11: Kit comercial FastDNA™ SPIN Kit for Soil de MP Biomedicals

Este método se ensayó a fin de evaluar el rendimiento del *kit* comercial FastDNA™ SPIN Kit for Soil de MP Biomedicals. En este *kit* la lisis celular se lleva a cabo mediante disrupción por métodos mecánicos y químicos. Se colocaron 500 mg de macerado de roca en un tubo con una matriz de lisado con cuentas de cerámica, esferas de sílice y cuentas de vidrio (Lysing Matrix E), provistas por el propio *kit*. Para la disrupción mecánica y homogenización de las muestras se utilizó el instrumento FastPrep -24™ Classic Instrument (MP Biomedicals) durante 40 segundos. Posteriormente, se continuó con la extracción siguiendo las instrucciones del manual.

Método 12: Kit comercial FastDNA™ SPIN Kit for Soil de MP Biomedicals a mayor escala

Se realizaron 14 extracciones por el Método 11 hasta la obtención de los eluidos. Los ADNs obtenidos se colectaron en un solo tubo y se concentraron por evaporación en rotavapor hasta un volumen final aproximado de 100 µL.

Evaluación de la calidad del ADN metagenómico

En todos los casos, posterior a la extracción de ácidos nucleicos, se realizó electroforesis en gel de agarosa y determinación espectrofotométrica con un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) para evaluar la calidad, la integridad y la concentración de los ADNs metagenómicos.

Se prepararon geles de agarosa 0,8% (p/v) en *buffer* TAE 1X (**Tabla suplementaria 5, Anexo**) y se agregaron 2 μ L de agente intercalante GoodView® por cada 50 mL de gel. Se sembraron 5 μ L de muestra por pocillo junto con 1 μ L de *buffer* de carga (**Tabla suplementaria 6, Anexo**). Se utilizó el GenRuler™ 1 Kb Ladder como marcador de peso molecular. Los geles se corrieron a 90 V/cm durante aproximadamente 45 minutos y se visualizaron en un transiluminador.

Para determinar la concentración y la pureza (calculada como la relación entre absorbancias a 260 nm y 280 nm, y entre 260 nm y 230 nm) del ADN obtenido, se colocaron alícuotas de 2 μ L de muestra en el NanoDrop y se registraron los datos obtenidos.

Metagenómica *shotgun* y procesamiento de secuencias

Aproximadamente 1 μ g de ADN metagenómico de cada muestra (V6 y V7) fue enviado a secuenciar a MacroGen (Seúl, Corea del Sur). Las librerías metagenómicas fueron preparadas con el Illumina TruSeq Nano DNA Prep Kit, y se secuenciaron con un secuenciador Illumina HiSeq 2500, generando *reads* de 101 pb de largo. Se obtuvo más de 1 Gbp para cada metagenoma, para un total aproximado de 2,55 Gbp de ADN secuenciado (ver **Tabla suplementaria 9 del Anexo** para más información). Una vez recibidos los datos crudos, se filtraron y *trimmearon* los *reads* de acuerdo a su calidad mediante el programa Trimmomatic [168]. La calidad de los *reads* antes y después del *trimmeado* se analizó mediante FastQC [169].

Asignación taxonómica

Los *reads* que pasaron el control de calidad se utilizaron como *input* para los programas de clasificación taxonómica: Kraken [170] y Kaiju [171]. El sistema de clasificación de Kraken utiliza las coincidencias exactas obtenidas de los alineamientos de los k-meros (secuencias de ADN de largo *k* variable), de manera de lograr alta velocidad al momento de correr el programa y alta sensibilidad en cuanto a los resultados. Los k-meros obtenidos dentro de una secuencia corta de ADN, como lo son los *reads*, se mapean al *Lowest Common Ancestor* (LCA) de los genomas que contienen la secuencia de ese k-mero. Los taxones que contienen el k-mero, sumado a sus ancestros, son posteriormente utilizados para la clasificación. Por otro lado, Kaiju traduce los *reads* de las secuencias nucleotídicas en los seis marcos de lectura posibles y corta las secuencias en los correspondientes codones *stop* que identifica. Los fragmentos resultantes son buscados en bases de datos de referencia de proteínas, como la base de datos no redundante de proteínas del NCBI (NCBI BLAST *nr* database). Debido a que las secuencias proteicas están más conservadas que las correspondientes secuencias nucleotídicas, y teniendo en cuenta que los genomas microbianos tienden a tener una alta densidad de genes, la

búsqueda por coincidencias exactas máximas (MEM: *maximum exact matches algorithm*) de Kaiju puede alcanzar una alta sensibilidad y precisión en sus resultados.

Ensamblado y asignación funcional

El ensamblado *de novo* de *reads* en *contigs* se realizó con el programa metaSPAdes [172]. Posteriormente, se utilizó el programa metaQUAST [173] para evaluar la calidad de los ensamblados, chequeando parámetros como el N50 y el número de *contigs* de distinto tamaño (ver **Tabla suplementaria 10** del **Anexo**). Los *contigs* generados fueron sometidos como *input* al servidor del MG-RAST [174] para el análisis funcional de los metagenomas, utilizando tanto la base de datos de ontología de genes microbianos SEED [175] como la de la *Kyoto Encyclopedia of Genes* (KEGG) y de la *Clusters of Orthologous Groups of proteins* (COG). Los *pipelines* de MG-RAST permiten realizar varios tipos de análisis sobre los conjuntos de datos de secuencias de ácidos nucleicos, como ser el procesamiento de datos crudos, control de calidad, predicción de proteínas, anotación basada en similitud o por clusterizado. SEED comprende subsistemas, es decir, una colección de familias de proteínas funcionalmente relacionadas de una misma vía metabólica, de un mismo complejo o de una misma clase, los cuales son utilizados para comparar y anotar las secuencias. Por otro lado, las bases de datos de ortólogos de KEGG (KO) y COG comprenden funciones moleculares en términos de ortólogos funcionales, diferenciándose en que el sistema COG se basa principalmente en procedimientos de predicción automática, mientras que el sistema KO incorpora además una continua curación manual. En todos los casos fueron utilizados los parámetros por defecto. Cabe destacar que para los tres tipos de análisis funcionales se filtraron los resultados que provenían únicamente de secuencias correspondientes al dominio Bacteria, teniendo en cuenta la taxonomía dada por la base de datos de RefSeq [176], también incorporada en el MG-RAST. A su vez, también se utilizó esta base de datos para evaluar la diversidad taxonómica y generar las curvas de rarefacción correspondientes (**Figura suplementaria 2**, **Anexo**). Para poder detectar diferencias biológicas relevantes entre los metagenomas se utilizó el software *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (STAMP), teniendo como *input* las tablas de abundancias relativas de las secuencias asignadas a los diferentes taxones o categorías funcionales, según el caso, para ambos metagenomas.

Para encontrar genes relacionados a mecanismos de tolerancia a metales, se compararon las secuencias de ORFs predichos y traducidos mediante el programa Prodigal, contra la base de datos de genes predichos de BacMet [177], utilizando el algoritmo BLAST (en particular, BLASTp). Aquellas secuencias de aminoácidos que mostraron al menos 35% de identidad de secuencia, 70% de cobertura y un *e-value* menor a 1×10^{-5} fueron seleccionadas. Cabe destacar que debido a que BacMet incluye en su base de datos genes vinculados tanto a la tolerancia a metales como a diversos agentes biocidas,

se realizó luego un filtrado manual, y se seleccionaron solamente los genes vinculados al metabolismo de metales. Asimismo, pese a que algunos genes de la base de datos figuran como asociados a la tolerancia a metales, se pudo ver que en varios casos muchos de ellos estaban incluidos simplemente por presentar algún metal en la estructura final de la proteína resultante o por vincularse con algún metal a modo de cofactor. Por consiguiente, para reportar los resultados finales, se tuvo que investigar acerca de cada gen individualmente en la literatura que figura como referencia en el buscador de la base de datos. Luego de esto se construyó la lista final con los genes encontrados que efectivamente estarían vinculados a mecanismos de tolerancia a metales. Los genes se clasificaron según su función como: a) transportadores de eflujo, b) relacionados a la transformación del metal a una forma menos tóxica, c) otro tipo de mecanismo (ejemplo, reparación del daño causado al ADN por determinado metal o sus derivados) y d) mecanismo desconocido. Se excluyeron reguladores y sensores por no considerarse mecanismos de tolerancia en sí mismos. Para la comparación del número de genes de resistencia a metales encontrados en cada metagenoma se normalizó en relación al número de *reads* de partida de cada metagenoma, multiplicado por 1 millón.

RESULTADOS

Extracción de ADN

Para realizar una aproximación de metagenómica descriptiva, es imperativo contar con ADN de buena calidad y en cantidad suficiente. En base a estos requerimientos, el primer paso consistió en la puesta a punto de un protocolo de extracción de ADN apto para las muestras de roca. En este contexto, se probaron tanto *kits* comerciales como métodos clásicos de extracción de ADN, así como también diferentes métodos de enriquecimiento previo y concentración, en diversas combinaciones.

Luego de varios ensayos infructuosos, finalmente se logró obtener ADN metagenómico en concentración suficiente mediante el Método 12. Se realizaron para ello 14 extracciones de ADN partiendo en cada una de 0,5 g de macerado de roca (un total de 7 g de muestra), mediante el *kit* comercial FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), para finalmente colectar y concentrar las diferentes fracciones de ADN eluido en una única fracción de 1 µg de ADN metagenómico (ver **Materiales y Métodos**).

Composición de la comunidad litobiótica

Una vez disponibles los datos de secuenciación, los *reads* *trimmeados* y filtrados por calidad se utilizaron como *input* para los programas de asignación taxonómica Kraken y Kaiju. Del total de *reads* de cada muestra, sólo el 1% pudo ser clasificado por Kraken (**Figura 15**). Con Kaiju, el porcentaje de *reads* clasificados fue significativamente mayor, 38% para V6 y 34% para V7.

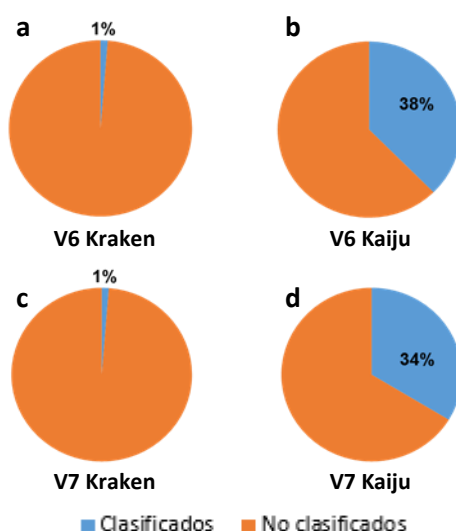


Figura 15. Asignación de *reads*. Los *reads* obtenidos por secuenciación *shotgun* correspondientes a los metageneomas V6 (a y b) y V7 (c y d) se utilizaron como input para su asignación taxonómica mediante los programas Kraken (a y c) o Kaiju (b y d).

Los *reads* clasificados fueron asignados a sus respectivos dominios (**Figura 16**). Con ambos programas, el dominio Bacteria fue el predominante (65% a 90%, dependiendo del programa y de la muestra), seguido en menor medida por Eukarya (entre un 9% y un 33%). Pocos *reads* fueron asignados a Archaea (0,08% a 0,42 %) o a virus (0,05% a 1,59 %).

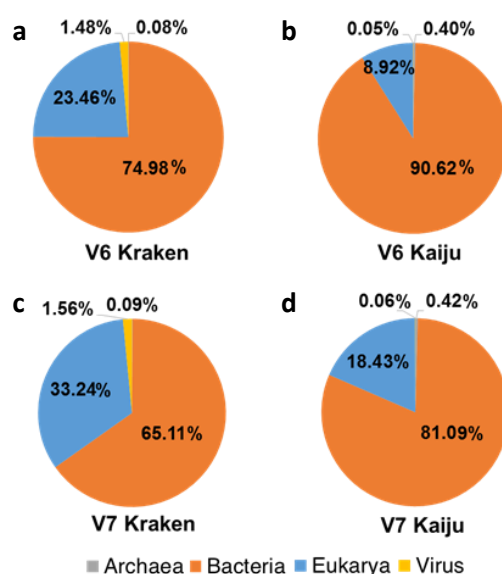


Figura 16. Asignación taxonómica de los *reads* clasificados. Los *reads* clasificados provenientes de V6 (a y b) y V7 (c y d) se usaron para la clasificación a nivel de Dominio, utilizando los programas Kraken (a y c) o Kaiju (b y d). Los *reads* asignados a virus también se consideraron.

Los *reads* pertenecientes al dominio Bacteria fueron posteriormente analizados a nivel de filo, y se compararon con los resultados obtenidos para las bacterias cultivables de la colección (Figura 17). Las abundancias relativas mostraron cierta consistencia entre los programas para ambas muestras, pese a la diferencia en el número absoluto de *reads* que cada programa pudo clasificar inicialmente. Se encontraron leves diferencias en filos menos predominantes como ser Acidobacteria, Chloroflexi y Deinococcus-Thermus que fueron detectados en mayores porcentajes por Kaiju. El porcentaje de otros filos menos representados fue relativamente constante entre muestras y programas. En ambas muestras, independientemente del programa utilizado, las comunidades estaban dominadas por Actinobacteria y Proteobacteria. Esta preponderancia fue también evidenciada en el análisis de la colección de bacterias cultivables. Es de destacar también que los filos Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Planctomycetes y Verrucomicrobia fueron detectados en la aproximación metagenómica, mientras que no se obtuvo ningún aislamiento perteneciente a estos filos en la

colección de bacterias cultivables generada. En particular, la muestra V6 presentó mayor proporción de Cyanobacteria que la muestra V7.

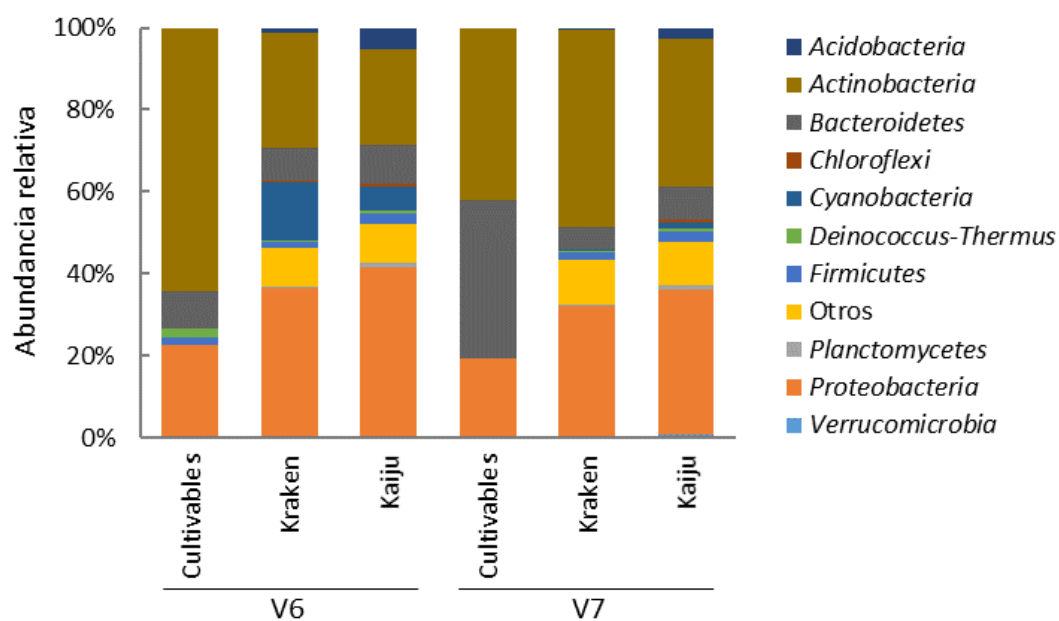


Figura 17. Composición de la comunidad a nivel de filo. Los *reads* asignados al Dominio Bacteria se usaron para determinar la abundancia relativa de Filos para cada muestra, mediante los programas Kraken y Kaiju. También se incluyeron las abundancias relativas de los Filos presentes en la colección de bacterias cultivables para su comparación.

Sólo entre un 22 y 34% del total de *reads* clasificados a nivel de filo de cada muestra pudo ser asignado a un determinado género (**Figura 18**).

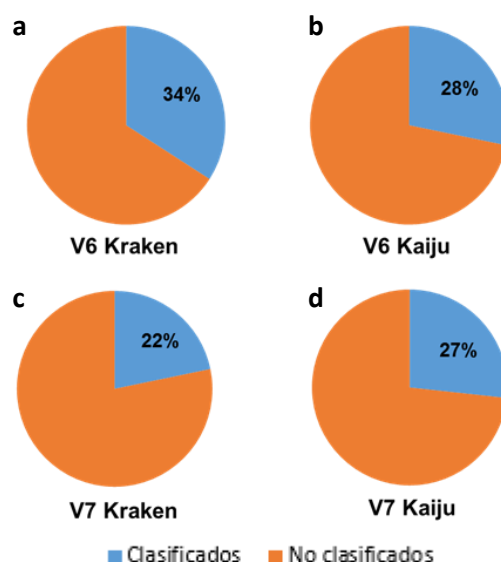


Figura 18. Reads asignados a nivel de género. Aquellos *reads* de V6 (a y b) y V7 (c y d) asignados al Dominio Bacteria y clasificados en filos se usaron para la clasificación taxonómica a nivel de género, utilizando los programas Kraken (a y c) o Kaiju (b y d). Se muestra el porcentaje de *reads* que pudo ser clasificado a nivel de género para cada muestra y con cada programa.

La composición de la comunidad a nivel de género para ambas muestras con Kraken y Kaiju, así como la asignación de género por análisis del 16S rRNA de las bacterias cultivables, se resume en la **Figura 19**. A pesar de que se reveló una diversidad relativamente alta de géneros distintos (47 detectados en la muestra V6 y 36 en V7; 57 en total), no se observó ningún patrón distintivo para las muestras, los métodos empleados (cultivables vs metagenómica), o los programas empleados (Kraken vs Kaiju). Se evidencia un sesgo en el cultivo para los géneros *Arthrobacter* y *Pseudarthrobacter*, los cuales forman parte mayoritaria en la colección de cultivables, pero son prácticamente inexistentes según la asignación realizada ya sea con Kraken o con Kaiju. El único género detectado con ambas aproximaciones para las dos muestras fue *Sphingomonas*. Otros géneros representados en ambas muestras a través de al menos un método fueron *Pseudomonas*, *Hymenobacter*, *Massilia*, *Mucilaginibacter* y *Pedobacter*, además de *Arthrobacter* y *Pseudarthrobacter*. *Bradyrhizobium*, *Conexibacter*, *Mycobacterium* y *Streptomyces* fueron los géneros que se detectaron en ambas muestras, pero únicamente mediante la aproximación metagenómica. Por último, los géneros *Acidiphilium*, *Azospirillum* y *Nostoc* sólo fueron detectados mediante metagenómica y únicamente en la muestra V6. De hecho, *Nostoc* resultó ser uno de los géneros predominantes en la muestra V6, lo que se corresponde con la abundancia del filo Cyanobacteria que se describió anteriormente.

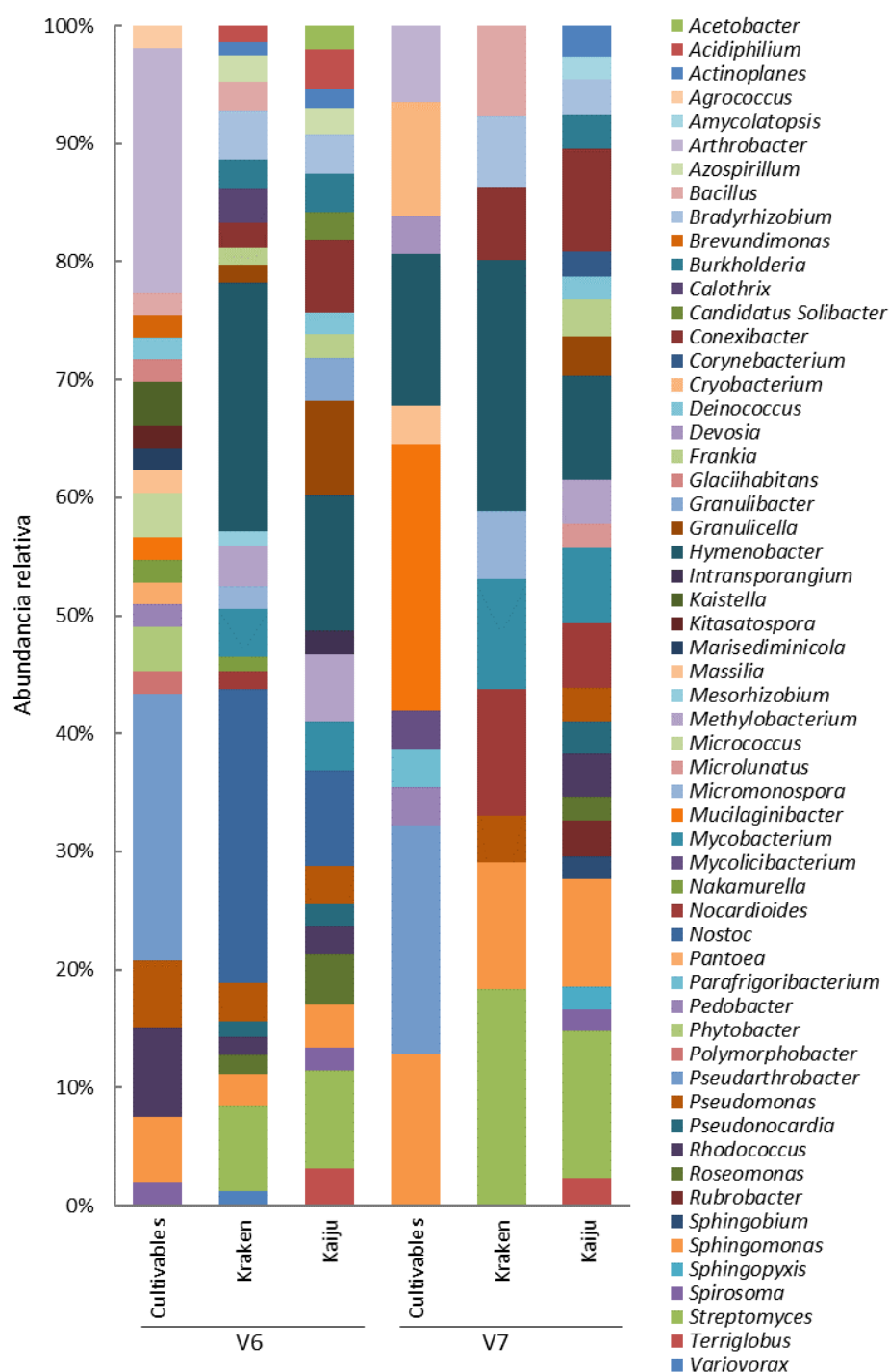


Figura 19. Composición de la comunidad a nivel de género. Los *reads* asignados al Dominio Bacteria y clasificados en filos se usaron para determinar la abundancia relativa de los géneros para cada muestra. Se utilizaron los programas Kraken y Kaiju. Se incluye la abundancia relativa de los géneros presentes en la colección de bacterias cultivables para su comparación.

Análisis funcional de la comunidad litobiótica

Para obtener información acerca del potencial funcional de las comunidades, se evaluó la presencia de genes vinculados a las distintas funciones celulares y vías metabólicas. Se realizó una búsqueda en

las distintas bases de datos disponibles en el servidor del MG-RAST, utilizando como *input* los *contigs* ensamblados. En las **Figuras 20, 21 y 22** se pueden observar las abundancias relativas de las distintas categorías funcionales en los subniveles correspondientes para las bases de datos KO, COG y SEED, respectivamente.

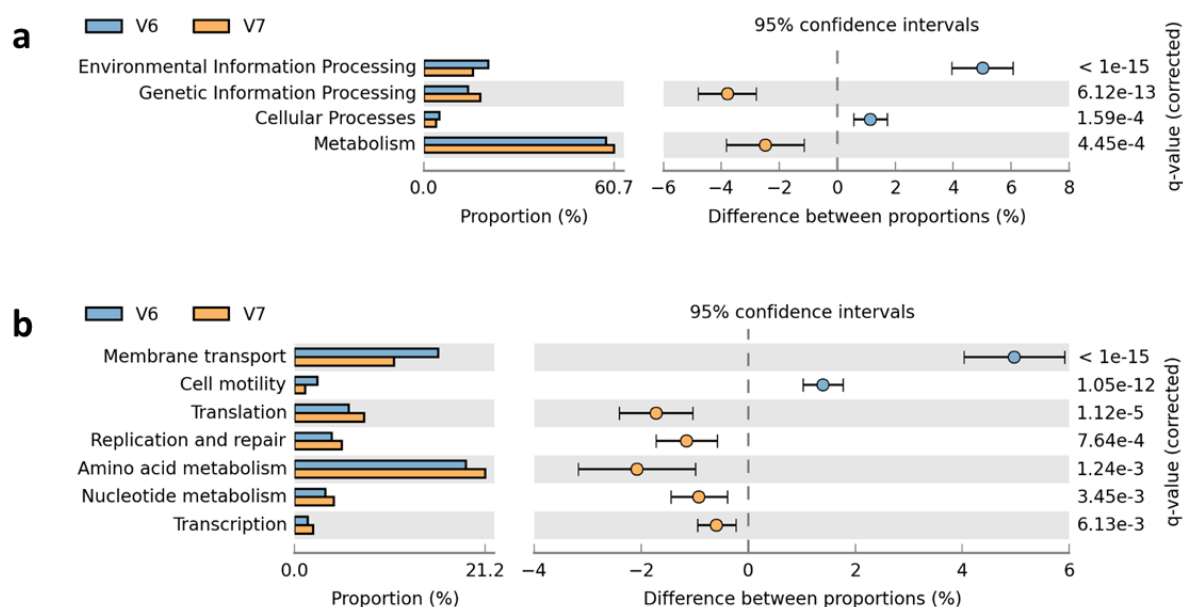


Figura 20. Asignación funcional de genes basada en la base de datos KO. En los gráficos de la izquierda se muestran las proporciones de las distintas categorías. A la derecha, se distinguen las diferencias entre las proporciones de una determinada categoría con valores positivos y en azul si hubo una mayor proporción de genes para una categoría en el metagenoma V6, o con valores negativos y en naranja si la mayor proporción en una categoría fue para V7. En todos los casos las diferencias entre proporciones con un q-valor mayor a 0,05 se consideraron significativas. En **a** y **b** se denotan niveles jerárquicos distintos dentro de la clasificación de las funciones.

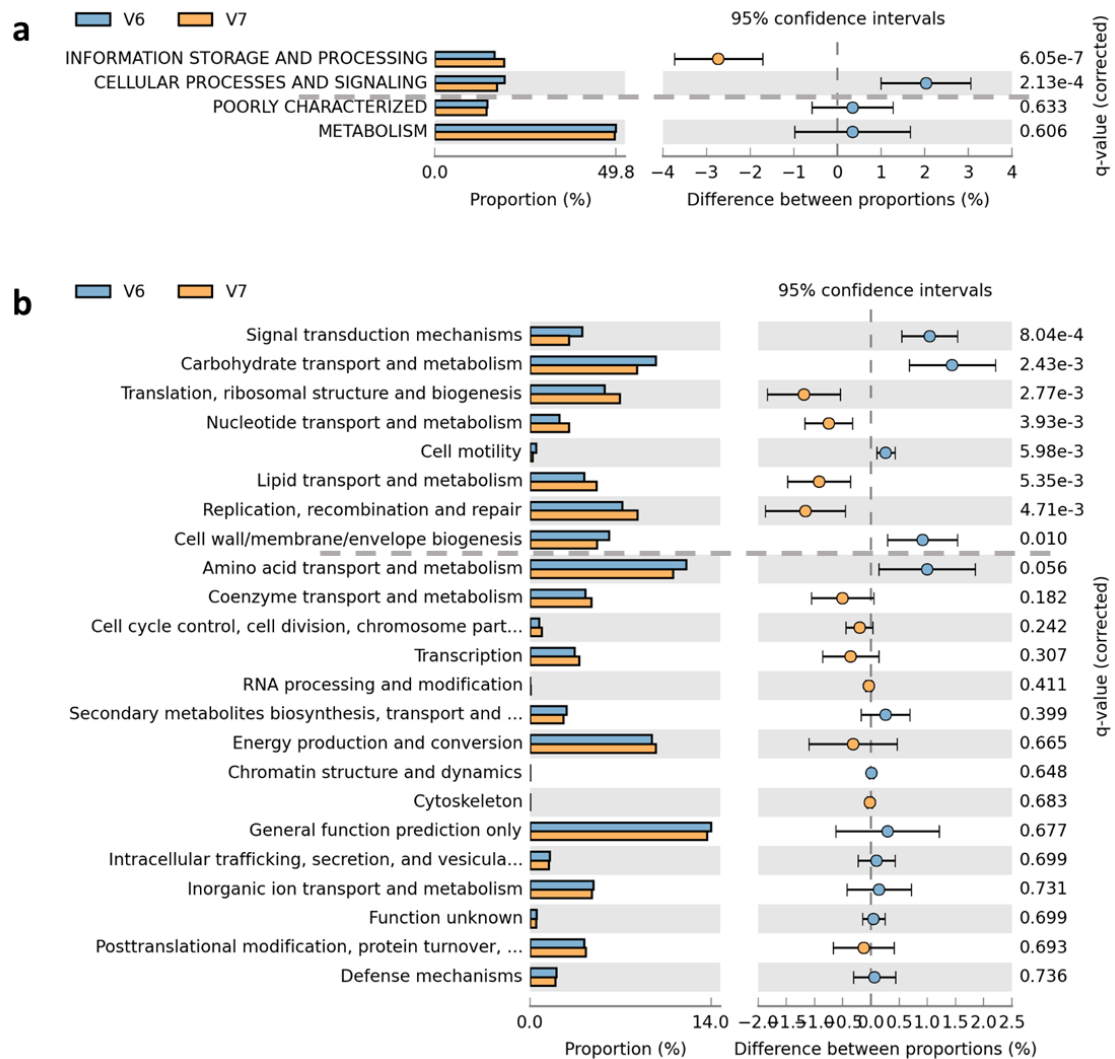


Figura 21. Asignación funcional de genes basada en la base de datos COG. En los gráficos de la izquierda se muestran las proporciones de las distintas categorías. A la derecha, se distinguen las diferencias entre las proporciones de una determinada categoría con valores positivos y en azul si hubo una mayor proporción de genes para una categoría en el metagenoma V6, o con valores negativos y en naranja si la mayor proporción en una categoría fue para V7. Las diferencias entre proporciones con un q-valor mayor a 0,05 se consideraron significativas (línea punteada horizontal). En **a** y **b** se denotan niveles jerárquicos distintos dentro de la clasificación de las funciones.

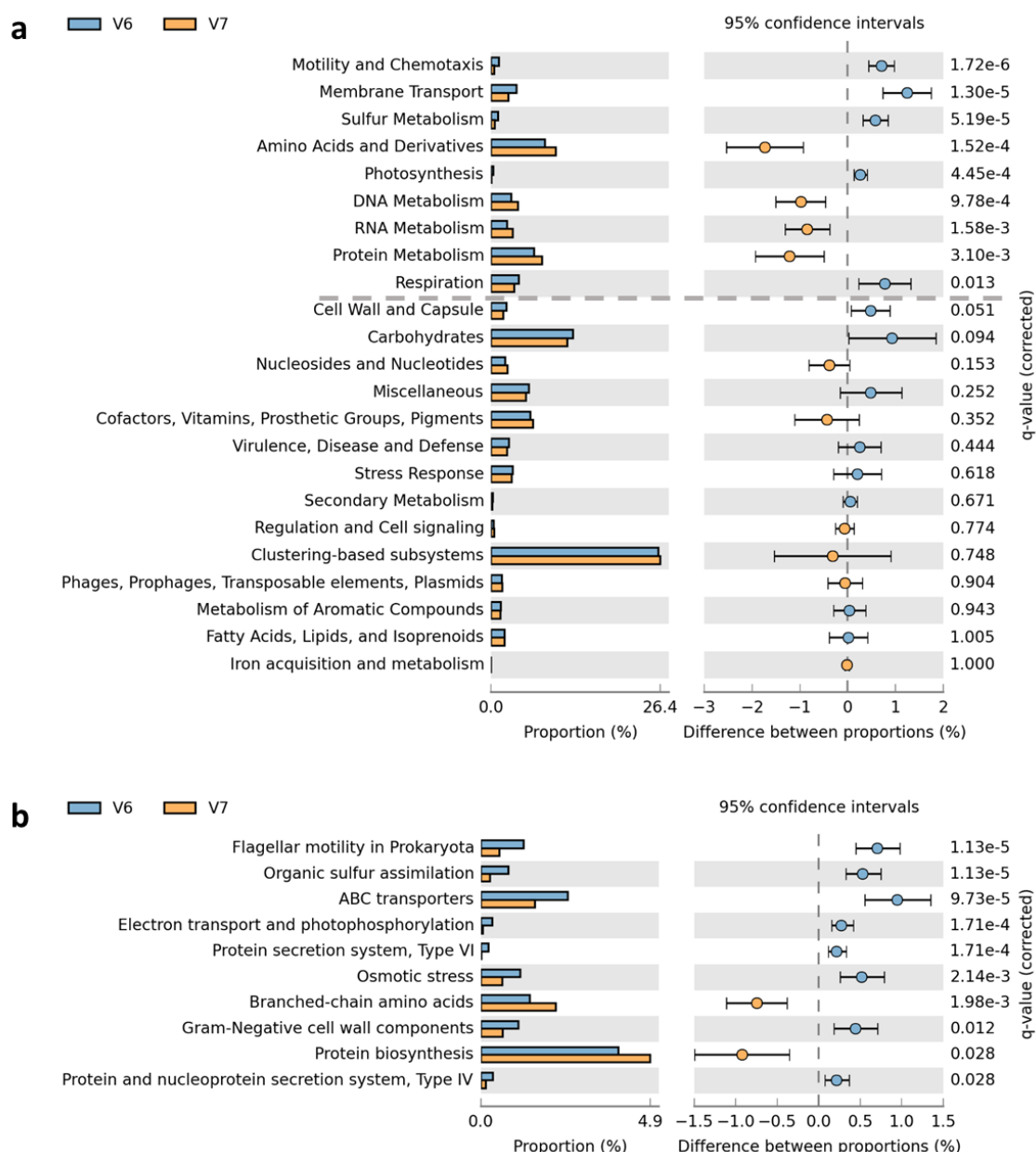


Figura 22. Asignación funcional de genes basada en la base de datos SEED. En los gráficos de la izquierda se muestran las proporciones de las distintas categorías. A la derecha, se distinguen las diferencias entre las proporciones de una determinada categoría con valores positivos y en azul si hubo una mayor proporción de genes para una categoría en el metagenoma V6, o con valores negativos y en naranja si la mayor proporción en una categoría fue para V7. Las diferencias entre proporciones con un q-valor mayor a 0,05 se consideraron significativas (línea punteada horizontal). En **a** y **b** se denotan niveles jerárquicos distintos dentro de la clasificación de las funciones.

Como se muestra en las **Figuras 20, 21 y 22**, existen diferencias significativas entre ambos metagenomas para varias de las categorías funcionales analizadas por las distintas bases de datos. En el metagenoma V6 se encontró una mayor proporción de genes vinculados al procesamiento de información proveniente del ambiente, procesamiento y transducción de señales, y transporte de membrana, así como genes vinculados a la movilidad celular y quimiotaxis. Por otro lado, para V7 se encontró una mayor proporción de aquellos genes relacionados con el metabolismo y procesamiento

de la información genética, en concreto, con el metabolismo de nucleótidos, replicación, recombinación y reparación del ADN, transcripción y traducción.

Por último, cabe destacar que, teniendo en cuenta las asignaciones taxonómicas a nivel de filo para los *reads* provenientes de ambos metagenomas mostradas en la **Figura 17** y para los *contigs* ensamblados en la base de datos RefSeq (**Figura suplementaria 1, Anexo**), se encontró una relación entre mayor abundancia de bacterias Gram negativas (filos Proteobacteria, Acidobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, entre otros) en el metagenoma V6 y mayor proporción de genes vinculados a la síntesis de componentes de la pared celular de bacterias Gram negativas (**Figura 22a**), así como una relación entre mayor abundancia del filo Cyanobacteria y mayor proporción de genes vinculados a la fotosíntesis (**Figura 22b**), también en V6.

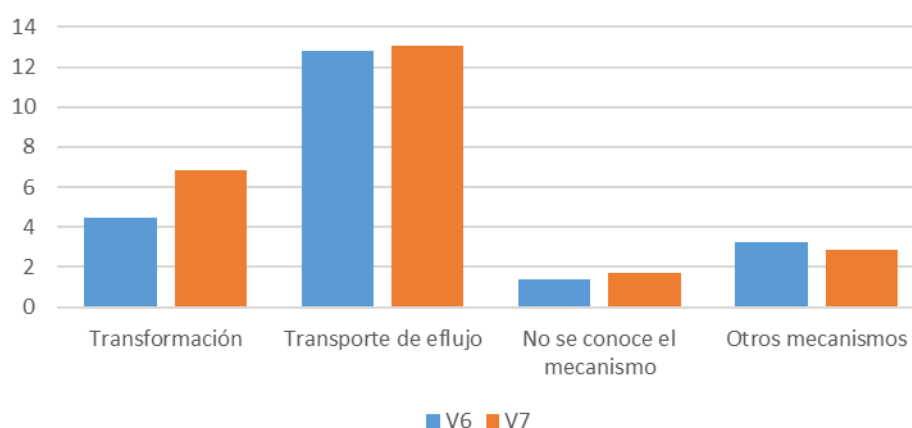


Figura 23. Mecanismos de tolerancia a metales. Los genes de tolerancia a distintos metales encontrados para ambos metagenomas a través de la búsqueda en la base de datos de BacMet, se clasificaron de acuerdo al tipo de mecanismo de tolerancia al que estaban vinculados. Se muestra el número de genes dentro de cada categoría normalizado de acuerdo al tamaño de cada metagenoma para su comparación.

Con el objetivo de detectar genes vinculados a la tolerancia a metales presentes en los metagenomas, se compararon las secuencias de ORFs predichos y traducidos contra la base de datos de BacMet. Tras descartar manualmente los genes que no estaban vinculados directamente a mecanismos de tolerancia a metales, y de clasificar en distintas categorías los genes que sí relacionados a estos mecanismos, se contabilizó el número de genes para cada categoría presentes en cada muestra y se normalizaron de acuerdo al número de reads de los metagenomas (**Figura 23**). El mecanismo de tolerancia predominante en ambos metagenomas fue el transporte hacia el exterior celular (eflujo) del metal, seguido por el de transformación del metal (generalmente implicado en la transformación de una forma tóxica a una menos tóxica). En este último caso el número de genes encontrados en V7 fue levemente superior que en V6. Otros mecanismos como el secuestro de iones, la reparación del daño producido al ADN por determinados metales, y la disminución del influjo de iones por aumento

de la impermeabilidad de la membrana, resultaron representados en menor proporción tanto en V6 como en V7. Por último, hubo un cierto número de genes (proporcionalmente similar en ambos metagenomas) vinculados a mecanismos de tolerancia que aún no han sido dilucidados.

Posteriormente, se determinó la distribución de los genes de tolerancia en función del metal

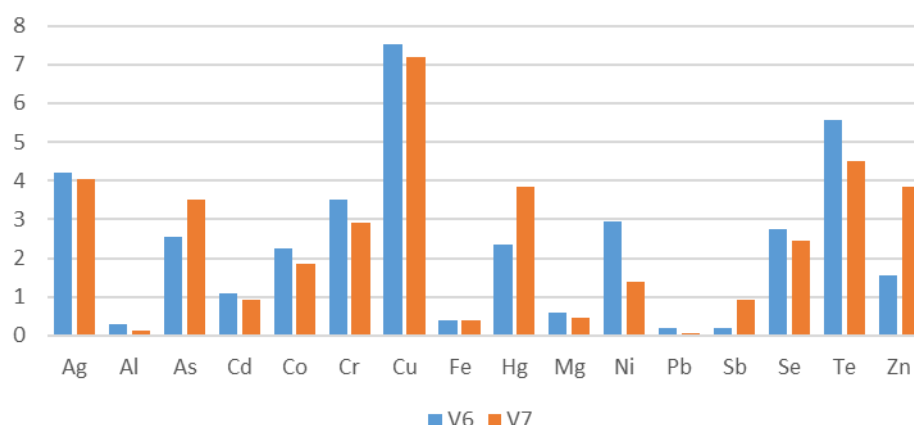


Figura 24. Genes de tolerancia por metal. Se resume para cada metal el número de genes que confieren tolerancia normalizado de acuerdo al tamaño de cada metagenoma (número de *reads*). Es de hacer notar que un determinado gen puede estar vinculado a la tolerancia de varios metales simultáneamente. En dichos casos, el mismo gen se contabilizó para todos los metales a los que podría conferir resistencia.

involucrado. Con esta finalidad, para el total de mecanismos, se evaluó el número de genes de tolerancia asociado a cada metal, normalizado (**Figura 24**), teniendo en cuenta que existen genes que están vinculados a la detoxificación de 2 o más metales simultáneamente como por ejemplo muchas bombas de eflujo; en estos casos el mismo gen se contabilizó para todos los metales a los que podría conferir resistencia. En ambos metagenomas se encontraron genes vinculados a la tolerancia de metales considerados más o menos tóxicos. Las mayores diferencias encontradas fueron en los genes de tolerancia a Zn, Hg, As y Sb, donde se observó mayor presencia en V7, y en los de tolerancia a Ni y Te donde se encontró mayor cantidad de genes en V6. También se determinaron diferencias en la abundancia de genes de tolerancia a Se, Cr y Co, los cuales se encontraban levemente enriquecidos en la muestra V6. Los genes vinculados a la tolerancia al Cu fueron los más representados en ambas muestras, seguidos por los relacionados al Te, Ag, Cr, As y Se. Genes asociados a la tolerancia a metales poco tóxicos y de gran importancia biológica como el Mg y Fe resultaron poco representados. Esto posiblemente se deba a que no sea tan crucial eliminarlos ya que se requieren en concentraciones mayores para el correcto funcionamiento del metabolismo celular, siendo tóxicos solamente en altas concentraciones. A medida que los metales son más tóxicos y que las concentraciones intracelulares requeridas son menores, cobran mayor importancia los mecanismos de tolerancia y detoxificación de manera de que no se vea afectada la viabilidad celular. Cabe agregar que los genes implicados en mecanismos de regulación y sensado de metales también son de gran relevancia, pero fueron

excluidos por no constituir mecanismos de tolerancia *per se*. Posteriormente, se focalizó la búsqueda en los metales que se habían evaluado en medio sólido en la colección de bacterias cultivables: Ag, Cd, Co, Cu, Mn, Ni y Zn (**Capítulo I**). En este caso, se evaluó el número relativo de genes de tolerancia a cada metal para cada metagenoma, y también se discriminó según el tipo de mecanismo (**Figura 25**). En general, no hubo diferencias destacables entre los mecanismos de tolerancia de ambos metagenomas, más allá de una mayor proporción de genes de tolerancia a Zn en V7 y de tolerancia a Ni en favor de V6. Al momento de analizar los genes de acuerdo al tipo de mecanismo de tolerancia al que están asociados, el preponderante en todos los casos fue el de transporte de eflujo. Sólo para Co y Cu se detectaron genes implicados en mecanismos de transformación de estos metales a formas menos tóxicas, mientras que únicamente para Cu se encontraron genes correspondientes a otros tipos de mecanismos o de mecanismos desconocidos.

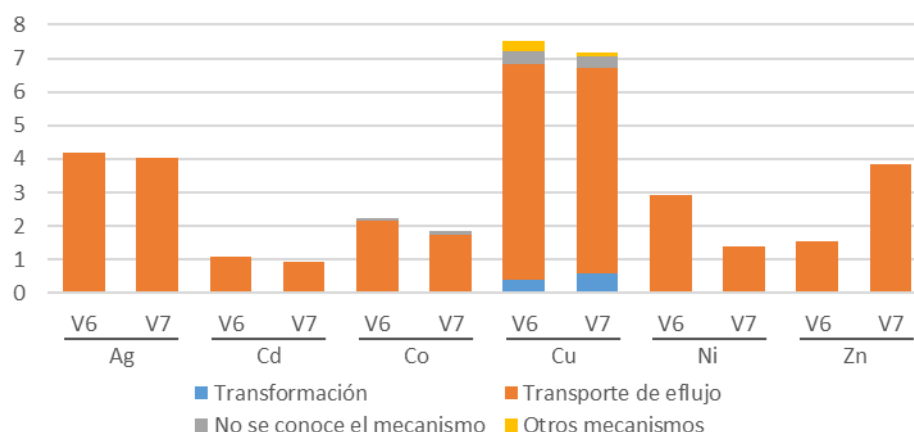


Figura 25. Mecanismos de tolerancia por metal. Se muestra el número de genes de tolerancia a metales, normalizado de acuerdo al número de *reads* de cada metagenoma, discriminado por tipo de mecanismo y por metal de interés al cual está vinculado. Se consideraron únicamente aquellos metales que fueron evaluados en la colección de bacterias cultivables.

DISCUSIÓN

Este capítulo tuvo como objetivo generar conocimiento sobre la diversidad taxonómica y funcional de las comunidades litobióticas de las dos muestras de rocas en estudio, utilizando una técnica independiente de cultivo, como es la metagenómica descriptiva.

El primer y crucial paso fue la obtención del ADN metagenómico en cantidad y calidad suficiente para su secuenciación, lo cual constituyó un gran cuello de botella por la dificultad dada por el tipo de muestra. Dado que el método de procesamiento (lavados sucesivos y pulverización con mortero) permitía la recuperación de células bacterianas viables y, en concreto, de cultivables en un orden de 10^4 UFC/g de roca (**Capítulo I**), y teniendo en cuenta el bajo porcentaje de la diversidad total que representan las bacterias cultivables, no se esperaba tener mayores inconvenientes al momento del

aislamiento del ADN. Sin embargo, los múltiples intentos y métodos ensayados para este objetivo indicaron lo contrario. El material de partida requerido por los distintos *kits* comerciales de extracción de ADN y trasladado a los protocolos de los métodos clásicos de extracción de ADN, resultó insuficiente para obtener ADN en cantidades suficientes. Por otro lado, enriquecer las muestras para aumentar el número de células incubándolas a distintas temperaturas y durante distintos tiempos, aumentar la cantidad de material de partida, e intentar separar y/o concentrar las células, no arrojó mejores resultados. Dado que la presencia de células viables estaba comprobada, nos planteamos la hipótesis de que los componentes de la matriz rocosa estuvieran interfiriendo de alguna manera en el proceso de extracción. En este sentido, ya se había descrito la formación de complejos entre el ADN y componentes de la matriz en corales y rocas [166, 167]. Cabe destacar que al incorporar leche al *buffer* de extracción como sugerían estos autores, se logró detectar una banda tenue en los geles de agarosa (resultados no mostrados).

Finalmente, mediante el uso de un *kit* comercial que emplea un equipo para la disrupción mecánica (FastPrep -24™ Classic Instrument) así como bolitas de diferentes materiales (cuentas de cerámica, esferas de sílice y cuentas de vidrio) se logró obtener ADN metagenómico a partir las muestras de roca. Si bien la cantidad no era suficiente, mediante la combinación y concentración de varias fracciones de ADNs eluidas provenientes de múltiples extracciones de muestra de roca se pudo conseguir ADN metagenómico en cantidad y calidad adecuadas para su secuenciación. Esta última estrategia ha sido utilizada también para la obtención de ADN metagenómico a partir de muestras de permafrost y ambientes líticos antárticos [36]. En base a nuestros resultados y los resultados previamente reportados, podemos concluir que en muestras de roca es preferible utilizar métodos de extracción de ADN que impliquen un paso excesivo de disrupción mecánica de la muestra (en contraposición a la lisis química o enzimática), lo que posiblemente facilite el acceso a los microorganismos en los pasos posteriores de la extracción, además de favorecer la lisis *per se*, y que se requieren mayores cantidades de muestra para recuperar ADN suficiente para la obtención de metagenomas.

En cuanto a la asignación taxonómica de los *reads* de ambas comunidades, un resultado que llama la atención es el bajo porcentaje de *reads* que pudieron ser clasificados, tanto por Kaiju como por Kraken (Figura 15). Sin embargo, estos resultados están en el orden de lo habitualmente detectado por estos mismos clasificadores para muestras provenientes de ambientes como suelos desérticos y lagos [171]. Los bajos porcentajes de *reads* clasificados suelen estar vinculados, por un lado, a que muchos *reads* pueden no ser útiles para determinar un nivel taxonómico por no poseer suficiente información para discernirlo, y por otro, a lo poco explorado de ciertos ambientes, como es el caso de muestras

provenientes de ambientes extremos. Las bases de datos que se construyen y utilizan para muchos clasificadores dependen de lo ya conocido e incorporado a ellas. Ambientes más explorados, como el microbioma humano, y microorganismos más conocidos como patógenos humanos y animales, u organismos modelo, suelen aportar mayor cantidad de secuencias y por tanto información a estas bases de datos. Esto también se traduce en que a medida que se analiza a niveles taxonómicos inferiores se va perdiendo la capacidad de realizar la asignación taxonómica, es decir, puede que se llegue a determinar el filo al que pertenece, pero no el género, ya que no hay suficiente información de esos organismos específicos en las bases de datos (genomas de referencia). Como se observa en la **Figura 18**, entre un 66% y 78 % de los reads no pudieron ser asignados a ningún género, resultado que condice con la escasa información que se dispone de la microbiota asociada a rocas. En la medida que se sigan aportando a las bases de datos genomas de cepas aisladas de ambientes no tan convencionales y genomas reconstruidos a partir de metagenomas, es esperable que se logren mejorar los sistemas de clasificación.

Las rocas analizadas, independientemente del asignador taxonómico, mostraron estar ampliamente dominadas por el dominio Bacteria, seguido en menor medida por Eukarya. Es de destacar la baja representatividad de *reads* provenientes de genomas eucariotas, tendiendo en cuenta el mayor tamaño que representan comparativamente al de las bacterias. Ese resultado refuerza aún más la alta representatividad de las bacterias en la comunidad litobiótica. Si bien no se estudió en profundidad, la presencia de organismos eucariotas, podría deberse a la presencia del componente micobionte de los líquenes que suelen colonizar frecuentemente las rocas de la Antártida marítima (ver **Introducción general**). Los filos detectados principalmente fueron Ascomycota, en amplia medida, y Basidiomycota, en menor medida (**Figura suplementaria 3** y **Figura suplementaria 4, Anexo**). Cabe destacar que las Archaeas y los Virus comparativamente no contribuyeron significativamente a la estructura y diversidad de la comunidad litobiótica estudiada, lo que está en concordancia con estudios previos [35, 36].

Dado que el interés de este trabajo estaba focalizado en clasificación taxonómica y funcional de la comunidad bacteriana presente en las muestras de roca, se continuó trabajando con las secuencias asignadas al dominio Bacteria. Interesantemente, a pesar de las diferencias entre los algoritmos detrás de ambos programas empleados y la cantidad de *reads* clasificados inicialmente por cada uno, se obtuvieron resultados similares en lo que respecta a la identificación a nivel de filo. Se ha reportado que Kraken es menos sensible que Kaiju para la asignación taxonómica [171], es decir, que Kraken es capaz de clasificar menos que Kaiju. Los resultados aquí presentados concuerdan con estos reportes ya que con Kaiju se lograron clasificar un 38% de los *reads* del metagenoma V6 y un 34% de los de V7,

mientras que con Kraken sólo se clasificó un 1% de los *reads* de partida de cada muestra. Sin embargo, en cuanto a la precisión, al menos a nivel de filo, resultaron ser bastante consistentes entre ambos. En base a estos resultados podemos concluir que cualquiera de los dos programas son una buena opción al momento de realizar la asignación taxonómica de este tipo de muestras. Otros clasificadores como el frecuentemente utilizado MetaPhlAn [178], no serían apropiados ya que utilizan marcadores clado-específicos basados en genomas de referencia disponibles lo cual no es suficiente para clasificar organismos poco conocidos.

Los filos predominantes hallados por metagenómica en ambas rocas resultaron ser Actinobacteria y Proteobacteria (**Figura 17**). Esto concuerda con los resultados obtenidos del análisis de la diversidad de la colección de bacterias cultivables (**Figura 7**). Mediante la aproximación metagenómica, se lograron detectar filos que no pudieron ser recuperados mediante la aproximación dependiente de cultivo como Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Planctomycetes y Verrucomicrobia. Esto podría deberse a la baja proporción en la que se encuentran dentro de la comunidad, es decir, que el número de aislamientos recuperados y seleccionados para generar la colección haya sido muy bajo como para detectar algún miembro de estos filos. Otra posible explicación sería el sesgo introducido al momento de la selección de los aislamientos de la colección, ya sea por el criterio utilizado (fenotipo de colonia) o por los medios de cultivo utilizados que pudieran estar favoreciendo el desarrollo de determinados grupos taxonómicos. No se puede dejar de lado tampoco el hecho de que la proporción de organismos que potencialmente puede ser recuperada mediante técnicas dependientes de cultivo corresponde a un porcentaje muy pequeño de la diversidad total de una comunidad, como se mencionó anteriormente. Esto hace que esta aproximación independiente de cultivo sea más abarcativa y representativa de la diversidad real, y que efectivamente logre identificar bacterias pertenecientes a filos típicamente no cultivables. Cabe agregar que, en el caso particular de Cyanobacteria su baja abundancia podría explicarse por las características propias de la comunidad litobiótica analizada, es decir, al tipo de roca, su ubicación geográfica (Antártida marítima vs. Antártida continental), y el vínculo que esto tiene con que haya un predominio de Cyanobacterias o de líquenes [56].

Respecto a la composición taxonómica de las comunidades de ambas rocas a nivel de género, no se observó ningún patrón en particular entre aproximaciones (cultivables vs. metagenómica), ni entre los programas utilizados para la asignación taxonómica de los *reads* (**Figura 19**). Esto puede ser explicado en parte debido a que los porcentajes de *reads* provenientes de ambos metagenomas que lograron ser clasificados a nivel de género fueron bastante bajos (entre un 22% y 34%). Esto significa que se está perdiendo una gran cantidad de información en cuanto a la composición de la comunidad,

lo que habla de la baja sensibilidad de la técnica y/o de los programas para discernir a nivel de género. Sin embargo, considerando únicamente los *reads* clasificados se logró determinar la presencia de algunos géneros bacterianos que fueron detectados únicamente por esta técnica (**Figura 19**), lo que resalta la importancia de utilizar distintas aproximaciones a la vez. A nivel de género, para estudios de diversidad, se ha reportado que la estrategia más indicada es la *amplicon sequencing* de 16S rRNA [161]. En ese mismo estudio, se compararon los resultados de los análisis de la diversidad bacteriana obtenidos por 16S *amplicon sequencing* vs. *shotgun sequencing* de 49 muestras ambientales, encontrándose una baja correlación entre ambos métodos, a pesar de cierto «solapamiento». En concreto, el *amplicon sequencing* resultó ser más robusto y consistente (entre réplicas y muestras similares) y obtuvo un mejor desempeño logrando discernir la identidad a niveles taxonómicos más bajos: se vieron representadas un gran número de familias que por *shotgun* no fueron detectadas. Esta diferencia es explicada en parte por el hecho de que el *amplicon sequencing* se dirige específicamente a un gen marcador taxonómico y toda la información que da es de ese gen, por lo que no hay pérdida en información que no es útil para el fin cómo sí ocurre en el caso del *shotgun sequencing*. Por otra parte, cabe destacar que las bases de datos de 16S rRNA (por ej.: RDP, SILVA, Greengenes) se han generado hace ya varios años, son extensas, abarcan una gran cantidad de organismos y están bien curadas, mientras que las bases de datos genómicas son menos extensas y están limitadas a los organismos con genomas completos secuenciados. Si bien esto no suele ser un mayor inconveniente para ambientes bien caracterizados como la microbiota humana, de los cuales se ha obtenido un gran número de genomas completos, sí constituye un problema para las secuencias provenientes de ambientes complejos, de donde no se tienen muchos genomas o donde los *reads* mapean con especies desconocidas. Cabe destacar que la falta de definición o discernimiento no se debe a una falta en el esfuerzo de muestreo o en la cobertura de la secuenciación ya que, tanto en el artículo en cuestión como en el presente trabajo, las curvas de acumulación de especies (rarefacción) alcanzan a la asíntota horizontal (convergen) (**Figura suplementaria 2, Anexo**). De todos modos, otros autores discuten que la elección entre una u otra aproximación va a depender de la naturaleza del estudio que se quiera desarrollar. Si bien el 16S *amplicon sequencing* es adecuado para el análisis de una gran cantidad de muestras y permite acceder a una enorme diversidad bacteriana, ya sea medida como unidades taxonómicas operacionales (OTUs) o como variantes de secuencia de amplicón (ASVs), además de ser una técnica relativamente barata, posee ciertos sesgos a tener en cuenta. Debido a que es necesario un paso previo de PCR, al usar determinados *primers*, aún siendo considerados universales, se van a generar sesgos hacia la recuperación de determinados organismos. Por otro lado, esta aproximación tampoco permite el estudio en paralelo de otro tipo de microorganismos (virus, archaeas, eucariotas), como sí ocurre al recurrir al *shotgun sequencing*. Asimismo, más allá de cierta

asociación que se pueda determinar mediante *16S amplicon sequencing* en cuanto a los organismos presentes y qué funciones pueden estar desempeñando en el ambiente en estudio, la metagenómica *shotgun* es capaz de aportar más información (por el hecho de que se secuencian todo el ADN metagenómico) para un análisis más exhaustivo en cuanto a la diversidad funcional [179]. En el presente trabajo, se consideró realizar *16S amplicon sequencing*, pero fue descartado debido a la baja cantidad de ADN metagenómico obtenido (y la dificultad para obtenerlo), que permitiera cierta robustez en cuanto al número de réplicas. Por tanto, se prefirió realizar la secuenciación masiva de ADN metagenómico que se había logrado recuperar. Además, esta aproximación tiene la ventaja de aportar información acerca del metabolismo de metales, otro de los objetivos de la tesis.

Para conocer las distintas funciones celulares y vías metabólicas presentes en ambos metagenomas, se sometieron los *contigs* obtenidos al servidor *online* del MG-RAST, y se compararon contra varias de las bases de datos disponibles. Cabe mencionar que se filtraron las secuencias de acuerdo al dominio al que pertenecían, de manera de enfocarse únicamente en la diversidad funcional de Bacterias. Se observó una mayor proporción de genes vinculados a la síntesis de componentes de la pared celular de bacterias Gram negativas en la muestra V6, resultado que concuerda con la identificación de mayor abundancia de bacterias Gram negativas en esa muestra. Interesantemente, también hubo en esta misma muestra una relación directa entre una mayor abundancia del filo Cyanobacteria y una mayor proporción de genes vinculados a la fotosíntesis.

En cuanto a las funciones vinculadas al metabolismo de metales, y en particular a la detoxificación, se detectaron genes involucrados en distintos mecanismos de tolerancia. En ambas muestras el principal mecanismo de detoxificación resultó ser el de transporte de eflujo, algo que ya ha sido determinado en estudios anteriores, por ser el tipo de mecanismo más distribuido en procariotas [51, 180]. Entre ellos, se encontraron algunos genes previamente detectados mediante PCR en aislamientos bacterianos tolerantes a metales provenientes también de la Isla Rey Jorge, como *arsB*, *czcA*, *czcD* y *copA*, los cuales confieren resistencia a As, Co, Zn, Cd y Cu, respectivamente, y suelen ser los más comúnmente identificados en genomas microbianos [48]. Al analizar los genes de tolerancia para cada metal por separado se encontró que los mecanismos vinculados a la tolerancia al Cu fueron los más representados en ambos metagenomas, seguidos por los relacionados al Te, Ag, Cr, As y Se. Si bien las concentraciones de Cu presentes en las muestras de rocas analizadas fueron del orden de 30 ppm, al comparar estos valores con los reportados en el trabajo de Romaniuk *et al.* [48] podemos concluir que las rocas antárticas utilizadas en este trabajo no son muestras particularmente enriquecidas en Cu. Por otro lado, al comparar los genes presentes en los dos metagenomas se encontró una mayor proporción vinculados a la tolerancia al As, Hg, Sb y Zn en la muestra V7, y al Ni y el Te (y en menor

medida al Co, Cr y Se) en V6. Si bien se podría esperar encontrar alguna correlación entre las abundancias de los distintos metales en las muestras de roca, y la proporción de genes de tolerancia encontrados, en base a la presión selectiva que pueda estar existiendo, no resulta del todo sorprendente que no se haya visto. El análisis geoquímico mediante ICP-MS realiza un análisis elemental, que no toma en cuenta en qué forma se encuentra el metal (estado de oxidación, si está conformando parte de algún mineral, etc.) ni qué tan biodisponible está, por lo que no se puede saber a qué concentración está efectivamente enfrentada la bacteria. En esta misma línea, tampoco en el trabajo de Romaniuk *et al.* [48] lograron establecer un vínculo entre las concentraciones de metales pesados en suelos y los genes de tolerancia a metales encontrados en cepas cultivables. Si bien tomaron en cuenta unos pocos genes, en comparación con todos los que potencialmente se pueden detectar mediante metagenómica, y las bacterias estudiadas estuvieron acotadas a las que pudieron aislar y cultivar, no encontraron una correlación entre los fenotipos de tolerancia a metales y los genes detectados [48]. Esto podría deberse a: a) el encontrar determinado gen no implica que se esté expresando; para verificarlo deberían realizarse otros experimentos, tales como un análisis transcriptómico; b) puede suceder que el gen de tolerancia no sea activo debido a una mutación o a una incongruencia genética que tenga como resultado de que el gen funcione únicamente en determinados hospederos [122]; c) la existencia de mecanismos no específicos tales como las alteraciones de la envoltura celular o la formación de biofilms que logran captar y retrasar la difusión de los metales al interior de las células [86]; d) la posibilidad de que se esté frente a mecanismos no conocidos, algo que no es posible comprobar mediante secuenciación y análisis de secuencias; e) es de esperarse también que se encuentren genes de tolerancia que en cierto contexto estén presentes para detoxificar un determinado metal, pero que además sirvan para detoxificar otros metales (por ejemplo, bombas de eflujo que participan en la detoxificación de diferentes metales); y por último f) pueden existir sistemas en los que participan diferentes proteínas haciendo que haya un «mayor número de genes» involucrados en la detoxificación para ese metal (varios genes para un solo mecanismo).

En resumen, gran parte de los *reads* no se pudieron asignar debido a lo novedoso del ambiente y de lo poco que se conoce acerca de estos, por lo que no es posible obtener datos representativos de la diversidad taxonómica o funcional. Sin embargo, estos resultados generan una primera aproximación para conocer qué géneros están presentes en estas comunidades y a algunas de las posibles funciones que estarían presentes.

Discusión general y conclusiones finales

Estudios previos indican la participación de la microbiota litobiótica en la disolución de sustratos rocosos, solubilización de metales, desgaste del contenido mineral y su contribución a la formación de nuevos compuestos minerales del sustrato rocoso [3, 15], sin embargo, es muy poco lo que se sabe sobre las comunidades litobióticas en general. En esta tesis, nos planteamos como objetivo general estudiar las comunidades bacterianas presentes en dos muestras de rocas antárticas colectadas en la Península Fildes, de la isla Rey Jorge. En particular, el estudio se dirigió a conocer la diversidad bacteriana y los posibles sistemas involucrados en la homeostasis de metales, presentes en esas muestras, empleando dos enfoques distintos: por un lado, el estudio de bacterias cultivables y, por el otro, la secuenciación masiva del ADN metagenómico y el análisis bioinformático correspondiente. Asimismo, se buscó explorar una posible aplicación biotecnológica vinculada al metabolismo de metales.

Las muestras de roca, denominadas V6 y V7, fueron identificadas como una dacita y un basalto traquiandesítico, respectivamente [61]; ambas de origen volcánico. Para el procesamiento de las muestras, no se discriminaron los diferentes nichos litobióticos posibles, sino que se maceró el total de la muestra. Las bacterias cultivables heterótrofas aisladas y el ADN metagenómico obtenido, provienen por consiguiente de la comunidad litobiótica total y no sólo de la comunidad endolítica.

En el **Capítulo I** se presentan los resultados obtenidos a partir del aislamiento y análisis de las bacterias cultivables. Si bien la utilización de un determinado medio de cultivo supone un sesgo en qué microorganismos son capaces de crecer en las condiciones elegidas, sigue siendo una aproximación válida para el estudio de los microorganismos ya que el poder cultivarlos en condiciones de laboratorio supone una gran ventaja para estudiar su fisiología y para el desarrollo de posibles aplicaciones biotecnológicas. Al comparar la cantidad de UFCs obtenidas en medio R2A en relación a las obtenidas en medio R2A suplementado con sales de metales (**Tabla 1**), se obtuvo un mayor número en el primer caso, dado que no todos los aislamientos son capaces de tolerar la presencia de metales. Se generó una colección de 84 bacterias litobióticas, incluyendo representantes de los diferentes fenotipos observados. Los aislamientos obtenidos fueron posteriormente identificados a nivel de género mediante el análisis del gen 16S rRNA y analizados para determinar su fenotipo de tolerancia a distintos metales. Se observó que más del 75% de los aislamientos exhibió algún grado de tolerancia a los metales ensayados, destacándose en varias de estas cepas el fenómeno de multitolerancia (**Figura 8 y Anexo**), como se discutirá más adelante.

Cabe resaltar que actualmente se encuentran en proceso de secuenciación y anotación, los genomas de 60 aislamientos de la colección como parte de un proyecto conjunto con el *Joint Genome Institute*, EEUU. La secuenciación de los genomas completos de estas bacterias no sólo podría proporcionar más información acerca de estos aislamientos en particular, y vincular su fenotipo con los genes identificados, sino que también permitirá aportar información para nutrir las bases de datos públicas con datos provenientes de este ambiente tan poco explorado.

La colección de aislamientos litobióticos antárticos generada supone a futuro un interesante insumo de diversidad genética y funcional a explorar, tanto para el estudio de la fisiología de organismos tan únicos y su adaptación a un ambiente extremo, como para las aplicaciones biotecnológicas que se propongan realizar a partir de ellos.

En esta dirección, los resultados presentados en el **Capítulo II** sugieren el potencial de varias cepas de la colección, de producir nanopartículas metálicas en respuesta a la presencia de cadmio. En particular, empleando una de estas cepas (la cepa *Pedobacter* sp. UYP1) se logró desarrollar un protocolo de biosíntesis de QDs de CdS a partir de CdCl₂ y Cys. Los QDs producidos fueron extraídos, purificados y posteriormente caracterizados mediante técnicas espectroscópicas, análisis de DLS, HR-TEM y EDX. Al evaluar su potencial uso como material fotosensibilizador en la construcción de celdas solares, se obtuvo conducción de electrones a través de las celdas, siendo los parámetros fotovoltaicos de orden similar a lo reportado en otros estudios empleando celdas solares sensibilizadas con QDs biosintetizados por microorganismos [142, 155, 181]. Si bien estos resultados son promisorios, será necesario optimizar todo el sistema de manera de obtener valores más cercanos a los que poseen las celdas de otros materiales que son utilizadas comercialmente. La capacidad de producir NPs por parte de una cepa litobiótica demuestra, asimismo, la presencia de este tipo de mecanismos empleados en la detoxificación de metales en bacterias que colonizan rocas y refuerza el potencial de las bacterias litobióticas antárticas para ser utilizadas en aplicaciones biotecnológicas. Cabe resaltar también que la capacidad de biosintetizar NPs por parte del género *Pedobacter* no había sido reportada previamente, lo que habla de la importancia de seguir explorando los ambientes del continente antártico.

Teniendo en cuenta el sesgo inherente al análisis de técnicas dependientes del cultivo para estudiar la diversidad microbiana, se decidió implementar una estrategia basada en la extracción y análisis del metagenoma litobiótico. Debido a la baja biomasa microbiana y las características fisicoquímicas de los sustratos rocosos, la puesta a punto de una técnica para obtener el ADN metagenómico fue todo un desafío. Sin embargo, tras varias aproximaciones, se logró obtener ADN metagenómico de calidad y cantidad suficiente para su secuenciación, pero no así para la construcción de metagenotecas

funcionales (**Capítulo III**). Al integrar la información obtenida del análisis de bacterias cultivables y de la secuenciación «shotgun», se encontraron tanto coincidencias como diferencias. Tanto la identificación de bacterias cultivables mediante secuenciación y análisis del 16S rRNA, como la asignación taxonómica de los *reads* de los metagenomas, revelaron el predominio de los filos Actinobacteria y Proteobacteria, en ambas muestras. Sin embargo, la aproximación metagenómica también reveló la presencia de otros filos bacterianos no detectados en la colección de cultivables, como Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Planctomycetes y Verrucomicrobia. Esta diferencia podría explicarse a que los aislamientos se realizaron en un solo medio de cultivo y en determinadas condiciones (temperatura, presencia de oxígeno, etc.) y debido al sesgo introducido al seleccionar las colonias según un fenotipo, lo que favorece que sea posible detectar determinados grupos de organismos de la comunidad capaces de desarrollarse en esas condiciones, y en determinado tiempo. O puede ser también que las bacterias pertenecientes a los filos detectados únicamente mediante metagenómica se encuentren en baja abundancia, y el número de aislamientos seleccionados para la colección no haya sido suficiente para recuperarlos. De todos modos, es sabido que la metagenómica permite acceder a la fracción no cultivable de la microbiota, la cual engloba mayor cantidad de microorganismos [156, 157], por lo que muy probablemente radique allí la explicación en cuanto a las mayores diferencias entre ambas estrategias empleadas.

La metagenómica basada en secuencia (en conjunto con los asignadores taxonómicos y bases de datos apropiadas), también permitió conocer la diversidad litobiótica antártica en cuanto a otros dominios y a los virus. Se pudo observar entonces que Bacteria domina estas comunidades pero que también existe una interesante abundancia de Eukarya, muy probablemente como consecuencia de la presencia del componente micobionte de los líquenes que se encuentran en las rocas de la Antártida marítima. Por último, cabe agregar que, como ya ha sido reportado para otros tipos de rocas antárticas, ni las Archaeas ni los Virus representaron una fracción significativa de este tipo de comunidades microbianas, lo que no quita la importancia del rol que podrían llegar a estar teniendo, algo que no ha sido muy estudiado hasta el momento [35, 36]. La asignación taxonómica a nivel de género resultó ser más robusta para las cultivables ya que en la mayoría de los aislamientos se logró identificar a ese nivel, con excepción de algunos aislamientos con porcentajes de identidad de secuencia relativamente bajo con cepas conocidas, lo que podría significar estar ante la presencia de nuevos géneros bacterianos dentro de la colección. Si bien la metagenómica permite acceder a una diversidad mayor, y de hecho se encontraron géneros no detectados en la colección de cultivables, hasta el momento, a nivel de género la relación no es tan lineal. En ambas muestras y con ambos programas utilizados para la asignación taxonómica de *reads* sólo se logró asignar género a entre un 22 y 35% de los *reads* bacterianos, lo que se corresponde con una baja sensibilidad la técnica y/o de

los programas para discernir a este nivel. Esto se puede explicar por las bases de datos empleadas por los asignadores, las cuales se encuentran sesgadas hacia lo más conocido, en cuanto a tipo de ambiente y de microorganismos, a que se nutren de la información de genomas completos de las bacterias más comúnmente recuperadas y pertenecientes a ambientes mejor caracterizados [161].

Al comparar lo obtenido a través de las dos estrategias en lo que tiene que ver con el metabolismo de metales, se encontraron principalmente coincidencias o posibles explicaciones entre lo observado por una y lo encontrado en la otra. El estudio de la tolerancia a metales en las bacterias cultivables de la colección, mostró que el 75% los aislamientos presentaban un fenotipo de resistencia hacia al menos uno de los metales ensayados (Ag, Cd, Co, Cu, Mn, Ni o Zn), mientras que aproximadamente la mitad de los aislamientos resultaron ser multi-tolerantes, es decir, capaces de tolerar 2 o más metales. El aislamiento más interesante en este sentido resultó ser la cepa *Pedobacter* sp. UYP1, la cual presentó un perfil de tolerancia a cinco metales (Ag, Cd, Cu, Mn y Zn). Si bien no se pudieron establecer los mecanismos detrás de este fenómeno, con la información obtenida a partir de los metagenomas se pudo apreciar que, dentro de la comunidad bacteriana, los mecanismos más representados que podrían estar explicándolo serían los mecanismos de transporte de eflujo, los cuales además suelen «lidiar» con distintos metales a la vez. Otra explicación factible podría darse a través de los mecanismos inespecíficos como la formación de *biofilms* y los cambios en la envoltura celular. Sin embargo, para comprobar que estos sistemas están efectivamente implicados en los fenotipos de tolerancia a metales observados, deberían realizarse otros experimentos tales como ensayos de formación de *biofilms* con las bacterias cultivables, y la búsqueda de posibles genes implicados en estos mecanismos en los genomas de estas cepas, así como en los metagenomas en general.

En suma, la utilización de distintas aproximaciones permitió complementar e integrar lo obtenido por separado por cada una, sopesando sus correspondientes sesgos y ventajas, llegando de esta forma a cumplir con el objetivo de conocer un poco más acerca de las comunidades litobióticas de la Antártida marítima.

Referencias

- [1] S. Golubic, E. I. Friedmann, and J. Schneider, "The Lithobiontic Ecological Niche, with Special Reference to Microorganisms," *SEPM Journal of Sedimentary Research*, vol. Vol. 51, no. 2, pp. 475–478, Jun. 1981, doi: 10.1306/212F7CB6-2B24-11D7-8648000102C1865D.
- [2] O. Guillitte, "Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies," *Science of The Total Environment*, vol. 167, no. 1–3, pp. 215–220, May 1995, doi: 10.1016/0048-9697(95)04582-L.
- [3] Th. Warscheid and J. Braams, "Biodeterioration of stone: a review," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 46, no. 4, pp. 343–368, Dec. 2000, doi: 10.1016/S0964-8305(00)00109-8.
- [4] J. Wierzchos, A. de los Ríos, and C. Ascaso, "Microorganisms in desert rocks: the edge of life on Earth.," *Int Microbiol*, vol. 15, no. 4, pp. 173–83, Dec. 2012, Accessed: Jan. 18, 2015. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844476>
- [5] L. Diels, "Die Algen-Vegetation der Sudtiroler Dolomitriffe," *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.*, vol. 32, pp. 502–526, 1914.
- [6] "5. E. Bachmann: Kalklösende Algen," *Ber Dtsch Bot Ges*, vol. 33, no. 1, pp. 45–57, Feb. 1915, doi: 10.1111/J.1438-8677.1915.TB07029.X.
- [7] A. Ercegović, "La végétation des lithophytes sur les calcaires et les dolomites en Croatie," *Acta Botanica Croatica*, vol. 1, pp. 64–114, 1925.
- [8] R. Chodat, "Sur les algues perforantes d'eau douce," *Bulletin de l'Herbier Boissier*, vol. 6, pp. 431–476, 1898.
- [9] J. E. Warme, "Borings As Trace Fossils, and the Processes of Marine Bioerosion," in *The Study of Trace Fossils*, Springer Berlin Heidelberg, 1975, pp. 181–227. doi: 10.1007/978-3-642-65923-2_11.
- [10] I. Friedmann, Y. Lipkin, and R. Ocampo-Paus, "Desert Algae of the Negev (Israel)," *Phycologia*, vol. 6, no. 4, pp. 185–200, Dec. 1967, doi: 10.2216/i0031-8884-6-4-185.1.
- [11] S. Golubic, R. D. Perkins, and K. J. Lukas, "Boring Microorganisms and Microborings in Carbonate Substrates," in *The Study of Trace Fossils*, Springer Berlin Heidelberg, 1975, pp. 229–259. doi: 10.1007/978-3-642-65923-2_12.
- [12] J. Marlow, J. Peckmann, and V. Orphan, "Autoendoliths: a distinct type of rock-hosted microbial life," *Geobiology*, vol. 13, no. 4, pp. 303–307, Jul. 2015, doi: 10.1111/gbi.12131.
- [13] I. Glaub, S. Golubic, M. Gektidis, G. Radtke, and K. Vogel, "Microborings and Microbial Endoliths: Geological Implications," in *Trace Fossils*, Elsevier, 2007, pp. 368–381. doi: 10.1016/B978-044452949-7/50147-9.
- [14] J. J. Walker and N. R. Pace, "Endolithic microbial ecosystems.," *Annu Rev Microbiol*, vol. 61, pp. 331–47, Jan. 2007, doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093302.

- [15] A. de los Ríos, J. Wierzchos, L. G. Sancho, and C. Ascaso, "Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 50, no. 3, pp. 143–152, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.femsec.2004.06.010.
- [16] C. Ascaso and J. Wierzchos, "The search for biomarkers and microbial fossils in antarctic rock microhabitats," *Geomicrobiology Journal*, vol. 20, no. 5, pp. 439–450, 2003, doi: 10.1080/713851127.
- [17] J. Wierzchos, L. G. Sancho, and C. Ascaso, "Biomineralization of endolithic microbes in rocks from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica: Implications for microbial fossil formation and their detection," *Environmental Microbiology*, vol. 7, no. 4, pp. 566–575, Apr. 2005, doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00725.x.
- [18] E. I. Friedmann and R. Ocampo-Friedmann, "The Antarctic cryptoendolithic ecosystem: relevance to exobiology.," *Orig Life*, vol. 14, no. 1–4, pp. 771–6, Jan. 1984.
- [19] E. I. Friedmann, "Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert," *Science (1979)*, vol. 215, no. 4536, pp. 1045–1053, Feb. 1982, doi: 10.1126/science.215.4536.1045.
- [20] J. Wierzchos, M. C. Casero, O. Artieda, and C. Ascaso, "Endolithic microbial habitats as refuges for life in polyextreme environment of the Atacama Desert," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 43, pp. 124–131, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.mib.2018.01.003.
- [21] B. P. Journal and P. A. Broady, "The ecology of sublithic terrestrial algae at the Vestfold Hills, Antarctica," <http://dx.doi.org/10.1080/00071618100650241>, vol. 16, no. 3, pp. 231–240, Sep. 2007, doi: 10.1080/00071618100650241.
- [22] E. I. Friedmann, "Endolithic microbial life in hot and cold deserts.," *Orig Life*, vol. 10, no. 3, pp. 223–35, Sep. 1980.
- [23] J. Siebert and P. Hirsch, "Characterization of 15 selected coccal bacteria isolated from antarctic rock and soil samples from the McMurdo-Dry Valleys (South-Victoria Land)," *Polar Biology*, vol. 9, no. 1, pp. 37–44, Oct. 1988, doi: 10.1007/BF00441762.
- [24] A. De Los Ríos, J. Wierzchos, and C. Ascaso, "The lithic microbial ecosystems of Antarctica's McMurdo Dry Valleys," *Antarctic Science*, vol. 25, no. 4, pp. 459–477, 2014, doi: 10.1017/S0954102014000194.
- [25] M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. (Daniel H. Buckley, W. M. Sattley, and D. A. Stahl, *Brock biology of microorganisms*.
- [26] F. Piette, S. D'Amico, G. Mazzucchelli, A. Danchin, P. Leprince, and G. Feller, "Life in the cold: a proteomic study of cold-repressed proteins in the antarctic bacterium pseudoalteromonas haloplanktis TAC125.," *Appl Environ Microbiol*, vol. 77, no. 11, pp. 3881–3, Jun. 2011, doi: 10.1128/AEM.02757-10.
- [27] E. I. Friedmann and R. Ocampo-Friedmann, "Endolithic microorganisms in extreme dry environments: analysis of a lithobiontic microbial habitat.," pp. 177–185, Jan. 1984.

- [28] E. I. Friedmann, L. Kappen, M. A. Meyer, and J. A. Nienow, "Long-term productivity in the cryptoendolithic microbial community of the Ross Desert, Antarctica," *Microbial Ecology*, vol. 25, no. 1, pp. 51–69, Jan. 1993, doi: 10.1007/BF00182129.
- [29] M. Dieser, M. Greenwood, and C. M. Foreman, "Carotenoid Pigmentation in Antarctic Heterotrophic Bacteria as a Strategy to Withstand Environmental Stresses," *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, vol. 42, no. 4, pp. 396–405, Nov. 2010, doi: 10.1657/1938-4246-42.4.396.
- [30] N. Órdenes-Aenishanslins, G. Anziani-Ostuni, M. Vargas-Reyes, J. Alarcón, A. Tello, and J. M. Pérez-Donoso, "Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in Dye Sensitized Solar Cells," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 162, pp. 707–714, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.004.
- [31] J. J. Marizcurrena, M. A. Morel, V. Braña, D. Morales, W. Martinez-López, and S. Castro-Sowinski, "Searching for novel photolyases in UVC-resistant Antarctic bacteria," *Extremophiles*, vol. 21, no. 2, pp. 409–418, Mar. 2017, doi: 10.1007/s00792-016-0914-y.
- [32] T.-S. (Sean) Wei, "Functional Diversity of Microbial Communities in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica," 2016.
- [33] E. I. Friedmann and R. Ocampo, "Endolithic blue-green algae in the dry valleys: primary producers in the antarctic desert ecosystem.," *Science*, vol. 193, no. 4259, pp. 1247–9, Sep. 1976, doi: 10.1126/science.193.4259.1247.
- [34] P. A. Broady, "The ecology of chasmolithic algae at coastal locations of Antarctica," *Phycologia*, vol. 20, no. 3, pp. 259–272, Sep. 1981, doi: 10.2216/i0031-8884-20-3-259.1.
- [35] S. B. Pointing, Y. Chan, D. C. Lacap, M. C. Y. Lau, J. A. Jurgens, and R. L. Farrell, "Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 47, pp. 19964–19969, Nov. 2009, doi: 10.1073/pnas.0908274106.
- [36] J. Goordial *et al.*, "Comparative activity and functional ecology of permafrost soils and lithic niches in a hyper-arid polar desert," *Environmental Microbiology*, vol. 19, no. 2, pp. 443–458, Feb. 2017, doi: 10.1111/1462-2920.13353.
- [37] C. K. Lee, B. A. Barbier, E. M. Bottos, I. R. McDonald, and S. C. Cary, "The inter-valley soil comparative survey: The ecology of dry valley edaphic microbial communities," *ISME Journal*, vol. 6, no. 5, pp. 1046–1057, May 2012, doi: 10.1038/ismej.2011.170.
- [38] T. P. Makhalanyane, S. B. Pointing, and D. A. Cowan, "Lithobionts: Cryptic and refuge niches," in *Antarctic Terrestrial Microbiology: Physical and Biological Properties of Antarctic Soils*, vol. 9783642452130, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014, pp. 163–179. doi: 10.1007/978-3-642-45213-0_9.
- [39] S. B. Pointing and J. Belnap, "Microbial colonization and controls in dryland systems.," *Nat Rev Microbiol*, vol. 10, no. 8, pp. 551–62, Aug. 2012, doi: 10.1038/nrmicro2831.

- [40] P. A. Broady, "Ecological and taxonomic observations on subaerial epilithic algae from Princess Elizabeth Land and Mac. Robertson Land, Antarctica," *British Phycological Journal*, vol. 16, no. 3, pp. 257–266, Sep. 1981, doi: 10.1080/00071618100650271.
- [41] D. A. Cowan, N. Khan, S. B. Pointing, and S. C. Cary, "Diverse hypolithic refuge communities in the McMurdo Dry Valleys," *Antarctic Science*, vol. 22, no. 6, pp. 714–720, Dec. 2010, doi: 10.1017/S0954102010000507.
- [42] Y. Chan, J. D. van Nostrand, J. Zhou, S. B. Pointing, and R. L. Farrell, "Functional ecology of an Antarctic Dry Valley.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 22, pp. 8990–5, May 2013, doi: 10.1073/pnas.1300643110.
- [43] M. W. Van Goethem, T. P. Makhalanyane, A. Valverde, S. C. Cary, and D. A. Cowan, "Characterization of bacterial communities in lithobionts and soil niches from Victoria Valley, Antarctica," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 92, no. 4, pp. 1–22, Mar. 2016, doi: 10.1093/femsec/fiw051.
- [44] J. R. de la Torre, B. M. Goebel, E. I. Friedmann, and N. R. Pace, "Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica.," *Appl Environ Microbiol*, vol. 69, no. 7, pp. 3858–67, Jul. 2003.
- [45] I. R. Santos, E. V. Silva-Filho, C. E. G. R. Schaefer, M. R. Albuquerque-Filho, and L. S. Campos, "Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island," *Marine Pollution Bulletin*, vol. 50, no. 2, pp. 185–194, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.10.009.
- [46] B. Dold *et al.*, "Acid rock drainage and rock weathering in antarctica: Important sources for iron cycling in the southern ocean," *Environmental Science and Technology*, vol. 47, no. 12, pp. 6129–6136, Jun. 2013, doi: 10.1021/es305141b.
- [47] G. M. Gadd, "Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation.," *Microbiology (Reading)*, vol. 156, no. Pt 3, pp. 609–43, Mar. 2010, doi: 10.1099/mic.0.037143-0.
- [48] K. Romaniuk *et al.*, "Insight into heavy metal resistome of soil psychrotolerant bacteria originating from King George Island (Antarctica)," *Polar Biology*, vol. 41, no. 7, pp. 1319–1333, Jul. 2018, doi: 10.1007/s00300-018-2287-4.
- [49] O. Cunrath, V. A. Geoffroy, and I. J. Schalk, "Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores.," *Environ Microbiol*, Jul. 2015, doi: 10.1111/1462-2920.12971.
- [50] P. Chandrangsu, C. Rensing, and J. D. Helmann, "Metal homeostasis and resistance in bacteria," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 15, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 338–350, Jun. 01, 2017. doi: 10.1038/nrmicro.2017.15.
- [51] D. H. Nies, "Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 27, no. 2–3. Elsevier, pp. 313–339, Jun. 01, 2003. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00048-2.

- [52] S. Silver and L. T. Phung, "A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions," in *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Dec. 2005, vol. 32, no. 11–12, pp. 587–605. doi: 10.1007/s10295-005-0019-6.
- [53] J. Ali, N. Ali, L. Wang, H. Waseem, and G. Pan, "Revisiting the mechanistic pathways for bacterial mediated synthesis of noble metal nanoparticles," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 159. Elsevier B.V., pp. 18–25, Apr. 01, 2019. doi: 10.1016/j.mimet.2019.02.010.
- [54] C. A. Blindauer, "Bacterial metallothioneins: Past, present, and questions for the future," *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 16, no. 7. pp. 1011–1024, Oct. 2011. doi: 10.1007/s00775-011-0790-y.
- [55] A. D. Rogers, "Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: A molecular perspective," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 362, no. 1488, pp. 2191–2214, Dec. 2007, doi: 10.1098/rstb.2006.1948.
- [56] V. Amarelle, V. Carrasco, and E. Fabiano, "The Hidden Life of Antarctic Rocks," Springer, Cham, 2019, pp. 221–237. doi: 10.1007/978-3-030-02786-5_10.
- [57] C. Ascaso, L. G. Sancho, and C. Rodriguez-Pascual, "The weathering action of saxicolous lichens in maritime Antarctica," *Polar Biology*, vol. 11, no. 1, pp. 33–39, Dec. 1990, doi: 10.1007/BF00236519.
- [58] W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane, "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.," *J Bacteriol*, vol. 173, no. 2, pp. 697–703, Jan. 1991.
- [59] S. H. Yoon *et al.*, "Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 67, no. 5, pp. 1613–1617, May 2017, doi: 10.1099/ijsem.0.001755.
- [60] K. G. Cox, J. D. Bell, and R. J. Pankhurst, *The Interpretation of Igneous Rocks*. Springer Netherlands, 1979. doi: 10.1007/978-94-017-3373-1.
- [61] L. Vivanco, E. Fabiano, V. Carrasco, V. Amarelle, and L. Sánchez Bettucci, "Estudio petrográfico de vulcanitas del grupo Península Fildes, Bahía Fildes Isla Rey Jorge, Antártida.," 2016.
- [62] R. Rosselló-Móra and R. Amann, "Past and future species definitions for Bacteria and Archaea," *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 38, no. 4. Elsevier GmbH, pp. 209–216, Jun. 01, 2015. doi: 10.1016/j.syapm.2015.02.001.
- [63] S. A. García-Echauri, M. Gidekel, A. Gutiérrez-Moraga, L. Santos, and A. de León-Rodríguez, "Isolation and phylogenetic classification of culturable psychrophilic prokaryotes from the Collins glacier in the Antarctica," *Folia Microbiologica*, vol. 56, no. 3, pp. 209–214, May 2011, doi: 10.1007/s12223-011-0038-9.

- [64] S. D. McLaughlin *et al.*, "The bacteriology of pouchitis: A molecular phylogenetic analysis using 16s rRNA gene cloning and sequencing," *Annals of Surgery*, vol. 252, no. 1, pp. 90–98, Jul. 2010, doi: 10.1097/SLA.0b013e3181e3dc8b.
- [65] M. Vaitilingom *et al.*, "Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France)," *Atmospheric Environment*, vol. 56, pp. 88–100, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.03.072.
- [66] R. Margesin, C. Spröer, P. Schumann, and F. Schinner, "Pedobacter cryoconitis sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 53, no. 5, pp. 1291–1296, Sep. 2003, doi: 10.1099/ij.s.0.02436-0.
- [67] T. Reitz, M. L. Merroun, A. Rossberg, R. Steudtner, and S. Selenska-Pobell, "Bioaccumulation of U(VI) by *Sulfolobus acidocaldarius* under moderate acidic conditions," *Radiochimica Acta*, vol. 99, no. 9, pp. 543–553, Sep. 2011, doi: 10.1524/ract.2011.1848.
- [68] K. Peeters, D. Ertz, and A. Willems, "Culturable bacterial diversity at the Princess Elisabeth Station (Utsteinen, Sør Rondane Mountains, East Antarctica) harbours many new taxa," *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 34, no. 5, pp. 360–367, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.syapm.2011.02.002.
- [69] T. Zhang, J. Xu, J. Zeng, and K. Lou, "Diversity of prokaryotes associated with soils around coal-fire gas vents in MaNasi county of Xinjiang, China," *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, vol. 103, no. 1, pp. 23–36, Jan. 2013, doi: 10.1007/s10482-012-9782-3.
- [70] V. I. Miteva, P. P. Sheridan, and J. E. Brenchley, "Phylogenetic and Physiological Diversity of Microorganisms Isolated from a Deep Greenland Glacier Ice Core," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 1, pp. 202–213, Jan. 2004, doi: 10.1128/AEM.70.1.202-213.2004.
- [71] N. Delmotte *et al.*, "Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 38, pp. 16428–16433, Sep. 2009, doi: 10.1073/pnas.0905240106.
- [72] D. J. Reasoner and E. E. Geldreich, "A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water.," *Appl Environ Microbiol*, vol. 49, no. 1, pp. 1–7, Jan. 1985.
- [73] J. J. Marizcurrena, M. F. Cerdá, D. Alem, and S. Castro-Sowinski, "Living with Pigments: The Colour Palette of Antarctic Life," Springer, Cham, 2019, pp. 65–82. doi: 10.1007/978-3-030-02786-5_4.
- [74] S. Jöhler, R. Stephan, I. Hartmann, K. A. Kuehner, and A. Lehner, "Genes involved in yellow pigmentation of *Cronobacter sakazakii* ES5 and influence of pigmentation on persistence and growth under environmental stress.," *Appl Environ Microbiol*, vol. 76, no. 4, pp. 1053–61, Feb. 2010, doi: 10.1128/AEM.01420-09.

- [75] M. Ehling-Schulz, W. Bilger, and S. Scherer, "UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*," *J Bacteriol*, vol. 179, no. 6, pp. 1940–5, Mar. 1997.
- [76] I. Sedláček *et al.*, "Hymenobacter amundsenii sp. nov. resistant to ultraviolet radiation, isolated from regoliths in Antarctica," *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 42, no. 3, pp. 284–290, May 2019, doi: 10.1016/j.syapm.2018.12.004.
- [77] I. Sedláček *et al.*, "Red-pink pigmented hymenobacter coccineus sp. nov., hymenobacter lapidarius sp. nov. and hymenobacter glacialis sp. nov., isolated from rocks in Antarctica," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 67, no. 6, pp. 1775–1983, Jun. 2017, doi: 10.1099/ijsem.0.001898.
- [78] D. M. Roldán *et al.*, "Hymenobacter artigasi sp. Nov., isolated from air sampling in maritime antarctica," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 70, no. 9, pp. 4935–4941, 2020, doi: 10.1099/ijsem.0.004362.
- [79] P. Švec *et al.*, "Pedobacter psychrophilus sp. nov., isolated from fragmentary rock," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 67, no. 8, pp. 2538–2543, Aug. 2017, doi: 10.1099/ijsem.0.001962.
- [80] S. C. Cary, I. R. McDonald, J. E. Barrett, and D. A. Cowan, "On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils," *Nat Rev Microbiol*, vol. 8, no. 2, pp. 129–38, Feb. 2010, doi: 10.1038/nrmicro2281.
- [81] K. A. Hughes and B. Lawley, "A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts," *Environ Microbiol*, vol. 5, no. 7, pp. 555–65, Jul. 2003.
- [82] M. C. Smith, J. P. Bowman, F. J. Scott, and M. A. Line, "Sublithic bacteria associated with Antarctic quartz stones," *Antarctic Science*, vol. 12, no. 2, pp. 177–184, 2000, doi: 10.1017/s0954102000000237.
- [83] E. Kandeler, C. Kampichler, and O. Horak, "Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities," *Biology and Fertility of Soils*, vol. 23, no. 3, pp. 299–306, 1996, doi: 10.1007/BF00335958.
- [84] E. Kandeler *et al.*, "Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil," *Biology and Fertility of Soils*, vol. 32, no. 5, pp. 390–400, 2000, doi: 10.1007/s003740000268.
- [85] D. H. Nies, "Microbial heavy-metal resistance.," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 51, no. 6, pp. 730–50, Jun. 1999.
- [86] G. M. Teitzel and M. R. Parsek, "Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 69, no. 4, pp. 2313–20, Apr. 2003.
- [87] I. Tomova, M. Stoilova, – Disheva, E. Vasileva, and – Tonkova, "Characterization of heavy metals resistant heterotrophic bacteria from soils in the Windmill Islands region, Wilkes Land, East Antarctica", doi: 10.2478/popore-2014-0028.

- [88] M. J. De Souza, S. Nair, P. A. Loka Bharathi, and D. Chandramohan, "Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters," in *Ecotoxicology*, May 2006, vol. 15, no. 4, pp. 379–384. doi: 10.1007/s10646-006-0068-2.
- [89] M. J. De Souza, P. A. Loka Bharathi, S. Nair, and D. Chandramohan, "'Trade-off' in Antarctic bacteria: Limnetic psychrotrophs concede multiple enzyme expressions for multiple metal resistance," *BioMetals*, vol. 20, no. 6, pp. 821–828, Dec. 2007, doi: 10.1007/s10534-006-9045-8.
- [90] N. A. Órdenes-Aenishanslins, L. A. Saona, V. M. Durán-Toro, J. P. Monrás, D. M. Bravo, and J. M. Pérez-Donoso, "Use of titanium dioxide nanoparticles biosynthesized by *Bacillus mycoides* in quantum dot sensitized solar cells," *Microbial Cell Factories*, vol. 13, no. 1, p. 90, Dec. 2014, doi: 10.1186/s12934-014-0090-7.
- [91] E. Inshakova and O. Inshakov, "World market for nanomaterials: Structure and trends," in *MATEC Web of Conferences*, Nov. 2017, vol. 129. doi: 10.1051/mateconf/201712902013.
- [92] N. P. Gaponik, D. V. Talapin, and A. L. Rogach, "A light-emitting device based on a CdTe nanocrystal/polyaniline composite," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 1, no. 8, pp. 1787–1789, Apr. 1999, doi: 10.1039/a808619b.
- [93] R. Dragone, G. Grasso, M. Muccini, and S. Toffanin, "Portable bio/chemosensoristic devices: Innovative systems for environmental health and food safety diagnostics," *Frontiers in Public Health*, vol. 5, no. MAY, May 2017, doi: 10.3389/FPUBH.2017.00080.
- [94] T. Wang, L. Yang, B. Zhang, and J. Liu, "Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 80, no. 1, pp. 94–102, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.05.041.
- [95] R. A. Petros and J. M. Desimone, "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 615–627, Aug. 09, 2010. doi: 10.1038/nrd2591.
- [96] F. Kiessling, M. E. Mertens, J. Grimm, and T. Lammers, "Nanoparticles for imaging: Top or flop?," *Radiology*, vol. 273, no. 1. Radiological Society of North America Inc., pp. 10–28, Oct. 01, 2014. doi: 10.1148/radiol.14131520.
- [97] W. R. Algar, A. J. Tavares, and U. J. Krull, "Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction," *Analytica Chimica Acta*, vol. 673, no. 1, pp. 1–25, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.ACA.2010.05.026.
- [98] C. Gallardo-Benavente *et al.*, "Biosynthesis of CdS Quantum Dots Mediated by Volatile Sulfur Compounds Released by Antarctic *Pseudomonas fragi*," *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, no. AUG, p. 1866, Aug. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01866.
- [99] A. P. Alivisatos, "Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, no. 31, pp. 13226–13239, Jan. 1996, doi: 10.1021/jp9535506.

- [100] C. Rengers, N. Gaponik, and A. Eychmüller, "Quantum dots and quantum rods," in *NanoScience and Technology*, Springer Verlag, 2019, pp. 29–51. doi: 10.1007/978-3-030-12461-8_2.
- [101] M. Zhou and I. Ghosh, "Current trends in peptide science quantum dots and peptides: A bright future together," *Biopolymers - Peptide Science Section*, vol. 88, no. 3, pp. 325–339, 2007, doi: 10.1002/bip.20655.
- [102] A. M. Wagner, J. M. Knipe, G. Orive, and N. A. Peppas, "Quantum dots in biomedical applications," *Acta Biomaterialia*, vol. 94. Acta Materialia Inc, pp. 44–63, Aug. 01, 2019. doi: 10.1016/j.actbio.2019.05.022.
- [103] A. J. Nozik, M. C. Beard, J. M. Luther, M. Law, R. J. Ellingson, and J. C. Johnson, "Semiconductor Quantum Dots and Quantum Dot Arrays and Applications of Multiple Exciton Generation to Third-Generation Photovoltaic Solar Cells," *Chemical Reviews*, vol. 110, no. 11, pp. 6873–6890, Nov. 2010, doi: 10.1021/cr900289f.
- [104] B. O'Regan and M. Grätzel, "A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films," *Nature*, vol. 353, no. 6346, pp. 737–740, Oct. 1991, doi: 10.1038/353737a0.
- [105] H. Jun, M. Gareem, A. Arof, and R. Sust, "Quantum dot-sensitized solar cells-perspective and recent development: a review of Cd chalcogenide quantum dots as sensitizers." Jan. 01, 2013.
- [106] Z. Pan, H. Rao, I. Mora-Seró, J. Bisquert, and X. Zhong, "Quantum dot-sensitized solar cells," *Chemical Society Reviews*, vol. 47, no. 20. Royal Society of Chemistry, pp. 7659–7702, Oct. 21, 2018. doi: 10.1039/c8cs00431e.
- [107] S. Rühle, M. Shalom, and A. Zaban, "Quantum-Dot-Sensitized Solar Cells," *ChemPhysChem*, vol. 11, no. 11, pp. 2290–2304, Jul. 2010, doi: 10.1002/cphc.201000069.
- [108] Q. Schiermeier, J. Tollefson, T. Scully, A. Witze, and O. Morton, "Energy alternatives: Electricity without carbon," *Nature*, vol. 454, no. 7206. Nature Publishing Group, pp. 816–823, Aug. 14, 2008. doi: 10.1038/454816a.
- [109] K. Zhao, Z. Pan, and X. Zhong, "Charge Recombination Control for High Efficiency Quantum Dot Sensitized Solar Cells," *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 7, no. 3, pp. 406–417, Feb. 2016, doi: 10.1021/acs.jpclett.5b02153.
- [110] M. A. Green, E. D. Dunlop, D. H. Levi, J. Hohl-Ebinger, M. Yoshita, and A. W. Y. Ho-Baillie, "Solar cell efficiency tables (version 54)," *Progress in Photovoltaics: Research and Applications*, vol. 27, no. 7, pp. 565–575, Jul. 2019, doi: 10.1002/pip.3171.
- [111] G. Grasso, D. Zane, and R. Dragone, "Microbial nanotechnology: Challenges and prospects for green biocatalytic synthesis of nanoscale materials for sensoristic and biomedical applications," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 1. MDPI AG, Jan. 01, 2020. doi: 10.3390/nano10010011.

- [112] C. Yuan and T. Zhang, "Environmental implications of nano-manufacturing," in *Green Manufacturing: Fundamentals and Applications*, vol. 9781441960160, Springer US, 2013, pp. 179–202. doi: 10.1007/978-1-4419-6016-0_8.
- [113] F. Z. Fang, X. D. Zhang, W. Gao, Y. B. Guo, G. Byrne, and H. N. Hansen, "Nanomanufacturing—Perspective and applications," *CIRP Annals - Manufacturing Technology*, vol. 66, no. 2, pp. 683–705, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.cirp.2017.05.004.
- [114] H. Şengül, T. L. Theis, and S. Ghosh, "Toward Sustainable Nanoproductions," *Journal of Industrial Ecology*, vol. 12, no. 3, pp. 329–359, Jun. 2008, doi: 10.1111/j.1530-9290.2008.00046.x.
- [115] X. Gao, L. Wei, H. Yan, and B. Xu, "Green synthesis and characteristic of core-shell structure silver/starch nanoparticles," *Materials Letters*, vol. 65, no. 19–20, pp. 2963–2965, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.matlet.2011.06.020.
- [116] R. Zhang, Y. Liu, and S. Sun, "Facile synthesis of water-soluble ZnS quantum dots with strong luminescent emission and biocompatibility," *Applied Surface Science*, vol. 282, pp. 960–964, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.apsusc.2013.06.105.
- [117] H. Huang and X. Yang, "Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: A green method," *Carbohydrate Research*, vol. 339, no. 15, pp. 2627–2631, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.carres.2004.08.005.
- [118] X. Wen, J. Yang, B. He, and Z. Gu, "Preparation of monodisperse magnetite nanoparticles under mild conditions," *Current Applied Physics*, vol. 8, no. 5, pp. 535–541, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.cap.2007.09.003.
- [119] H. Mattoussi *et al.*, "Self-Assembly of CdSe–ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein," *J Am Chem Soc*, vol. 122, no. 49, pp. 12142–12150, Dec. 2000, doi: 10.1021/ja002535y.
- [120] J. M. Pérez-Donoso *et al.*, "Biomimetic, Mild Chemical Synthesis of CdTe-GSH Quantum Dots with Improved Biocompatibility," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 1, p. e30741, Jan. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0030741.
- [121] R. Prasad, R. Pandey, and I. Barman, "Engineering tailored nanoparticles with microbes: Quo vadis?," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 8, no. 2, pp. 316–330, Mar. 2016, doi: 10.1002/wnan.1363.
- [122] L. Dziewit and L. Drewniak, "Heavy Metals Resistance, Metabolism and Transformation: Genomic, Metagenomic and Metatranscriptomic Studies," in *Microbial Biodegradation: From Omics to Function and Application*, Caister Academic Press, 2016, pp. 13–26. doi: 10.21775/9781910190456.02.
- [123] G. Haferburg and E. Kothe, "Microbes and metals: Interactions in the environment," *Journal of Basic Microbiology*, vol. 47, no. 6, pp. 453–467, Dec. 2007. doi: 10.1002/jobm.200700275.
- [124] A. Valizadeh *et al.*, "Quantum dots: Synthesis, bioapplications, and toxicity," *Nanoscale Research Letters*, vol. 7, no. 1. Springer, p. 480, 2012. doi: 10.1186/1556-276X-7-480.

- [125] G. Ulloa *et al.*, ““Use of acidophilic bacteria of the genus *Acidithiobacillus* to biosynthesize CdS fluorescent nanoparticles (quantum dots) with high tolerance to acidic pH,”” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 95, pp. 217–224, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.09.005.
- [126] J. D. Holmes, D. J. Richardson, S. Saed, R. Evans-Gowing, D. A. Russell, and J. R. Sodeau, “Cadmium-specific formation of metal sulfide ‘Q-particles’ by *Klebsiella pneumoniae*,” *Microbiology (N Y)*, vol. 143, no. 8, pp. 2521–2530, 1997, doi: 10.1099/00221287-143-8-2521.
- [127] R. Dunleavy, L. Lu, C. J. Kiely, S. McIntosh, and B. W. Berger, “Single-enzyme biomineralization of cadmium sulfide nanocrystals with controlled optical properties,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 19, pp. 5275–5280, May 2016, doi: 10.1073/pnas.1523633113.
- [128] S. Ramya, T. Shanmugasundaram, and R. Balagurunathan, “Biomedical potential of actinobacterially synthesized selenium nanoparticles with special reference to anti-biofilm, anti-oxidant, wound healing, cytotoxic and anti-viral activities,” *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 32, pp. 30–39, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.jtemb.2015.05.005.
- [129] J. P. Monrás *et al.*, “Enhanced Glutathione Content Allows the In Vivo Synthesis of Fluorescent CdTe Nanoparticles by *Escherichia coli*,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 11, p. e48657, Nov. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0048657.
- [130] N. Bruna *et al.*, “Synthesis of salt-stable fluorescent nanoparticles (quantum dots) by polyextremophile halophilic bacteria,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-018-38330-8.
- [131] D. Adriano, “Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability 2nd Ed. 2001. NY,” *Springer-Verlag New York, Inc.*
- [132] C. Gallardo *et al.*, “Low-temperature biosynthesis of fluorescent semiconductor nanoparticles (CdS) by oxidative stress resistant Antarctic bacteria,” *Journal of Biotechnology*, vol. 187, pp. 108–115, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.017.
- [133] D. O. Plaza, C. Gallardo, Y. D. Straub, D. Bravo, and J. M. Pérez-Donoso, “Biological synthesis of fluorescent nanoparticles by cadmium and tellurite resistant Antarctic bacteria: exploring novel natural nanofactories,” *Microbial Cell Factories*, vol. 15, no. 1, p. 76, Dec. 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0477-8.
- [134] K. Shatalin, E. Shatalina, A. Mironov, and E. Nudler, “H₂S: A universal defense against antibiotics in bacteria,” *Science (1979)*, vol. 334, no. 6058, pp. 986–990, Nov. 2011, doi: 10.1126/science.1209855.
- [135] Heracle BioSoft, “DNA Sequence Assembler.” 2013.
- [136] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

- [137] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar, "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729, Dec. 2013, doi: 10.1093/molbev/mst197.
- [138] M. Kimura, *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, 1983.
- [139] T. A. Hall *et al.*, "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT," Jan. 1999, doi: 10.14601/PHYTOPATHOL_MEDITERR-14998U1.29.
- [140] N. Saitou and M. Nei, "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, no. 4, pp. 406–425, Jul. 1987, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- [141] F. A. Venegas *et al.*, "Biological phosphorylated molecules participate in the biomimetic and biological synthesis of cadmium sulphide quantum dots by promoting H₂S release from cellular thiols," *RSC Advances*, vol. 7, no. 64, pp. 40270–40278, Aug. 2017, doi: 10.1039/c7ra03578k.
- [142] N. Órdenes-Aenishanslins, G. Anziani-Ostuni, C. P. Quezada, R. Espinoza-González, D. Bravo, and J. M. Pérez-Donoso, "Biological Synthesis of CdS/CdSe Core/Shell Nanoparticles and Its Application in Quantum Dot Sensitized Solar Cells," *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, no. JULY, p. 1587, Jul. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01587.
- [143] H. J. Bai, Z. M. Zhang, Y. Guo, and G. E. Yang, "Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 70, no. 1, pp. 142–146, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.12.025.
- [144] Z. Yang, L. Lu, C. J. Kiely, B. W. Berger, and S. McIntosh, "Biomaterialized CdS Quantum Dot Nanocrystals: Optimizing Synthesis Conditions and Improving Functional Properties by Surface Modification," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 55, no. 43, pp. 11235–11244, Nov. 2016, doi: 10.1021/acs.iecr.6b03487.
- [145] D. Mandal, M. E. Bolander, D. Mukhopadhyay, G. Sarkar, and P. Mukherjee, "The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 69, no. 5, pp. 485–492, Jan. 2006, doi: 10.1007/s00253-005-0179-3.
- [146] H. Bao, E. Wang, and S. Dong, "One-Pot Synthesis of CdTe Nanocrystals and Shape Control of Luminescent CdTe–Cystine Nanocomposites," *Small*, vol. 2, no. 4, pp. 476–480, Apr. 2006, doi: 10.1002/smll.200500346.
- [147] C. Mi *et al.*, "Biosynthesis and characterization of CdS quantum dots in genetically engineered *Escherichia coli*," *Journal of Biotechnology*, vol. 153, no. 3–4, pp. 125–132, May 2011, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.014.
- [148] H. Weller *et al.*, "Photochemistry of colloidal semiconductors. Onset of light absorption as a function of size of extremely small CdS particles," *Chemical Physics Letters*, vol. 124, no. 6, pp. 557–560, Mar. 1986, doi: 10.1016/0009-2614(86)85075-8.

- [149] R. He, X. F. Qian, J. Yin, H. A. Xi, L. J. Bian, and Z. K. Zhu, "Formation of monodispersed PVP-capped ZnS and CdS nanocrystals under microwave irradiation," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 220, no. 1–3, pp. 151–157, Jun. 2003, doi: 10.1016/S0927-7757(03)00072-4.
- [150] H. S. Mansur, A. A. P. Mansur, and J. C. González, "Synthesis and characterization of CdS quantum dots with carboxylic-functionalized poly (vinyl alcohol) for bioconjugation," *Polymer (Guildf)*, vol. 52, no. 4, pp. 1045–1054, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.polymer.2011.01.004.
- [151] N. Órdenes-Aenishanslins *et al.*, "Bacterial Synthesis of Ternary CdSAg Quantum Dots through Cation Exchange: Tuning the Composition and Properties of Biological Nanoparticles for Bioimaging and Photovoltaic Applications," *Microorganisms*, vol. 8, no. 5, p. 631, Apr. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8050631.
- [152] A. T. Viana, T. Caetano, C. Covas, T. Santos, and S. Mendo, "Environmental superbugs: The case study of *Pedobacter* spp.," *Environmental Pollution*, vol. 241, pp. 1048–1055, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2018.06.047.
- [153] C. Michael Vui Ling Wong, H. Keat Tam, S. Aisyah Alias, M. González, G. González, and M. Domínguez, "Pseudomonas and Pedobacter isolates from King George Island inhibited the growth of foodborne pathogens," *Polish Polar Research*, vol. 32, no. 1, pp. 3–14, 2011, doi: 10.2478/v10183-011-0003-y.
- [154] N. Awano, M. Wada, H. Mori, S. Nakamori, and H. Takagi, "Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 7, pp. 4149–4152, Jul. 2005, doi: 10.1128/AEM.71.7.4149-4152.2005.
- [155] L. C. Spangler, L. Lu, C. J. Kiely, B. W. Berger, and S. McIntosh, "Biom mineralization of PbS and PbS-CdS Core-Shell Nanocrystals and their Application in Quantum Dot Sensitized Solar Cells," *Journal of Materials Chemistry*, 2016, doi: 10.1039/C5TA10534J.
- [156] W. B. Whitman, D. C. Coleman, and W. J. Wiebe, "Prokaryotes: The unseen majority," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 12. National Academy of Sciences, pp. 6578–6583, Jun. 09, 1998. doi: 10.1073/pnas.95.12.6578.
- [157] J. K. Vester, M. A. Glaring, and P. Stougaard, "Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments," *Extremophiles*, vol. 19, no. 1. Springer-Verlag Tokyo, pp. 17–29, Nov. 16, 2015. doi: 10.1007/s00792-014-0704-3.
- [158] J. T. Staley and A. Konopka, "Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats.," *Annual review of microbiology*, vol. 39. Annu Rev Microbiol, pp. 321–346, 1985. doi: 10.1146/annurev.mi.39.100185.001541.
- [159] R. I. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer, "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.," *Microbiol Rev*, vol. 59, no. 1, pp. 143–69, Mar. 1995.

- [160] D. Cowan, Q. Meyer, W. Stafford, S. Muyanga, R. Cameron, and P. Wittwer, "Metagenomic gene discovery: past, present and future.," *Trends Biotechnol*, vol. 23, no. 6, pp. 321–9, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.tibtech.2005.04.001.
- [161] M. Tessler *et al.*, "Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06665-3.
- [162] W. Reeve, R. P. Tiwari, V. Melino, and P. S. Poole, "Fundamental molecular techniques for rhizobia," in *Working with rhizobia*, J. Z. J. G. Howieson and M. J. Dilworth, Eds. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 2016, pp. 226–228.
- [163] R. I. Griffiths, A. S. Whiteley, A. G. O'Donnell, and M. J. Bailey, "Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 12, pp. 5488–5491, 2000, doi: 10.1128/AEM.66.12.5488-5491.2000.
- [164] J. J. Walker, "Endolithic Microbial Ecosystems: Molecular Phylogenetic Composition, Ecology and Geobiology," University of Colorado, Boulder, 2005.
- [165] M. A. Dojka, P. Hugenholtz, S. K. Haack, and N. R. Pace, "Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent- contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 10, pp. 3869–3877, 1998, doi: 10.1128/aem.64.10.3869-3877.1998.
- [166] J. N. Guthrie, D. J. W. Moriarty, and L. L. Blackall, "DNA extraction from coral reef sediment bacteria for the polymerase chain reaction," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 43, no. 2, pp. 73–80, Dec. 2000, doi: 10.1016/S0167-7012(00)00207-4.
- [167] H. A. Barton, N. M. Taylor, B. R. Lubbers, and A. C. Pemberton, "DNA extraction from low-biomass carbonate rock: An improved method with reduced contamination and the low-biomass contaminant database," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 66, no. 1, pp. 21–31, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.mimet.2005.10.005.
- [168] A. M. Bolger, M. Lohse, and B. Usadel, "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data," *Bioinformatics*, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120, Apr. 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- [169] S. Andrews, "FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.," *Babraham Bioinformatics*, 2010. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- [170] D. E. Wood and S. L. Salzberg, "Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments," *Genome Biology*, vol. 15, no. 3, p. R46, Mar. 2014, doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r46.
- [171] P. Menzel, K. L. Ng, and A. Krogh, "Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju," *Nature Communications*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, Apr. 2016, doi: 10.1038/ncomms11257.

- [172] S. Nurk, D. Meleshko, A. Korobeynikov, and P. A. Pevzner, "metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler," 2017, doi: 10.1101/gr.213959.116.
- [173] A. Mikheenko, V. Saveliev, and A. Gurevich, "MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies," *Bioinformatics*, vol. 32, no. 7, pp. 1088–1090, Nov. 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btv697.
- [174] F. Meyer *et al.*, "The metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes," *BMC Bioinformatics*, vol. 9, no. 1, p. 386, Sep. 2008, doi: 10.1186/1471-2105-9-386.
- [175] R. Overbeek *et al.*, "The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 17, pp. 5691–5702, Jan. 2005, doi: 10.1093/nar/gki866.
- [176] K. D. Pruitt, T. Tatusova, and D. R. Maglott, "NCBI Reference Sequence (RefSeq): A curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. DATABASE ISS., p. D501, Jan. 2005, doi: 10.1093/nar/gki025.
- [177] C. Pal, J. Bengtsson-Palme, C. Rensing, E. Kristiansson, and D. G. J. Larsson, "BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database," *Nucleic Acids Research*, vol. 42, no. D1, pp. D737–D743, Jan. 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1252.
- [178] N. Segata, L. Waldron, A. Ballarini, V. Narasimhan, O. Jousson, and C. Huttenhower, "Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes," *Nature Methods*, vol. 9, no. 8, pp. 811–814, Aug. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2066.
- [179] J. Jovel *et al.*, "Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. APR, p. 459, Apr. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00459.
- [180] C. Amiard-Triquet and P. S. Rainbow, "Tolerance and the Trophic Transfer of Contaminants," in *Tolerance to Environmental Contaminants*, C. Amiard-Triquet, P. S. Rainbow, and M. Roméo, Eds. Taylor & Francis Group, 2011.
- [181] N. Órdenes-aenishanslins *et al.*, "Biological Synthesis of CdS / CdSe Core / Shell Nanoparticles and Its Application in Quantum Dot Sensitized Solar Cells," *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, no. July, pp. 1–10, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01587.

Anexo

Tabla suplementaria 1. Medio R2A.

Componente	Cantidad por litro
Extracto de levadura	0,5 g
Proteosa peptona N° 3	0,5 g
Casaminoácidos	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Piruvato de sodio	0,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Ajustar a pH 7,2

Para medio sólido adicionar 15 g de agar.

Tabla suplementaria 2. Secuencias nucleotídicas de los *primers* utilizados.

Nombre	Secuencia
Eub27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
Eub1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Tabla suplementaria 3. Componentes del *mix* para la reacción de PCR

Componente	Concentración final
DreamTaq <i>buffer</i> (Thermo Scientific)*	1X
DreamTaq polymerase (Thermo Scientific)	1U
dNTPs	0,2 mM
<i>Primer</i> Eub27F	0,2 µM
<i>Primer</i> Eub1492R	0,2 µM

*Incluye MgCl₂ 20mM

Tabla suplementaria 4. Programa de PCR utilizado en la amplificación del gen del ARNr 16S

Temperatura	Tiempo	Repetición del ciclo
95 °C	20 min	-
Apertura para el agregado de Taq pol		
95 °C	5 min	
95 °C	30 seg	30 veces
59 °C	30 seg	
72 °C	1 min 30 seg	
72 °C	7 min	-

Tabla suplementaria 5. Buffer TAE

Componente	Concentración final
Tris-acético	0,04 M
EDTA	0,001 M
Ajustar a pH 8,0	

Tabla suplementaria 6. Loading dye 6X

Componente	Concentración
Glicerol	30% (v/v)
Azul de bromofenol	0,25% (m/v)
Xilencianol	0,25% (m/v)

Tabla suplementaria 7. Análisis ICP-MS I

Elementos mayores (% m/m)		
	V6	V7
SiO ₂	63,1	50,04
Al ₂ O ₃	15,81	17,81
Fe ₂ O ₃	5,97	8,89
MgO	1,75	4,26
CaO	4,06	6,87
Na ₂ O	4,86	5,91
K ₂ O	1,81	0,51
TiO ₂	0,84	0,74
P ₂ O ₅	0,3	0,18
MnO	0,13	0,15
Cr ₂ O ₃	<0,002	0,006
Ba	441	197
Ni	<20	20
Sc	17	27
LOI	1,2	4,4

Tabla suplementaria 8. Análisis ICP-MS II

Elementos menores y traza (ppm)		
	V6	V7
Be	<1	<1
Co	8,8	23,1
Cs	0,3	5,8
Ga	18,5	13,9
Hf	4,4	2,2
Nb	5,8	2,8
Rb	32,4	3
Sn	<1	<1
Sr	350,3	466,3
Ta	0,3	0,1
Th	3,2	1,6
U	1	0,3
V	135	125
W	<0,5	<0,5
Zr	161,1	78,7

Y	26,1	14,2
La	19,5	9,6
Ce	40,9	19,9
Pr	5,97	2,95
Nd	25,3	12,9
Sm	5,46	2,78
Eu	1,47	0,97
Gd	5,24	2,76
Tb	0,77	0,43
Dy	4,57	2,58
Ho	0,91	0,5
Er	2,71	1,48
Tm	0,38	0,21
Yb	2,5	1,4
Lu	0,42	0,21
Mo	1,4	0,4
Cu	30,3	38,4
Pb	1,2	4,1
Zn	64	50
Ni	2,8	20,3
As	<0,5	4,5
Cd	<0,1	<0,1
Sb	<0,1	<0,1
Bi	<0,1	<0,1
Ag	<0,1	<0,1
Au	0,5	1,7
Hg	<0,01	<0,01
Tl	<0,1	<0,1
Se	<0,5	<0,5

Tabla suplementaria 9. Estadísticas de los datos crudos

Muestra	Bases totales (pb)	Reads totales	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
V6	1.034.163.038	10.239.238	60,235	39,77	94,116	85,876
V7	1.519.698.116	15.046.516	57,964	42,04	96,966	90,917

Tabla suplementaria 10. Estadísticos de los metagenomas ensamblados

	V6	V7
# contigs ≥ 0 bp	187726	298591
# contigs ≥ 1000 bp	9819	19566
# contigs ≥ 5000 bp	127	1447
# contigs ≥ 10000 bp	9	669
# contigs ≥ 25000 bp	0	375
# contigs ≥ 50000 bp	0	213
contig más largo	24571 pb	312742 pb
largo total	32835242 pb	93872495 pb
N50	1020 pb	2590 pb

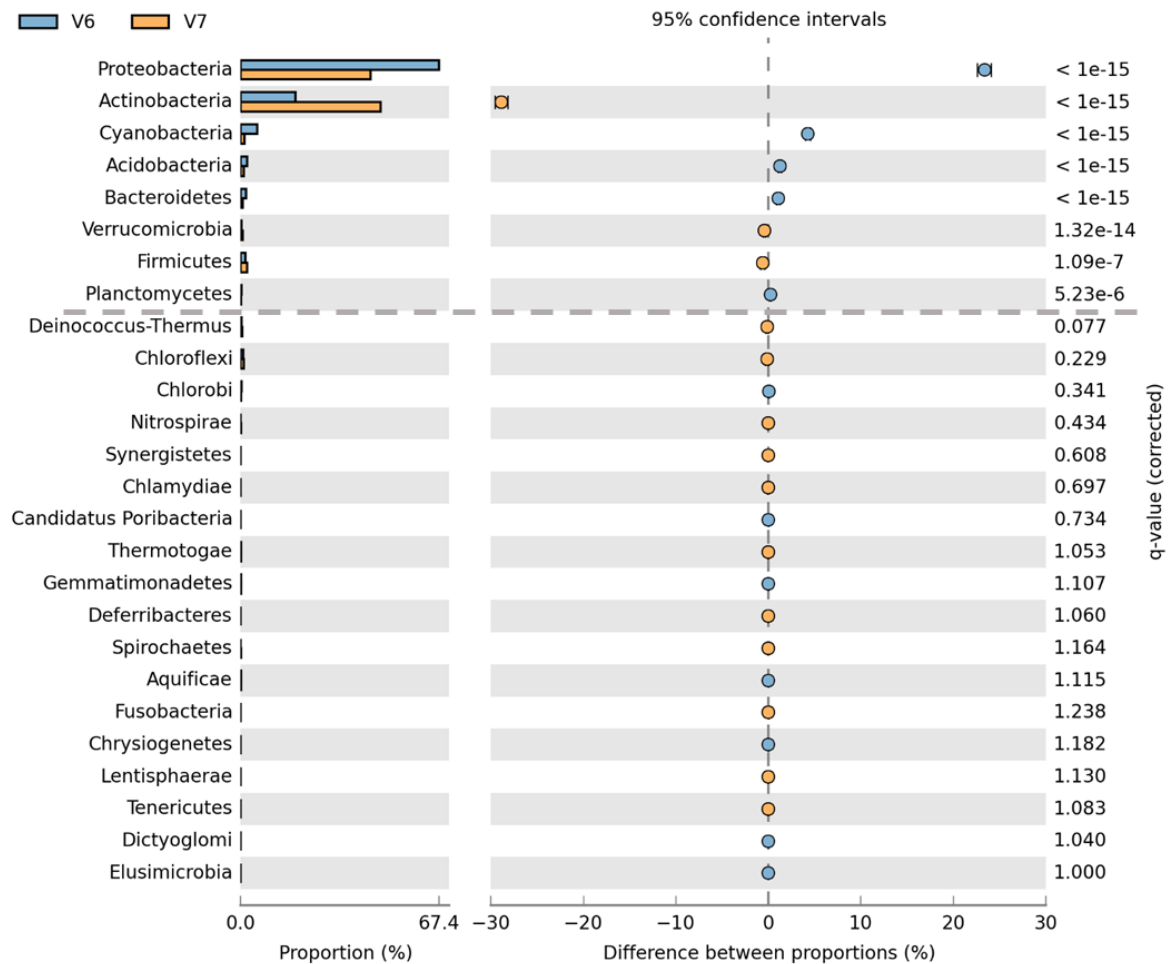


Figura suplementaria 1. Asignación taxonómica basada en la base de datos RefSeq. Se distinguen las diferencias entre las proporciones de un determinado filo hacia la derecha y en azul si hubo una mayor proporción de ese filo en el metagenoma V6, o hacia la izquierda y en naranja si la mayor proporción del filo fue para V6. En todos los casos las diferencias entre proporciones con un q-valor mayor a 0,05 se consideraron significativas.

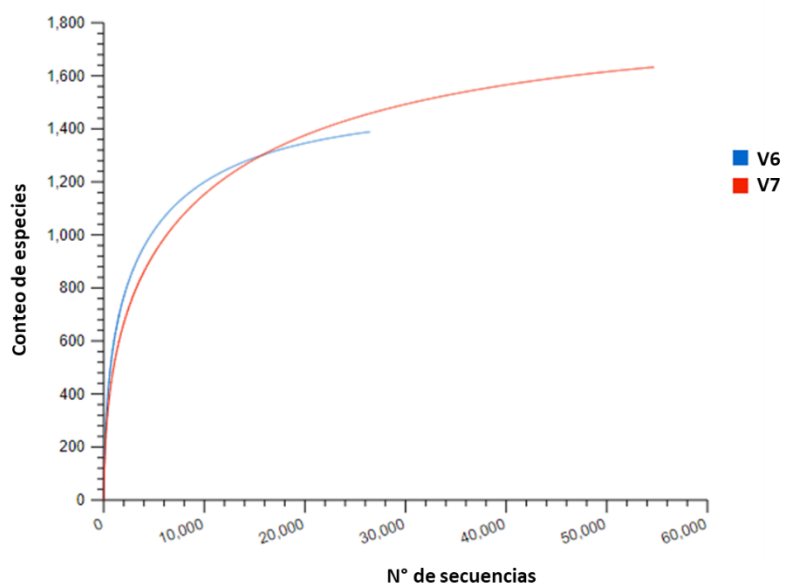


Figura suplementaria 2. Curva de rarefacción

Tabla suplementaria 11. Abundancias relativas de los filos bacterianos en comunidad litobiótica.

	V6 Cultivables	V6 Kraken	V6 Kaiju	V7 Cultivables	V7 Kraken	V7 Kaiju
Acidobacteria	0,0	1,1	5,2	0,0	0,5	2,6
Actinobacteria	60,7	28,2	23,3	39,4	48,1	36,3
Bacteroidetes	8,9	8,2	9,7	36,4	5,4	7,9
Chloroflexi	0,0	0,1	0,6	0,0	0,1	0,6
Cyanobacteria	0,0	14,3	5,8	6,1	0,4	1,4
Deinococcus-Thermus	1,8	0,4	0,7	0,0	0,4	0,8
Firmicutes	1,8	1,5	2,6	0,0	2,0	2,8
Otros	5,4	9,7	9,6	0,0	10,8	10,4
Planctomycetes	0,0	0,4	1,2	0,0	0,3	1,0
Proteobacteria	21,4	36,1	41,0	18,2	31,9	35,5
Verrucomicrobia	0,0	0,2	0,4	0,0	0,2	0,6

Tabla suplementaria 12. Conteo de los *reads* correspondientes a genes de tolerancia a metales encontrados en los metagenomas.

Gen	Conteo V6	Conteo V7	Metal	Función	Categoría
<i>acr3</i>	1	0	As	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>actP</i>	24	22	Cu, Te	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>aioA/aoxB</i>	4	5	As	Oxidación de As	Transformación
<i>aioB/aoxA</i>	0	4	As	Oxidación de As	Transformación
ALU1-P	3	2	Al	No se conoce el mecanismo	No se conoce el mecanismo
<i>arsA</i>	0	3	As	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>arsB</i>	4	2	As	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>arsC</i>	0	2	As	Reduce As	Transformación
<i>arsH</i>	2	2	As	No se conoce el mecanismo	No se conoce el mecanismo
<i>arsM</i>	13	21	As	Metila As (volatiliza) para detoxificar	Transformación
<i>bfrA</i>	0	1	Fe	Oxidación de Fe	Transformación
<i>chrA</i>	5	6	Cr	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>chrA1</i>	1	0	Cr	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>chrC</i>	2	0	Cr	No se conoce el mecanismo	No se conoce el mecanismo
<i>chrC</i>	0	1	Cr	No se conoce el mecanismo	No se conoce el mecanismo
<i>cmeC</i>	1	1	Cu, Co	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>cnrA</i>	3	1	Ni, Co	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>copA</i>	20	35	Cu, Ag	Transportador de Cu (importe y eflujo), eflujo Ag, secuestra Cu	Transportador de eflujo
<i>copB</i>	8	11	Cu, Ag	Transportador de Cu (importe y eflujo), eflujo Ag, secuestra Cu	Transportador de eflujo
<i>copC</i>	2	2	Cu	Secuestra Cu	Otros mecanismos
<i>corC</i>	5	5	Co, Mg	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>corD</i>	1	2	Co, Mg	No se conoce el mecanismo	No se conoce el mecanismo
<i>crdA</i>	2	1	Cu	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>ctpD</i>	1	2	Co, Ni	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>ctpV</i>	3	18	Cu	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>cusA/ybdE</i>	7	1	Cu, Ag	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>cusB</i>	1	0	Cu, Ag	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>czcA</i>	0	2	Cd, Zn, Co	Transportador eflujo, regulador	Transportador de eflujo
<i>czcC</i>	0	1	Cd, Zn, Co	Transportador eflujo, regulador	Transportador de eflujo
<i>czcD</i>	0	2	Cd, Zn, Co	Transportador eflujo, regulador	Transportador de eflujo
<i>dmeF</i>	5	4	Co, Cd, Ni	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>dmeR</i>	0	1	Co, Ni	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>dpsA</i>	2	3	Fe	Secuestra Fe	Otros mecanismos
<i>fieF/yiip</i>	2	2	Fe, Zn, Co, Cu	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>mco</i>	3	1	Cu	Oxida Cu	Transformación
<i>mctB</i>	0	2	Cu	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>mdtA</i>	0	33	Zn	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>mdtB</i>	6	10	Zn	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>merA</i>	19	52	Hg	Reduce y volatiliza Hg	Transformación
<i>merB2</i>	1	1	Hg	Organomercurio liasa (rompe enlace C-Hg de sustratos tóxicos como el acetato de fenilmercurio)	Transformación
<i>merB3</i>	2	2	Hg	Organomercurio liasa (rompe enlace C-Hg de sustratos tóxicos como el acetato de fenilmercurio)	Transformación
<i>merB4</i>	1	2	Hg	Organomercurio liasa (rompe enlace C-Hg de sustratos tóxicos como el acetato de fenilmercurio)	Transformación
<i>merB5</i>	1	1	Hg	Organomercurio liasa (rompe enlace C-Hg de sustratos tóxicos como el acetato de fenilmercurio)	Transformación
<i>mmco</i>	1	8	Cu	Oxida Cu	Transformación
<i>ncrC</i>	0	2	Ni, Co	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>nczA</i>	4	3	Ni, Co, Cd, Zn	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>nrsA</i>	14	6	Ni	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>pbrB/pbrC</i>	2	0	Pb	Importe, eflujo y acumulación de Pb(II)	Transportador de eflujo
<i>pcoA</i>	1	0	Cu	Determinantes genéticos responsables de la resistencia a Cu	Otros mecanismos
<i>pbrB/pbrC</i>	0	1	Pb	Importe, eflujo y acumulación de Pb(II)	Transportador de eflujo
<i>pgpA/ltpgpA</i>	2	14	As, Sb	No se conoce el mecanismo	No se conoce el mecanismo
<i>rcnA/yohM</i>	1	0	Ni, Co	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>recG</i>	10	21	Cr, Te, Se	Reparación del daño al ADN por estos iones	Otros mecanismos
<i>ruvB</i>	18	16	Cr, Te, Se	Reparación del daño al ADN por estos iones	Otros mecanismos
<i>silA</i>	6	8	Ag	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>silP</i>	1	6	Ag	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>tehB</i>	1	3	Te	Metila Te	Transformación
<i>terC</i>	0	1	Te	Proteína transmembrana que podría alterar el nivel intracelular de Te y/o provocar una barrera para la entrada	Otros mecanismos
<i>trgB</i>	4	5	Cu, Te	No se conoce el mecanismo	No se conoce el mecanismo
<i>yfmO</i>	0	1	Cu	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>zitB/ybgR</i>	3	5	Zn	Transportador eflujo	Transportador de eflujo
<i>zneB/hmxB</i>	1	0	Zn	Transportador eflujo	Transportador de eflujo

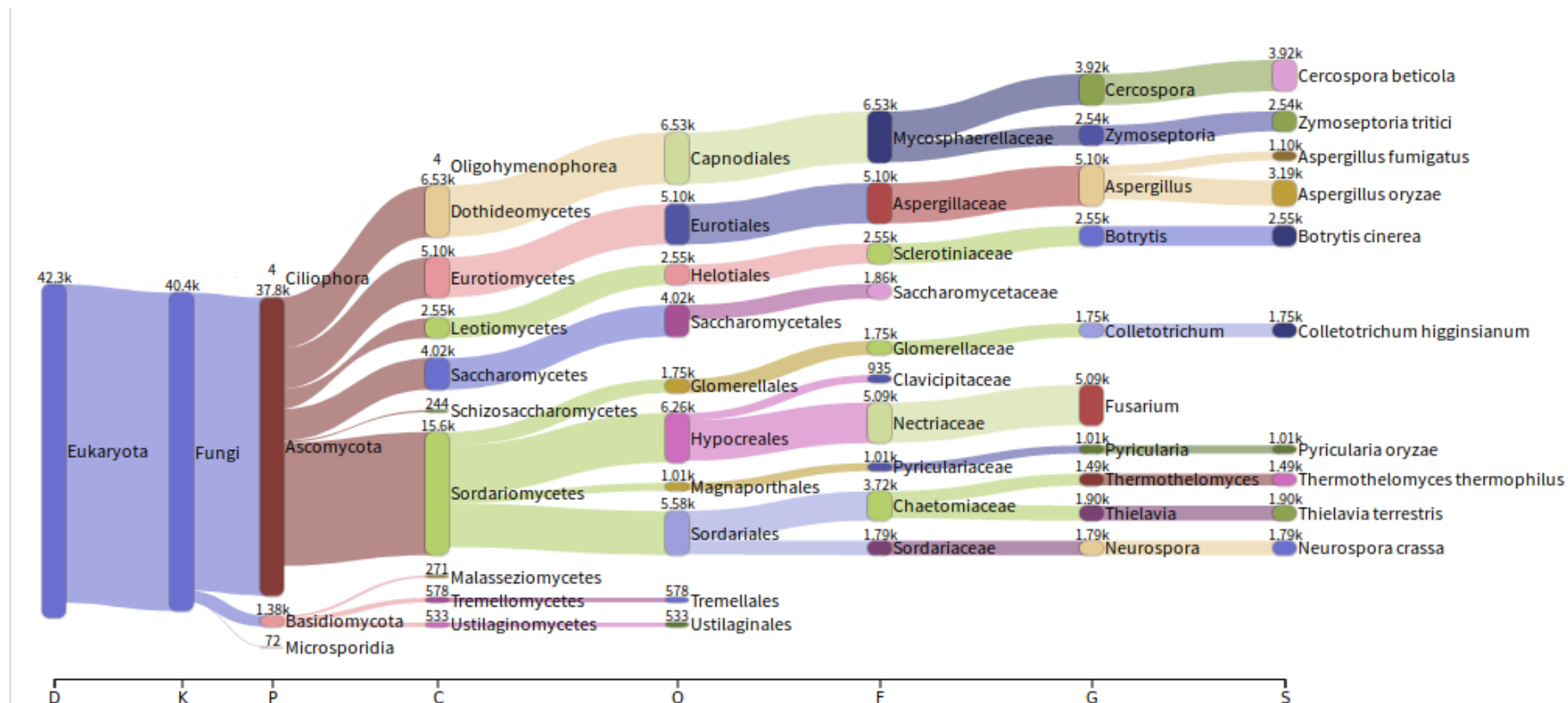


Figura suplementaria 4. Asignación taxonómica de los *reads* correspondientes al dominio Eukarya del metagenoma V7. (Sankey chart construido con Pavian en RStudio).

Tabla suplementaria 13. Crecimiento en medio sólido de los aislamientos.

Muestra	Cepa	Grupo	Género	s/metal agregado	AgNO ₃			CdCl ₂				CoCl ₂ ·6H ₂ O				
					0,05 mM	0,075 mM	0,1 mM	0,01 mM	0,05 mM	0,075 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,15 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
V6	UYEF1	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF2	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF3	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF4	Actinobacteria	<i>Marisediminicola</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF5	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF6	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF7	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF8	Gammaproteobacteria	<i>Pantoea</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF9	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF10	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF11	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF12	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF13	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	+	n.c.
V6	UYEF14	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF15	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF16	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF17	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF18	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF19	Actinobacteria	<i>Nakamurella</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF20	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	+	n.c.
V6	UYEF21	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	+	n.c.
V6	UYEF22	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF23	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF24	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF25	Gammaproteobacteria	<i>Phytobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF27	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF29	Alphaproteobacteria	<i>Brevundimonas</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF30	Alphaproteobacteria	<i>Polymorphobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF31	Actinobacteria	<i>Kitasatospora</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF32	Gammaproteobacteria	<i>Phytobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF33	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	UYEF35	Bacteroidetes	<i>Spirosoma</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	UYEF36	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	+	n.c.
V6	UYEF37	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	YYP1	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	YYP2	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	YYP3	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	YYP4	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	YYP5	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	+	+	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.d.	+	+	n.c.
V6	YYP6	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.c.
V6	YYP7	Bacteroidetes	<i>Kaistella</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.
V6	YYP8	Bacteroidetes	<i>Kaistella</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.
V6	YYP9	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.
V6	YYP10	Actinobacteria	<i>Agrococcus</i>	+	±	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.d.	+	+	n.c.
V6	YYP11	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i>	+	±	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	YYP12	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	YYP13	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	+	+
V6	YYP14	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	+	n.c.
V6	YYP15	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	+	n.c.
V6	YYP16	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V6	YYP18	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V6	YYP20	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	+	n.c.
V6	Mn621	Actinobacteria	<i>Glacihabitans</i>	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.

Continuación Tabla suplementaria 13. Crecimiento en medio sólido de los aislamientos.

Muestra	Cepa	Grupo	Género	s/metal agregado	AgNO ₃			CdCl ₂			CoCl ₂ ·6H ₂ O					
					0,05 mM	0,075 mM	0,1 mM	0,01 mM	0,05 mM	0,075 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,15 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
V7	Ag731	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Ag732	Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i>	+	+	n.c.	+	n.d.	±	±	±	+	+	+	±	n.c.
V7	Ag733	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	±	n.c.	+	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	±	n.c.
V7	Co721	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	+	n.c.
V7	Co722	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Co724	Actinobacteria	<i>Mycolicibacterium</i>	±	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	±	±	±	n.c.	n.c.
V7	Co726	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	±	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	±	±	±	n.c.	n.c.
V7	Co731	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	±	n.c.
V7	Co732	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	+	±
V7	Cu711	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	±	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.
V7	Cu712	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	±	±	n.c.	n.c.
V7	Cu716	Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i>	±	+	n.c.	+	n.d.	±	±	±	±	±	±	n.c.	n.c.
V7	Cu721	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Cu722	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Cu723	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Cu731	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Mn731	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Ni721	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	±	n.c.
V7	Ni722	Actinobacteria	<i>Parafrigoribacterium</i>	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Ni723	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Ni724	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	n.c.	n.c.
V7	Ni731	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	+	±	n.c.
V7	Zn731	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	n.c.	n.c.	±	+	+	n.c.	n.c.
V7	Zn732	Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	+	±	±	n.c.	n.c.
V7	UYP22	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	±	±	±
V7	UYP23	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V7	UYP24	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V7	UYP25	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V7	UYP26	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.
V7	UYP27	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.
V7	UYP34	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i>	+	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.

Tabla suplementaria 14. Crecimiento en medio sólido de los aislamientos.

Muestra	Cepa	Grupo	Género	s/metal agregado	CuSO ₄			MnCl ₂ ·4H ₂ O					NiCl ₂			ZnSO ₄			
					0,5 mM	1 mM	2 mM	0,5 mM	1 mM	2,5 mM	3 mM	5 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM	5 mM
V6	UYEF1	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF2	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF3	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF4	Actinobacteria	<i>Marisediminicola</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF5	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF6	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF7	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	+	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF8	Gammaproteobacteria	<i>Pantoea</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	+	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF9	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF10	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF11	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF12	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF13	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF14	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF15	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF16	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF17	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.c.
V6	UYEF18	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF19	Actinobacteria	<i>Nakamurella</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF20	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	+	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF21	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	+	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF22	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF23	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF24	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF25	Gammaproteobacteria	<i>Phytobacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF27	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF29	Alphaproteobacteria	<i>Brevundimonas</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF30	Alphaproteobacteria	<i>Polymorphobacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF31	Actinobacteria	<i>Kitasatospora</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF32	Gammaproteobacteria	<i>Phytobacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF33	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.c.
V6	UYEF35	Bacteroidetes	<i>Spirosoma</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF36	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	+	n.d.	+	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYEF37	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP1	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	+	+	±	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.c.	+	+	n.d.	+
V6	UYP2	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP3	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP4	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	±	±	n.d.	n.c.
V6	UYP5	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	+	+	±	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.	n.c.	+	+	n.d.	n.c.
V6	UYP6	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP7	Bacteroidetes	<i>Kaistella</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP8	Bacteroidetes	<i>Kaistella</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP9	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.c.	+	+	n.d.	+
V6	UYP10	Actinobacteria	<i>Agrococcus</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.	n.c.	+	+	n.d.	n.c.
V6	UYP11	Betaproteobacteria	<i>Moraxella</i>	+	±	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.	n.c.	+	+	n.d.	n.c.
V6	UYP12	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP13	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP14	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.	n.c.	+	+	n.d.	n.c.
V6	UYP15	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP16	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP18	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	UYP20	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.
V6	Mn621	Actinobacteria	<i>Glacihabitans</i>	+	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.d.

Continuación Tabla suplementaria 14. Crecimiento en medio sólido de los aislamientos.

Muestra	Cepa	Grupo	Género	s/metal agregado	CuSO ₄			MnCl ₂ ·4H ₂ O					NiCl ₂			ZnSO ₄				
					0,5 mM	1 mM	2 mM	0,5 mM	1 mM	2,5 mM	3 mM	5 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM	5 mM	
V7	Ag731	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	+	±	±	n.c.	n.d.	+	+	+	+	±	n.c.	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Ag732	Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i>	+	+	+	n.c.	n.d.	+	+	±	±	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.d.	
V7	Ag733	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	+	+	n.c.	n.d.	+	+	±	±	+	+	n.c.	±	+	n.c.	n.d.	
V7	Co721	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	±	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Co722	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	±	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Co724	Actinobacteria	<i>Mycolicibacterium</i>	±	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	±	±	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Co726	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	±	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	±	±	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Co731	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	+	±	±	±	n.c.	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Co732	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	±	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Cu711	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	±	±	±	n.c.	n.d.	±	±	±	±	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Cu712	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	±	n.c.	n.d.	±	±	±	±	±	n.c.	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Cu716	Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i>	±	+	+	n.c.	n.d.	±	±	n.c.	n.c.	+	+	n.c.	+	+	n.c.	n.d.	
V7	Cu721	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Cu722	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	+	+	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	±	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Cu723	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	±	±	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Cu731	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	+	+	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Mn731	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	±	±	n.c.	n.d.	±	+	n.c.	n.c.	±	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Ni721	Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Ni722	Actinobacteria	<i>Parafriaribacterium</i>	+	±	±	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Ni723	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Ni724	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	+	+	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Ni731	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.c.	±	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Zn731	Alphaproteobacteria	<i>Devosia</i>	+	+	±	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.d.	
V7	Zn732	Actinobacteria	<i>Cryobacterium</i>	+	+	±	n.c.	n.d.	+	+	+	+	+	n.c.	n.c.	+	+	n.c.	n.d.	
V7	UYP22	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	
V7	UYP23	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	
V7	UYP24	Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.c.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	
V7	UYP25	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	
V7	UYP26	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	
V7	UYP27	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	+	+	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	
V7	UYP34	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i>	+	n.c.	n.c.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.d.	n.c.	

Nota: Los colores mostrados corresponden al color de cada colonia; +: crecimiento; n.c.: no creció; ±: poco crecimiento.