



The World's Largest Open Access Agricultural & Applied Economics Digital Library

This document is discoverable and free to researchers across the globe due to the work of AgEcon Search.

Help ensure our sustainability.

Give to AgEcon Search

AgEcon Search
<http://ageconsearch.umn.edu>
aesearch@umn.edu

Papers downloaded from AgEcon Search may be used for non-commercial purposes and personal study only. No other use, including posting to another Internet site, is permitted without permission from the copyright owner (not AgEcon Search), or as allowed under the provisions of Fair Use, U.S. Copyright Act, Title 17 U.S.C.

No endorsement of AgEcon Search or its fundraising activities by the author(s) of the following work or their employer(s) is intended or implied.

APLICACIÓN DE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA EL ESTUDIO Y EXPLORACIÓN DE DIVERSIDAD MICROBIANA Y SU APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO

APPLICATION OF MASSIVE SEQUENCING TO STUDY AND EXPLORATION MICROBIAL DIVERSITY AND ITS BIOTECHNOLOGICAL USE

Cadena-Zamudio, J.D.¹; Martínez-Peña, M.D.¹; Guzmán-Rodríguez, L.F.¹; Arteaga-Garibay, R.I.^{1*}

¹ Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Boulevard de la Biodiversidad 400, Rancho las Cruces. C.P. 47600 Tepatitlán de Morelos, Jalisco. México.

*Autor de correspondencia: arteaga.ramon@inifap.gob.mx

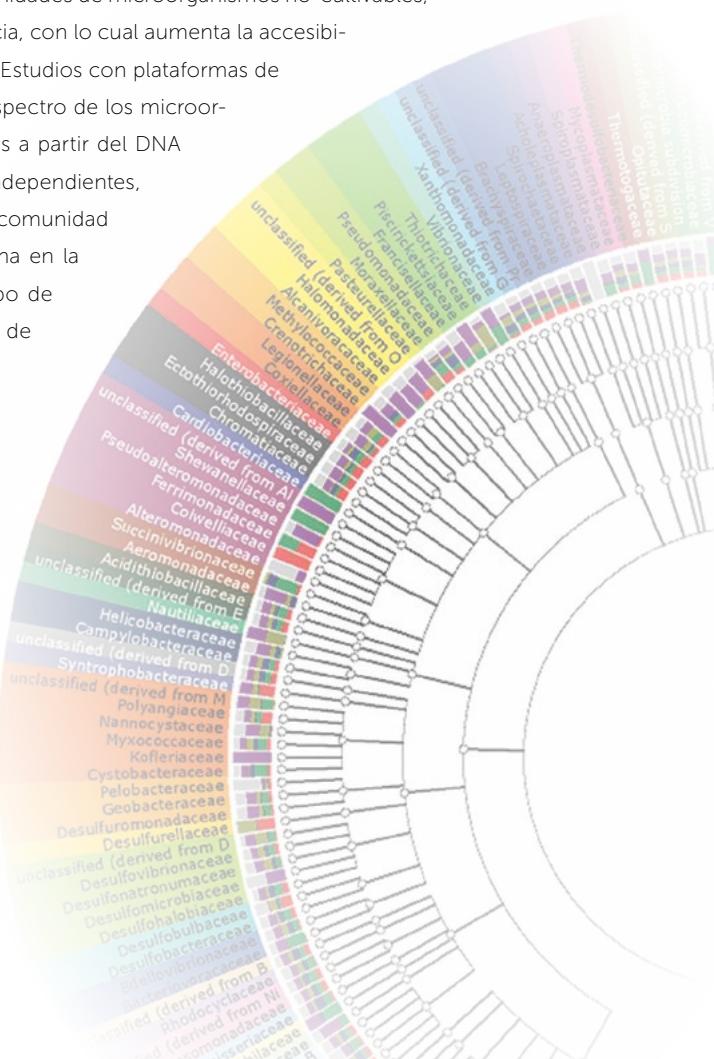
RESUMEN

Se describe brevemente las metodologías más importantes de la metagenómica como técnica alternativa a métodos clásicos de cultivo para el estudio de microorganismos. Cerca de 99% de los microorganismos no pueden ser cultivados fácilmente, por ello se ha registrado un aumento en el uso de tecnologías que ofrecen respuestas rápidas, económicas y de mayor precisión sobre la información de genomas. Una de estas tecnologías es la secuenciación de próxima generación (NGS) ubicada como herramienta emergente para estudiar comunidades de microorganismos no-cultivables; por su capacidad de obtener grandes volúmenes de datos de secuencia, con lo cual aumenta la accesibilidad de los recursos genéticos contenidos, por ejemplo en un suelo. Estudios con plataformas de NGS en ácidos nucleicos extraídos de rizósfera proveen un amplio espectro de los microorganismos que la habitan, además de obtener y amplificar fragmentos a partir del DNA genómico de la comunidad y ser analizados por técnicas cultivo-independientes, capaces de mostrar la influencia de la planta sobre la estructura de la comunidad microbiana y deducir que la composición de la microbiota bacteriana en la rizósfera se ve afectada por un complejo de interacción entre el tipo de suelo, la especie hospedera y circundantes y la localización de la raíz de la planta hospedera.

Palabras clave: Meta genómica, Microbioma, Rizósfera, NGS (Next Generation sequencing).

ABSTRACT

A brief revision of the most important methodologies of metagenomics was carried out, to describe the approaches where it makes incursions, as an alternative technique to classic cultivation methods for the study of microorganisms. Close to 99 % of microorganisms cannot be easily cultivated, so technologies that offer fast, economic and more precise



Agroproductividad: Vol. 9, Núm. 2, febrero. 2016, pp: 70-83.

Recibido: diciembre, 2015. **Aceptado:** febrero, 2016.

responses about genomes are applied. Next generation sequencing (NGS) is described as an emerging tool to study communities of non-cultivable microorganisms, used because of its capacity to obtain large volumes of sequencing data, with which the accessibility to genetic resources contained, for example, in soils, is increased. Studies with NGS platforms on nucleic acids extracted from rhizosphere provide a broad spectrum of microorganisms that inhabit it, in addition to obtaining and amplifying fragments from genomic DNA in the community, and being analyzed through crop-dependent techniques, capable of showing the influence of one plant on the structure of the microbe community and deducing that their composition in the rhizosphere is affected by a complex of interaction between the type of soil, the hosting and surrounding species, and the localization of the root from the host plant.

Palabras clave: Metagenomics, microbiome, rhizosphere, NGS (Next Generation Sequencing).

INTRODUCCIÓN

La actividad

y diversidad de la microbiota son algunas de las condicionantes en la fertilidad, estabilidad y funcionamiento de ecosistemas y agroecosistemas. La diversidad microbiana es esencial para garantizar los ciclos de nutrientes y procesos de descomposición del material vegetal en cualquier ecosistema terrestre debido a que procesos biológicos tales como, oxidación, reducción, descomposición de materia orgánica y mineralización, así como, interacciones interespecíficas e intraespecíficas que se establecen, están reguladas por microorganismos que habitan en ese nicho. Por ello el aumento en el conocimiento de la diversidad microbiana se ha convertido en una de las líneas de investigación más relevantes de la ecología; pues sus múltiples aportes en el conocimiento de la función, estructura, evolución y relación de poblaciones que la componen la postulan como una fuente emergente en la investigación médica y biotecnológica (López-Reyes *et al.*, 2015; Acinas, 2007). La mayoría de formas vivientes en la Tierra son de tamaño microscópico y habitan casi en cualquier ambiente,

desde lugares muy fríos con temperaturas inferiores a 0 °C, hasta sitios muy cálidos supriores a 100 °C (Hernández-

León *et al.*, 2010), así como, en sustratos muy ácidos, muy alcalinos, de presión elevada, y en general

cualquier otro ambiente inusual desde el punto de vista humano y son denominados extremófilos (Bulgarelli *et al.*, 2013). Debido a su tamaño pequeño y su diversidad, trabajar

con microorganismos no es sencillo ya que muchos de estos al no encontrarse en

condiciones similares a las de sus ecosistemas naturales no pueden cultivarse

in vitro; se estima que cerca del 99% de una comunidad microbiana presen-

te en el ambiente no es realmente accesible por métodos tradicionales

de aislamiento microbiológico tales como: cultivo en medios micro-

biológicos, microscopia, caracterización bioquímica y metabólica

(placas EcoPlate^{MR} de BIOLOG). Estas herramientas tienen un es-

pectro limitado para su uso en la clasificación e identificación,

sobre todo, para microorganismos de difícil desarrollo, lo que

abre paso al estudio con estrategias alternativas e indepen-

dientes del cultivo (Metzker, 2010; Nichols, 2007); con ellas

la necesidad de cultivar las bacterias presentes en una

muestra, ha sido sustituida por la capacidad de aislar y

caracterizar el material genético presente de cada uno

de los microorganismos encontrados en una muestras

de suelo o de cualquier nicho ecológico determina-

do, también llamado “metagenoma” (Handelsman *et*

al., 2002). El desarrollo de nuevas técnicas de biología

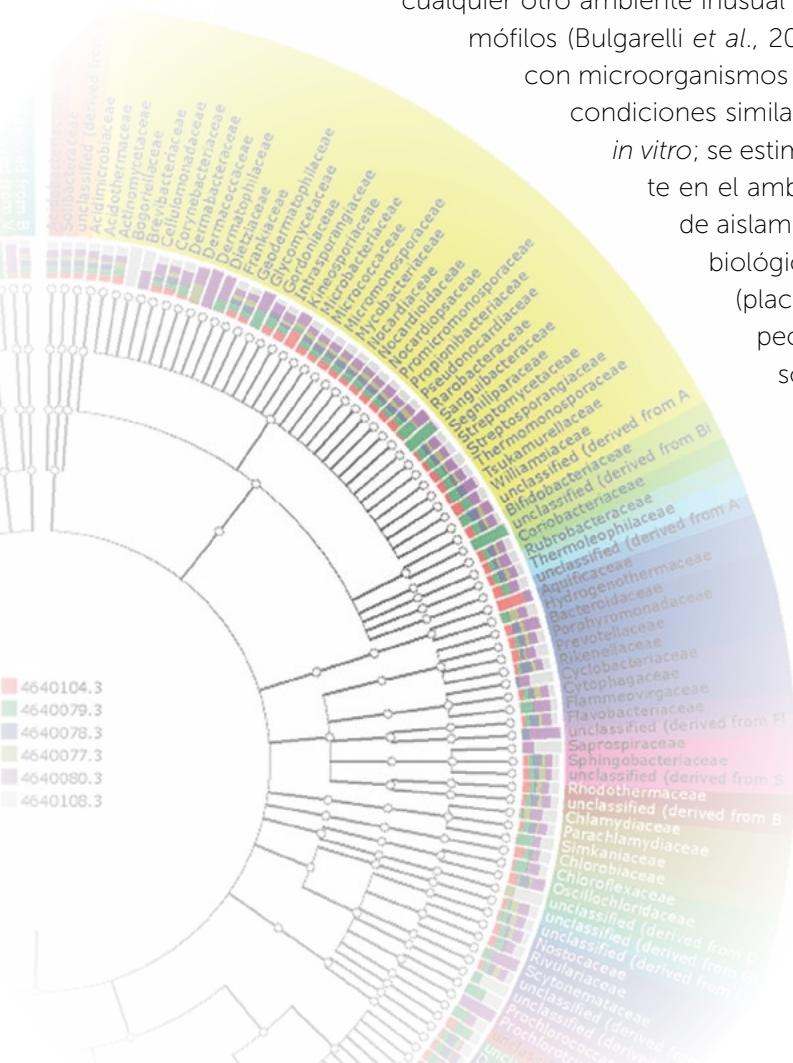
molecular para el estudio de las comunidades micro-

bianas se ha vuelto una herramienta importante en el

campo de la microbiología, ya que con ellas se puede

estudiar el ambiente microbiano con mayor detalle

para describir su estructura y la función que desem-
peñan en estos ambientes bajo condiciones naturales



(Metzker, 2010; Schmeisser *et al.*, 2007). Los métodos moleculares basados en el análisis de DNA o RNA representan un grupo de herramientas muy útiles para analizar las comunidades microbianas (Figura 1), estos incluyen la amplificación de blancos moleculares para detectar e identificar un microorganismo, o indagar la funcionalidad de ciertos genes relacionados a su metabolismo (Wang *et al.*, 2011; Carvalhais *et al.*, 2013; de Zelicourt; Dey *et al.*, 2014).

De igual forma, se pueden estudiar comunidades microbianas con un enfoque metagenómico en el que se obtienen cantidades de datos mayores (Giga o Tera bases de nucleótidos) a procesar ya que estos son del total de organismos existentes en ese ambiente (Shakya *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2013; Bulgarelli *et al.*, 2015). Los enfoques metagenómicos se impulsaron con los avances en la secuenciación masiva de ácidos nucleicos que permitió obtener información de las porciones de microorganismos cultivables y no cultivables, aún de ambientes

diversos, así como, la detección de genes asociados a la biosíntesis de enzimas, proteínas u otros metabolitos relevantes con alguna aplicación biotecnológica o con beneficio en actividades humanas diversas (Shakya *et al.*, 2010; Avneet y Vakhlu, 2015; Lorenz y Eck, 2005). Con base en lo anterior, se realizó una breve revisión acerca de las aplicaciones de secuenciación masiva del DNA en el estudio de la diversidad microbiana, con el fin de facilitar su comprensión en el campo de la microbiología (Figura 1).

Las ciencias Ómicas

Un estudio con herramientas meta-ómicas (Cuadro 1), normalmente tiene como objetivo identificar la diversidad de organismos microbianos, genes, variantes y funciones metabólicas que caracterizan la comunidad microbiana que habita una muestra medio ambiental. La metagenómica como término se refiere a la secuenciación específica de DNA de toda la comunidad; esta puede ser complementada por estudios transcriptómicos (secuenciación de ADNc) y tecnologías funcionales, tales como proteómica y metabolómica (Wilmes y Bond, 2006; Turnbaugh y Gordon, 2008; Gilbert y Hughes, 2011). Los enfoques metagenómicos y transcriptómicos evalúan en particular la composición genómica y la diversidad dentro y entre las comunidades microbianas por medio de las tecnologías de secuenciación, incluyendo la secuenciación dirigida RNAr genes (16S en bacterias, 18S en eucariotas, y el espaciador interno transrito, por lo general en los hongos (Segata *et al.*, 2013).

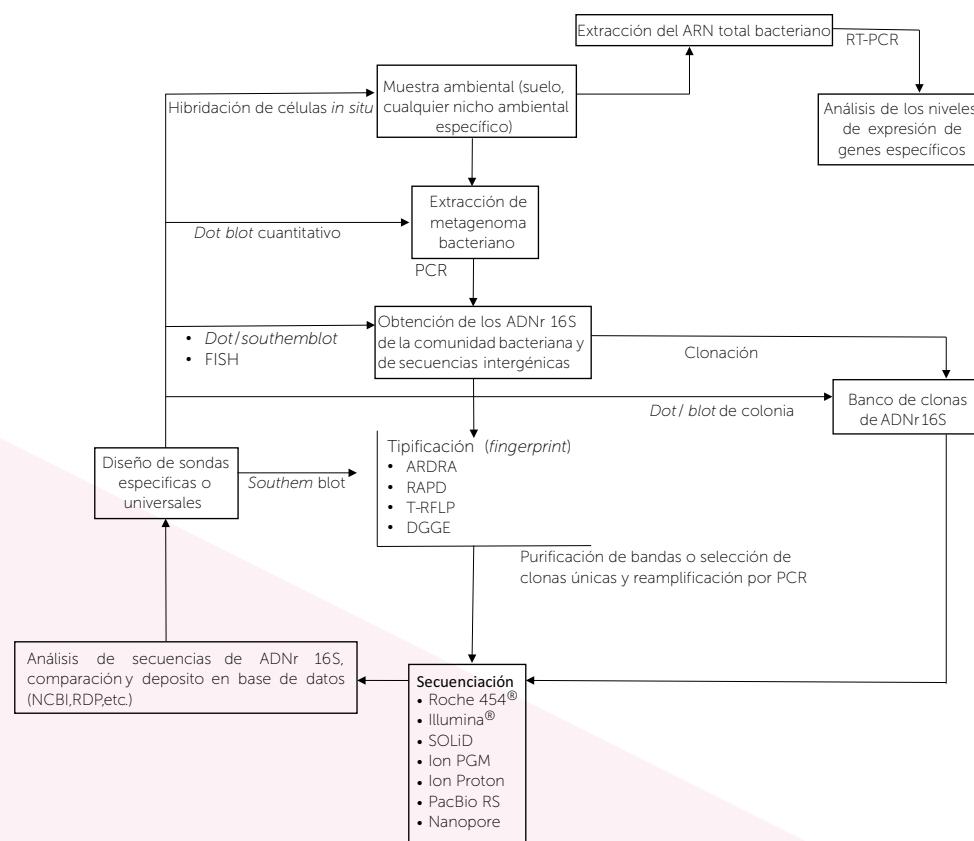


Figura 1. Técnicas moleculares no dependientes del cultivo microbiano utilizadas en el análisis de la diversidad bacteriana de suelos. Abreviaciones: **NCBI**: National Center for Biotechnology Information; **RDP**: Ribosomal Database Project; **FISH**: hibridación fluorescente *in situ*; **PCR**: reacción en cadena de la polimerasa; **ARDRA**: análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado; **RAPD**: amplificación aleatoria de ADN; **T-RFLP**: polimorfismo de fragmentos de restricción terminales; **DGGE**: electroforesis desnaturizante de gradiente en gel; **RT-PCR**: PCR en tiempo real (Tomada y modificada de Escalante-Lozada *et al.*, 2004)

Este escrito se centra en la metagenómica, la cual permite el estudio de los genomas obtenidos de muestras ambientales, vegetales, animales y humanos; esta área se define por la aplicación de técnicas modernas en ciencias genómicas que

Cuadro 1. Descripción de las diferentes áreas de las ciencias Ómicas (tomado y modificado de García-Vallejo, 2004).

Nivel de análisis	Definición	Método de análisis
Metagenoma	Conjunto completo de genes y genomas de un microbioma	Secuenciación del material genético
Transcriptoma	Conjunto completo de moléculas de RNAm presentes en células, tejido u órgano	Hibridación. SAGE (análisis seriado de la expresión de genes). Microplataformas de DNA.
Proteoma	Total de moléculas proteicas presentes en células, tejido u órgano	Electroforesis bidimensional. Microplataformas de péptidos.
Metaboloma	Conjunto completo de metabolitos (intermediarios de bajo peso molecular) en células, tejido u órgano	Espectroscopia con luz infrarroja. Espectrometría de masas. Espectrometría con resonancia nuclear magnética

incluye el estudio de las comunidades de organismos microbianos; y que requieren de la obtención de los ácidos nucleicos totales de una muestra representativa del entorno natural, lo cual no condiciona el aislamiento y cultivo de la fracción cultivable (Shakira *et al.*, 2010); esta herramienta puede ser utilizada para el descubrimiento de nuevos microorganismos y sus productos naturales y funciones metabólicas (He *et al.*, 2007). La metagenómica combina una gran cantidad de técnicas moleculares desarrolladas al final de la segunda mitad del siglo XXI (Daniel, 2005), lo que ha permitido el investigar de forma más amplia la ecología microbiana y sus interacciones con otros seres vivos; y describir el potencial biotecnológico que presentan estos microorganismos (Helen y Wolfgang, 2005). Este tipo de perfiles “funcionales” pueden ser inferidos utilizando información de referencia del genoma o por mapeo del mismo (a nivel de nucleótidos), también se puede deducir la funcionalidad de un gen o proteína mediante búsquedas en bases de datos como NCBI, KEGG, SEED (Segata *et al.*, 2013). Ofrece además el potencial de una visión imparcial relativa en la composición genética de las comunidades microbianas complejas; perspectiva que ha sido difícil de alcanzar y que es crucial debido al impacto fundamental que estas co-

munidades tienen en la salud humana, animal y ciclos biogeoquímicos globales (Turnbaugh *et al.*, 2006; Gómez-Álvarez *et al.*, 2009), y aunque los metagenómas proporcionan ideas provocativas de la capacidad metabólica de las comunidades microbianas y otros ambientes, es imperativo entender sus limitaciones (Gómez-Álvarez *et al.*, 2009), tales como, su uso a nivel diagnóstico, el excesivo volumen de datos genómicos obtenidos, la dificultad en la interpretación de resultados y la obtención de un gran número de resultados inesperados, posible contaminación o nuevas inserciones, duplicaciones de segmentos, perdida de fragmentos en la lectura de genes o genomas y cambios de algoritmos utilizados entre un tipo de secuenciador y otro (Alkan *et al.*, 2011; Wold y Myers, 2008).

Plataformas de secuenciación de próxima generación (NGS)

Las tecnologías de secuenciación masiva incluyen una serie de pasos universales que se agrupan en términos generales en la preparación de bibliotecas y templado, reacción de secuenciación, y análisis de datos (Figura 2). La combinación única de protocolos específicos distingue a cada una de las tecnologías y determina el tipo y cantidad de datos producidos de una plataforma a otra. Las diferencias entre platafor-

mas son notables al comparar los datos obtenidos en calidad, cantidad y costo de la secuenciación (Wold *et al.*, 2008; Metzker, 2010; Alkan *et al.*, 2011). Aunque las puntuaciones de calidad y precisión de las estimaciones son proporcionadas por cada fabricante, no hay consenso establecido para determinar una “calidad mínima” de las secuencias, es decir, no se puede hacer una equivalencia entre una plataforma y otra, debido a diversas métricas de secuenciación utilizadas por las diferentes tecnologías (Metzker, 2010). Los distintos sistemas de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés: Next-Generation Sequencing) tienen en común la alta producción de datos, a partir de la secuenciación masiva en paralelo en el orden de las “Gigabases” o “Terabases”. A menudo, los instrumentos de NGS se clasifican como tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación (Schadt *et al.*, 2010; Niedringhaus *et al.*, 2011; Pareek *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012); y hasta el momento no existe una definición coherente para esta terminología, y es difícil asignar a todos los instrumentos de forma inequívoca a una u otra categoría (Schadt *et al.*, 2010; Thompson y Milos, 2011). De manera general se hace referencia como instrumentos de secuenciación de segunda generación a to-

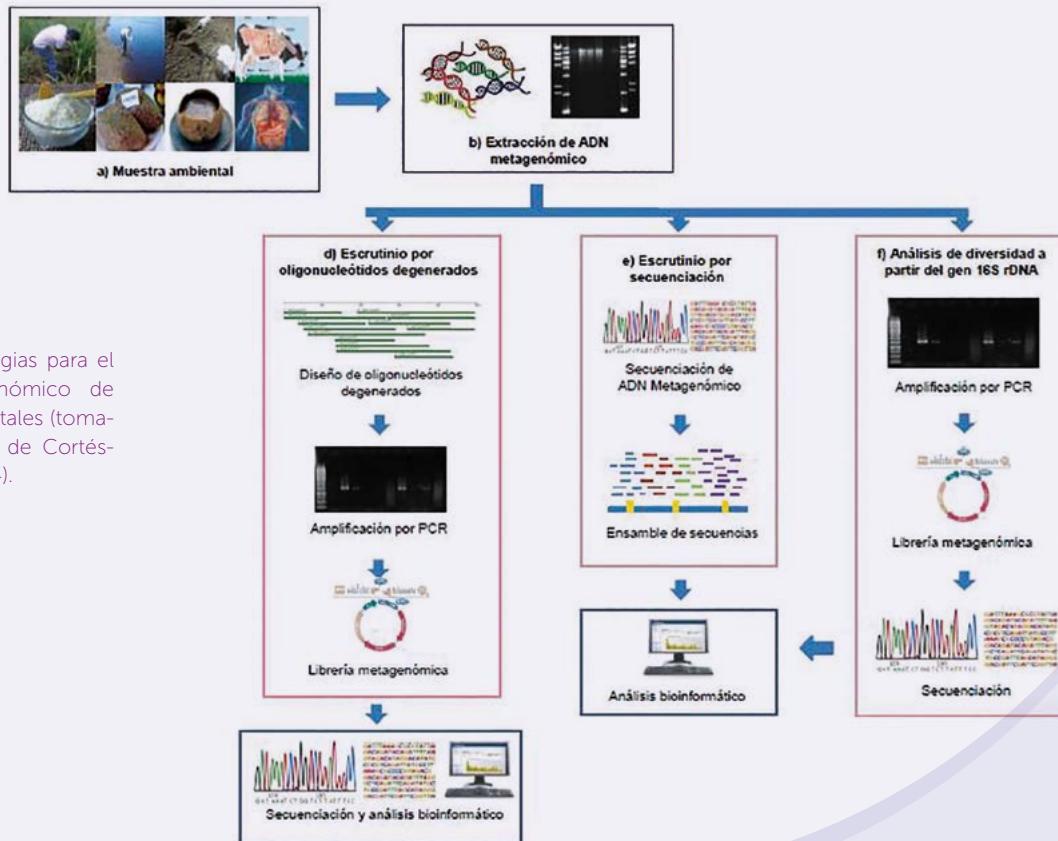


Figura 2. Estrategias para el estudio metagenómico de muestras ambientales (toma da y modificada de Cortés-López *et al.*, 2014).

dos aquellos métodos dependientes de una etapa de amplificación vía una PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para la intensificación de la señal antes de la reacción de secuenciación, las cuales incluyen plataformas tales como, 454 Life Sciences de Roche®, las diferentes plataformas de Illumina® y las plataformas de Life Technologies el SOLiD® (por sus siglas en inglés "Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection") y la Ion Torrent™ (Knief, 2014).

La única plataforma de secuenciación que se considera como de tercera generación es la PacBio RS® (Pacific Biosciences), que es capaz de secuenciar pequeños fragmentos de DNA miles de veces con gran precisión y leer secuencias de DNA que tengan un largo de entre 1,000 bases y 1,200 bases, lo que sin duda ayuda a resolver problemas asociados a la segunda generación de secuenciadores, es decir, regiones homopoliméricas, repeticiones en tandem, lecturas cortas; representando un avance significativo respecto a otras plataformas cuya máxima capacidad de lectura es cercana a 100 bases (Knief, 2014; Merriman *et al.*, 2012; Metzker, 2010). Otra gran ventaja es que cada lectura del PacBio® costaría USD \$100, 10 veces menos de lo que cuesta una corrida en las actuales plataformas, con una velocidad de

secuenciación de solo 12 horas por corrida (Knief, 2014) (Cuadro 2).

Ventajas de la secuenciación masiva

La mayor ventaja de la metagenómica respecto a los métodos dependientes de cultivo, es que se brinda información de la estructura de las comunidades microbianas (riqueza y distribución) (Figura 5), sus genomas, análisis funcionales de genes, proteínas, enzimas y metabolitos secundarios, análisis filogenéticos y taxonómicos a nivel de especie, análisis de transferencia horizontal de genes y muchos más, entre diversos tipos de microorganismos, de los cuales destacan las bacterias, hongos, arqueas y virus (Hugenholtz y Tyson, 2008). Este conocimiento puede aumentar la información de la relación existente entre el hospedero y microorganismo con aplicación en estados diferentes de salud o etapas de crecimiento. Otros estudios han revelado la capacidad funcional de los organismos en el aparato gastrointestinal u oral de diversas especies, que incluyen al ser humano (Beldá-Ferre *et al.*, 2011; Kurokawa *et al.*, 2007; Turnbaugh *et al.*, 2009), roedores (Turnbaugh *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2008), ciervos (Brulc *et al.*, 2009), pollos (Qu *et al.*, 2008), aves (Stevens y Hume, 1995; Kohl, 2012), peces (Engeszer *et al.*, 2007; Roeselers *et al.*, 2011), insectos

Cuadro 2. Especificaciones tecnológicas de plataformas de secuenciación de próxima generación (modificada de Krief, 2014).

Compañía	Plataforma	Amplificación de librería	Portador de Biblioteca, moléculas o perlas durante la secuenciación	Principio de secuenciación	Modificaciones de nucleótido	Método de detección de señal	Máxima salida de datos por corrida
Roche®	454	PCR en emulsión con microesferas	Picotiterplate	Pirosecuenciación	Solo para dATP, se une como tiol derivado de dATP α S	Detección de luz emitida en reacciones secundarias iniciadas por la liberación de PP al incorporarse un nucleótido	35-700 Mb
Illumina® Inc., 2016	Illumina	PCR fluida en núcleos unidos a la superficie celda	Celda de flujo	Secuenciación por síntesis desde el extremo libre	Nucleótidos bloqueados en el extremo 3' con fluorocromos	Detección óptica de emisión de nucleótidos con extremos fluorescentes	3-600 Gb
Thermofisher Sci. Inc., 2016	SOLiD	PCR en emulsión con microesferas o PCR fluida en superficie de una celda	Celda de flujo	Secuenciación por ligación	2 bases codificadas en los iniciadores con fluorescencia	Detección óptica de emisión de nucleótidos con extremos fluorescentes	<1-260 Gb
Ion Torrent™	Ion PGM Ion Proton	PCR en emulsión microesferas	Chip semiconductor	Secuenciación por síntesis	Ninguno	Detección de H ⁺ liberados por la incorporación de nucleótido	60-2000 Mb <1-10 Gb
Pacific biosciences®	PacBio RS	No aplica	SMRT	Fósforo fluorescente ligado a nucleótidos	Fosfolípido unido a nucleótidos fluorescentes	Detección óptica en tiempo real de polimerasa modificada con fluorescencia en sitio de incorporación	400 Mb
Oxford Nanopore Technologies, 2016	MinION	Análisis electrónico de moléculas con un nanoporo		DNA polymers through a protein nanopore			>200 Kb

(Basset *et al.*, 2003; Hongoh, 2010; Köhler *et al.*, 2012; Minard *et al.*, 2013). También se ha logrado encontrar enzimas con homologías muy bajas a las existentes, las cuales se han utilizado para algún fin biotecnológico (Danil, 2004).

Aplicación de estudios metagenómicos en la biotecnología

Actualmente, se sabe que el suelo es el ambiente natural más rico y diverso de todos los que se puedan encontrar

en la tierra por su diversidad y complejidad microbiológica (Rolf, 2005; Gans *et al.*, 2005; Méndez, 2013), y se dice que 1 g⁻¹ de suelo puede contener más de 10 billones de microorganismos y miles de especies (Rosello y Amann, 2001), lo anterior se relaciona con reportes donde se describe que 30 g⁻¹ de suelo contienen cerca de 500,000 especies (Shakira *et al.*, 2010); y se ha estimado que 1 g⁻¹ de suelo podría contener cerca de 3,000 o más genomas, de los cuales solo 1% se puede aislar por técnicas de cultivo (Rolf, 2005; Shakira *et al.*, 2010). Estos

datos ayudan a ilustrar que la diversidad metagenómica del suelo es un campo nuevo, amplio y rico para la búsqueda de nuevas enzimas y componentes bioactivos con posible uso biotecnológico. Los estudios de diversidad microbiana con herramientas que involucren plataformas de NGS pueden proporcionar una evaluación independientes de cultivo de la reserva genética de las comunidades microbianas del suelo, pues comprende el aislamiento del DNA ambiental, y con ello la construcción y selección de bibliotecas que permitan describir de forma más confiable un escenario más completo de las comunidades en el ambiente estudiado, y comprender mejor las interacciones entre microorganismos y ambiente (Shakira *et al.*, 2010). La metagenómica ofrece la posibilidad no sólo de analizar la diversidad filogenética de biopelículas ambientales sino también de localizar genes y operones que codifican biomoléculas novedosas, tales como, antimicrobianos, enzimas, pigmentos, entre otros metabolitos; lo que podría permitir el aislamiento de productos derivados y potenciar su uso para la producción a gran escala (Schmeisser *et al.*, 2007; Shakira *et al.*, 2010; Knief, 2014). Los estudios metagenómicos han tenido un impacto relevante en la industria farmacéutica, principalmente en la búsqueda de antimicrobianos mediante la creación de bibliotecas metagenómicas para la detección de genes asociados a las rutas biosintéticas de estos o de genes homólogos involucrados en grupos microbianos relacionados (Gillespie *et al.*, 2002; Brady *et al.*, 2004); también se tienen reportes enfocados en la exploración de la biosíntesis de vitaminas en muestras de suelo para búsqueda de nuevos genes, tales como, el de biotina, existe un reporte de su detección vía la construcción de siete cosmidos obtenidos a partir suelo forestal (Entcheva *et al.*, 2001). De igual forma se han identificado enzimas amilolíticas a partir de bibliotecas de DNA metagenómico (Yun *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2005). Otro descubrimiento fue la palmitoylputrescina aislada a partir de bibliotecas metagenómicas de un tanque de agua de bromelias (Diaz-Torres *et al.*, 2003). Otros estudios con búsqueda funcional de celulasas a partir de bibliotecas metagenómicas generadas de suelo, revelaron un total de ocho clonas celulolíticas, de las cuales solo una fue purificada y caracterizada para su utilización en la industria textil (Voget *et al.*, 2006) debido a diversas aplicaciones de las celulasas en diferentes ramas económicas, tales como, la producción de químicos, combustible, alimentos, fabricación

de cerveza y vino, alimentación, textil, papel, y agricultura, entre otras (Sun y Cheng, 2002; Bhat, 2000). Elend *et al.* (2006), lograron identificar una serie de nuevos genes codificantes para enzimas lipolíticas, tales como, esterasas y lipasas, de las cuales, una fue la esterasa EstCE1, que se derivó a partir de DNA metagenómico aislado de suelo, mostrando alto nivel de estabilidad, que la convirtió en un hallazgo muy útil para aplicaciones biotecnológicas (Lorenz y Eck, 2005).

Uno de los principales beneficios de la aplicación de la metagenómica en estudios de farmacología es el aumento en el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a antibióticos bacterianos, lo cual permite desarrollar compuestos para inhibir dicha resistencia (Helen y Wolfgang, 2005). Otro punto es el esclarecimiento de la diversidad de enzimas que se pueden encontrar en las bibliotecas metagenómicas y la identificación de variaciones en las características funcionales de las enzimas que les confiere especial interés para el campo farmacéutico y biotecnológico (Lorenz y Eck, 2005; Voget *et al.*, 2006; Schmeisser *et al.*, 2007). La gama completa de productos de genes potencialmente interesantes puestos a disposición en las bibliotecas metagenómicas aún no ha llegado a su máxima expresión, pues el hecho de poder descubrir o identificar nuevos genes, enzimas o proteínas en cada muestra y análisis, brinda un panorama casi ilimitado para el campo de la ciencia en general (Eyers *et al.*, 2004). Por estas razones el uso de la metagenómica como herramienta para descubrir, analizar, y aislar moléculas, genes, enzimas o proteínas de interés, es de mucha utilidad gracias a la facilidad práctica que brinda analizar una muestra medio ambiental, y la cantidad de metadatos obtenidos a partir de un solo análisis.

Estudios metagenómicos de microbiota bacteriana en plantas

Las especies vegetales en entornos naturales y agrícolas están continuamente expuestas a una gran cantidad de microorganismos, que llevan a cabo la colonización microbiana de la rizósfera, lo que conlleva a procesos acompañados de una intrincada red de interacciones simultáneas entre microorganismo y planta (Carvalhais *et al.*, 2013), quienes son capaces de establecer gran número de interacciones, desde una perspectiva agronómica, el microbioma (conjunto

de microorganismos que se localizan de manera normal en un nicho específico (Bulgarelli *et al.*, 2012) del suelo puede producir efectos benéficos o perjudiciales en crecimiento y producción de la planta (Carvalhais *et al.*, 2013; Bulgarelli *et al.*, 2012; Bulgarelli *et al.*, 2013). Se han realizado estudios en la rizósfera y su impacto sobre las plantas con plataformas de NGS para identificar los phylas dominantes en el ambiente de la rizósfera en diversos tipos de plantas y suelos, en los cuales se ha descrito un alto rango taxonómico (especies), pero bajo rango de phylas que incluyen Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroides, Chloroflexi, Firmicutes y Proteobacteria; lo cual sugiere posibles rutas hacia la selectividad microbiana dependiente del hospedero y suelo. También se ha logrado describir la diversidad de taxa que alberga la rizósfera (bacterias, hongos, oomicetos, nematodos, protozoarios, algas, virus, arquerias y artrópodos) (Figura 3). La mayoría de estos están implícitos en una compleja red de alimentos que utiliza gran cantidad de nutrientes liberados por la planta llamados rizodepósitos (exudados, mucílago, etcétera) que son una fuerza impulsora importante en la regulación de la diversidad y actividad microbiana en las raíces de las plantas. Cook (1995) postuló que estas pueden modular el microbioma de la rizósfera a su beneficio mediante la estimulación selectiva de microorganismos con características que beneficien el crecimiento vegetal y la salud de la planta (Méndez *et al.*, 2013; Andreote *et al.*, 2014). Este tipo de selección está dada por exudados radiculares, que son un factor clave

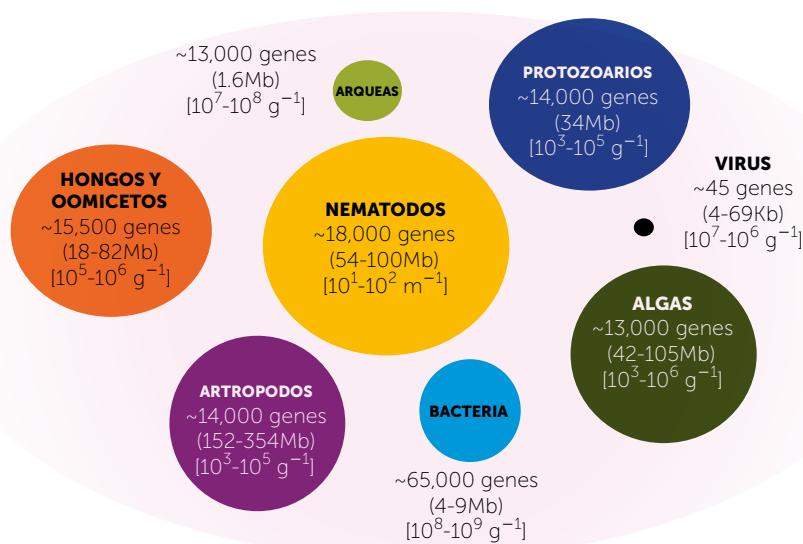


Figura 3. Medida promedio del número de genes en genomas de especies representativas de cada grupo de organismos. El tamaño de sus respectivos genomas está indicado entre paréntesis. Para cada uno de estos (micro) organismos, el número aproximado de su abundancia está indicado entre corchetes (Tomado y modificado de Mendes *et al.*, 2013). Las especies seleccionadas para ilustrar la composición de microbioma de la rizósfera y calcular el tamaño y número de genes y genomas son: **Protozoarios**: *Dictyostelium discoideum*; **Virus**: *Pseudomonas phage 73*, *Fusarium graminearum* dsRNA mycovirus-4, *Agrobacterium phage 7-7-1*, *Rhizoctonia solani* virus 717; **Algas**: *Chlorella variabilis* y *Chlamydomonas reinhardtii*; **Bacterias**: *Pseudomonas fluorescens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Burkholderia cepacia*, y *Streptomyces filamentosus*; **Artropodos**: *Metaseiulus occidentalis*, *Acromyrmex echinatior*, y *Solenopsis invicta*; **Nematodos**: *Caenorhabditis elegans* y *Meloidogyne hapla*; **Hongos/Oomicetos**: *Laccaria bicolor*, *Nectria haematococca*, *Piriformospora indica*, *Verticillium dahliae*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium oxysporum*, *Sporisorium reilianum*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora parasitica*, *Aphanomyces euteiches*, *Phytophthora cinnamomi*, y *Pythium ultimum*; **Arqueas**: *Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis*.

para el enriquecimiento de las poblaciones microbianas específicas en la rizósfera, y pueden consistir de oxígeno, iones, agua, enzimas, mucílago y una amplia variedad de metabolitos primarios y secundarios que contienen carbono (Andreote *et al.*, 2014). Los ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, lípidos, cumarinas, flavonoides, proteínas, enzimas, compuestos alifáticos y aromáticos son ejemplos de sustancias primarias encontradas en la interface suelo-raíz. Entre ellos, los ácidos orgánicos han recibido atención considerable debido a su papel en el suministro de sustratos para el metabolismo microbiano y como productos intermediarios para reacciones biogeoquímicas en el suelo, donde la cantidad y complejidad de estos componentes es específica para cada familia o especie vegetal (Berg y Smalla, 2009). Los microorganismos capaces de interactuar con la amplia gama de factores selectivo-atrayentes aportados por el genotipo hospedero, se han identificado como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM), o en mayor medida las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) las cuales colonizan la raíz de la planta, promueven el crecimiento, sanidad, y reducen la incidencia de enfermedades y patógenos (Figura 4)

a través de una variedad de mecanismos que incluyen la solubilización de fosfatos (Richardson *et al.*, 2009), producción de auxinas (IAA) (Spaepen y Vanderleyden, 2011), de antibióticos (Chen *et al.*, 2009), actividad ACC desaminasa (Siddiquee *et al.*, 2010) e incremento de eficiencia fotosintética (Zhang *et al.*, 2008) entre otros.

Además de un análisis filogenético amplio del microbioma en rizósfera, hay necesidad de ir más allá de catalogar las comunidades microbianas ("coleccionar sellos") y determinar qué microorganismos están activos durante las etapas de desarrollo de la planta y que genes son activados a través de la secreción de exudados en el desarrollo de la misma. La habilidad de los PGPR para utilizar un amplio panel de nutrientes es un factor característico que influye en el éxito de la colonización de la rizósfera, como la utilización de aminoácidos, que es un componente principal de los exudados (Bais *et al.*, 2006) y están involucrados en la expresión de genes como *hutU* que codifican para urocanasa involucrada en la degradación de histidina, este gen se ha visto involucrado en la rizósfera de maíz (*Zea mays L.*) (Matilla *et al.*, 2007) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*) (Zhang *et al.*, 2006). Otros estudios han revelado la expresión de genes en procesos de detoxificación y estrés, inducidos por la rizósfera ya que esta ejerce una presión selectiva me-

diante la liberación de componentes tóxicos derivados de la planta como flavonoides y terpenoídes (Bais *et al.*, 2006) los cuales inducen estrés en presencia de cierto tipo de bacterias como consecuencia de los PGPM, en especial los PGPR superan este estrés químico debido a la utilización de bombas como la MDR (resistencia multidroga) (Matínez *et al.*, 2009) y bombas pertenecientes a RND (resistencia célula/nódulo) como MexAB-OprM (Silby *et al.*, 2009), MexCD-OprJ (Martilla *et al.*, 2007) y componentes de extrusión de la familia DinF (Barret *et al.*, 2009). Otros estudios realizados en el organismo modelo *Pseudomonas fluorescens* en procesos de secreción, han revelado que los T3SSs son genes conservados, ya que fueron identificados en todo el genoma de *P. fluorescens* (Kimbrel *et al.*, 2010), y dichos genes pertenecientes a la familia Hrp1, son genes de biocontrol (*P. fluorescens*) que acoplan su expresión acorde a las necesidades de la rizósfera (Jackson *et al.* 2005; Mavrodi *et al.* 2011), y recientemente el T3SSs ha demostrado estar inmerso en la promoción simbiótica de ectomicorrizas con *P. fluorescens* (Cusano *et al.*, 2010) (Figura 4).

De manera similar se ha identificado que la rizosfera de maíz y caña de azúcar es capaz de activar los genes *yidC* y *secB*, involucrados en el tráfico de proteínas (Matilla *et al.*, 2007; Giddens *et al.*, 2007; Silby *et al.*, 2009). Los genes ortólogos como *SecB* han demostrado estar inmersos en la translocación de proteínas sintetizadas de novo a través de la membrana, y miembros de *YidC* en el desdoblamiento, inserción y ensamblaje de proteínas en la cara interna de la membrana en bacterias, ambos inducidos por la interacción con diversos exudados radiculares del hospedero (Yuan *et al.*, 2010). Los estudios con plataformas de NGS en ácidos nucleicos extraídos de rizósfera proveen un amplio espectro de los microorganismos que la habitan, además de obtener y amplificar fragmentos de interés a partir del DNA genómico de la comunidad y posteriormente poder ser analizados por técnicas cultivo-independientes, los cuales son capaces de mostrar la influencia de la planta sobre la estructura de la comunidad microbiana; y con ello, poder deducir que la composición de la microbiota bacteriana en la rizósfera se ve afectada por un complejo de interacción entre el tipo de suelo, la especie hospedera y circundantes, así como, la localización de la raíz de la planta hospedera.

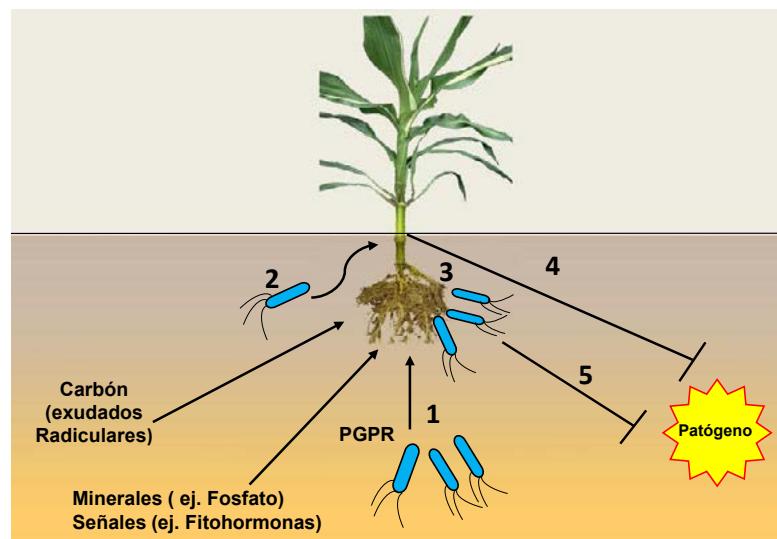


Figura 4. Interacciones benéficas planta-bacteria en la rizósfera. Poblaciones de PGPR seleccionadas por exudados radiculares específicos. Movilidad (1), Adherencia (2) crecimiento (3) pasos importantes en la competencia por la rizósfera. Las diversas cepas de PGPR pueden mejorar el crecimiento de la planta por la liberación de nutrientes y fitohormonas y/o inhibir enfermedades en las raíces causadas por fitopatógenos. La inhibición de fitopatógenos puede ocurrir de manera indirecta a través del ISR (sistema inmune sistémico) (4) o de manera directa, debido a la producción de metabolitos secundarios (5) (Tomado y modificado de Barret *et al.*, 2011).

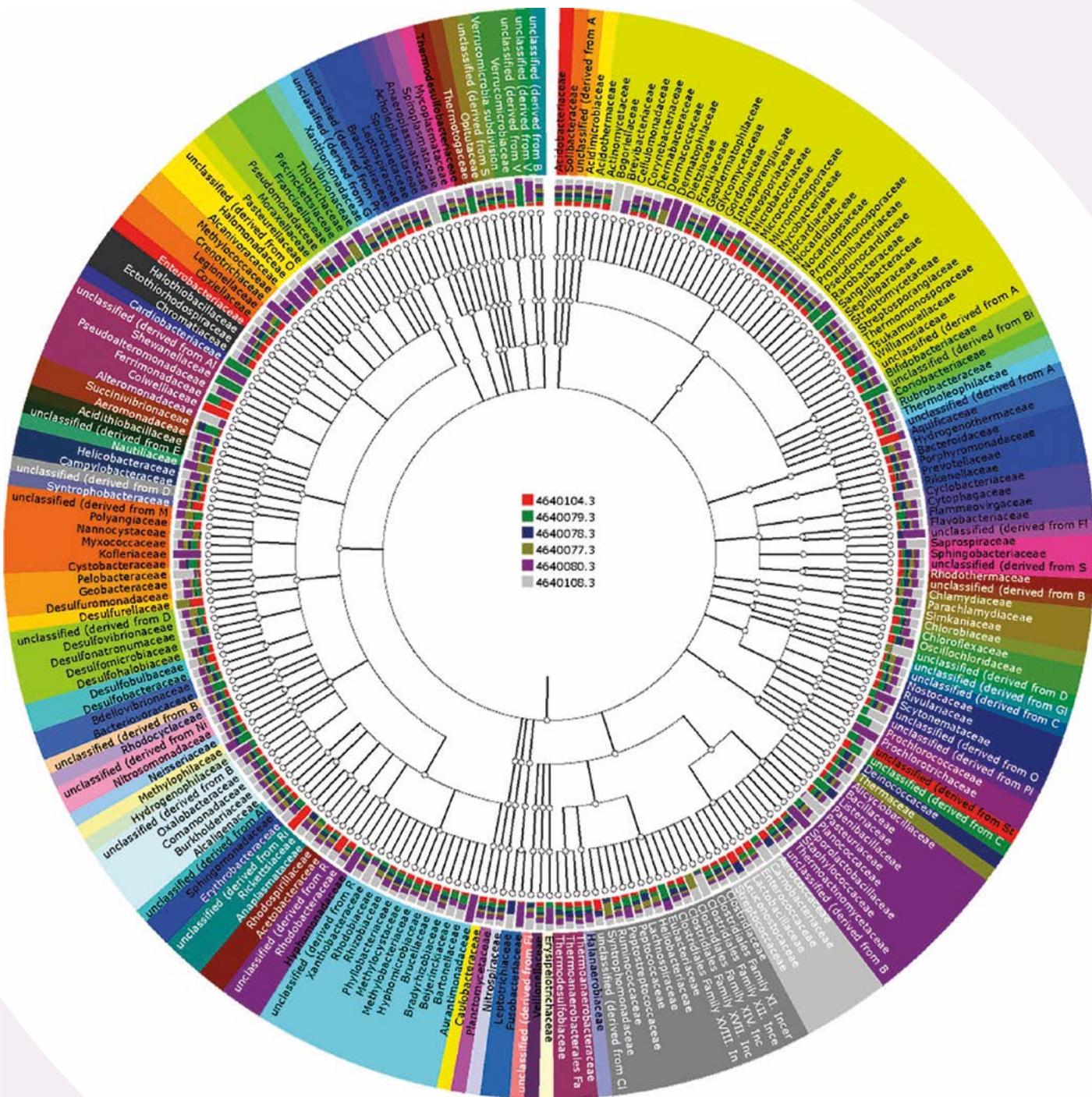


Figura 5. Diversidad microbiana obtenido directamente de la rizósfera de maíz (*Zea mays* L.) y analizado mediante tecnologías de NGS ION Torrent™ (Tomado de Arteaga-Garibay R. I.; Cadena-Zamudio J. D.; Martínez-Peña M. D. (2015) sin publicar).

CONCLUSIONES

Las tecnologías de NGS tienen amplia variedad de aplicaciones, y cada día son implementadas en más campos de la ciencia. Además de las aplicaciones descritas anteriormente, las tecnologías de NGS pueden ser utilizadas para caracterizar relaciones evolutivas entre genomas o dilucidar el papel de diversas proteínas, enzimas o ácidos, como el RNAs no codificante en salud y enfermedad. En un futuro es previsible que la tecnología NGS pueda utilizarse para obtener alta calidad de los datos de la secuencia de un genoma aislado de una sola célula, la cual podría ser algún microorganismo aislado, metabolitos vegetal lo que sería un gran avance, especialmente para el campo de la biomedicina. El área de las tecnologías de NGS y sus aplicaciones son ya un movimiento rápido e indispensable en la investigación a nivel mundial; lo cual convierte al área de las ómicas como herramienta complementaria en cualquier tipo de estudio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto de investigación "ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA ASOCIADA A SUELO RIZOFÉRICO DE 10 VARIEDADES DE MAÍZ" de recursos fiscales del INIFAP con N° de proyecto SIGI: 16131431995. Agradecemos el apoyo del Tesista Juan Lara Aguilera por la facilidad en el manejo y obtención de datos para la Figura 5.

LITERATURA CITADA

Alkan C., Sajadian S., Eichler E.E. 2011. Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nature methods* 8: 61-65

Andreote F.D., Gumiere T., Durrer A. 2014. Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola* 71: 528-539

- Avneet K. S., Vakhu J. 2015. Isolation and in silico characterization of novel esterase gene with b-lactamase fold isolated from metagenome of north western Himalayas. *3 Biotech* 5: 553-559
- Acinas S.G. 2007. Diversidad y estructura de una comunidad microbiana. Sociedad Española de Microbiología 44: 24-29
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266
- Barret M., Frey-Klett P., Boutin M., Guillerm-Erckelboudt A.Y., Martin F., Guillot L., Sarniguet A. 2009. The plant pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* improves bacterial growth and triggers early gene regulations in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp. *New phytologist journal* 181: 435-447
- Barret M.M., J-P., O'Gara F. 2011. Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. *Biol Fertil Soils* 47: 729-743
- Basset Y., Novotny V., Miller S.E., Kitching R.L. 2003. Arthropods of Tropical Forests. Spatio-temporal Dynamics and Resource Use in the Canopy. Cambridge University Press.
- Berg G., Smalla K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *Federation of European Microbiological Societies* 68: 1-13
- Bhat M.K. 2000. Research review paper: cellulases and relate enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances Journal*. 18: 355-383
- Brady S. F., Chao C. J., Clardy J. 2004. Longchain N-acyltyrosine synthases from environmental DNA. *Applied Environmental Microbiology* 70: 6865-6870
- Brady S. F., Clardy J. 2004. Palmitoylputrescine, an antibiotic isolated from the heterologous expression of DNA extracted from Bromeliad Tank water. *Journal of Natural Products* 67: 1283-1286
- Brulc J.M., Antonopoulos D.A., Berg Miller, M.E., Wilson M.K., Yannarell C., Dinsdale E.A. 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 1948-1953
- Bulgarelli D., Rott M., Schlaepi K., Ver Loren van T. E., Ahmadinejad N. 2012. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488: 91-95.
- Bulgarelli D., Schlaepi K., Spaepen S., Ver Loren van Themaat E., Schulze-Lefert P. 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants 64: 07-38.
- Bulgarelli D., Garrido-Oter R., McHardy A.C., Schulze-Lefert P. 2015. Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. *Cell Host & Microbe* 17: 392-403
- Carvalhais L.C., Muzzi F., Chin-Hong T., Hsien-Chooand J., Schenck P.M. 2013. PlantgrowthinArabidopsisassistedbycompostsoil-derivedmicrobialcommunities. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-15.
- Chen X.H., Koumoutsi A., Scholz R., Borrius R. 2009. Morethan anticipated-productionofantibioticsandothersecondarymetabolitesby *Bacillusamyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 16: 14-24.
- Cortés-López N., Montor-Antonio J., Olvera-Carranza C., Peña-Castro J., del Moral-Ventura S. 2014. Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 1: 45-58
- Cusano A.M., Burlinson P., Deveau A., Vion P., Uroz S., Preston G.M., Frey-Klett P. 2010. *Pseudomonas fluorescens* BBC6R8 type III secretion mutants no longer promote ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental Microbiology Reports* 3: 203-210.
- Daniel R. 2005. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* 3: 470-478.
- de Zelicourt A., Al-Yousif M., Hirt H. 2013. Rhizosphere microbes as essential partners for plant stresstolerance. *Molecular Plant - Journal* 6: 242-245.
- Dey R.P., Bhatt K.K., D.M., Chauhan S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria.

- Microbiology Research. 159: 371-394.
- Diaz-Torres M.L., McNab R., Spratt D.A., Villedieu A., Hunt N., Wilson, M., Mullany P. 2003. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 1430-1432.
- Edwards K.J., Wheat C.G., Sylvan J.B. 2011. Under the sea: Microbial life in volcanic oceanic crust. *Nature Review Microbiology* 9: 703-712.
- Elend C., C Schmeisser., C Leggewie., P Babiaik., Carballera J.D., Steele H. L., Reymond J. L., Jaeger K. E., Streit W. R. 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3637-3645.
- Engeszer R. E., Patterson L. B., Rao A. A., Parichy D. M. 2007. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4: 21-40.
- Entcheva P., W Liebl., A Johann, T Hartsch., Streit W.R. 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 89-99.
- Escalante-Lozada A., Gosset-Lagarda G., Martínez-Jiménez A., Bolívar-Zapata F. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia* 38: 583-592.
- Eyers L., George I., Schuler L., Stenuit B., Agathos S.N., Fantroussi S.E. 2004. Environmental genomics: exploring the unmined richness of microbes to degrade xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 123-130.
- Ferrer M., Golyshina O.V., Chernikova T.N., Khachane A.N., Reyes-Duarte D., Martins Dos Santos V.A.P., Strompl C., Elbrough K., Jarvis G., Neef A., Yakimov A., Timmis M. M., Golyshin P.N. 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environmental Microbiology* 7: 1996-2010.
- Gans J., Wolinsky M., Dunbar J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387-90.
- García-Vallejo F. 2004. La genómica nutricional: un nuevo paradigma de la investigación de la nutrición humana. *Colombia Medica* 35: 150-160.
- Giddens S.R., Jackson R.W., Moon C.D., Jacobs M.A., Zhang X.X., Gehrig S.M., Rainey P.B. 2007. Mutational activation of niche-specific genes provides insight into regulatory networks and bacterial function in a complex environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 18247-18252.
- Gilbert J.A., Hughes M. 2011 Gene expression profiling: metatranscriptomics. *Methods in molecular biology* 733: 195-205.
- Gillespie D.E., Brady S.F., Bettermann A.D., Cianciotto N.P., Liles M.R., Rondon M.R., Clardy J., Goodman R.M., Handelsman J. 2002. Isolation of antibiotics turbomycin a, and b from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 4301-4306.
- He J.Z., Zhu Y.G., Zheng Y.M., Zhang L.M., Shen J.P. 2007. Methodology and application of soil metagenomics. *Chinese Academy of Science* 18: 212-8.
- Helen L., Steele Wolfgang R.S. 2005. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters* 247: 105-111.
- Hernández-León R. I., Velázquez-Sepúlveda M. C., Orozco-Mosqueda G. S. Revista internacional de botánica experimental international journal of experimental botany. 79: 133-139.
- Hongoh Y. 2010. Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74: 1145-1151.
- Hugenholtz P., Tyson G. W. 2008. Metagenomics. *Nature* 455: 481-483.
- Jackson R. W., Preston G. M., Rainey P. B. 2005. Genetic characterization of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 rsp gene expression in the phytosphere and *in vitro*. *Journal of Bacteriology* 187: 8477-8488.
- Kimbrel J. A., Givan S. A., Halgren A. B., Creason A. L., Mills D. I., Banowetz G. M., Armstrong D. J., Chang J. H. 2010. An improved, high-quality draft genome sequence of the *Pseudomonas fluorescens* WH6. *BMC Genomics* 11: 522.
- Knief C. 2014. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-23.
- Kohl K.M., Dearing D. 2012. Experience matters: prior exposure to plant toxins enhances diversity of gut microbes in herbivores. *Ecology Letters* 15: 1008-15.
- Köhler T., Dietrich C., Scheffrahn R., Brune H.A. 2012. High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.) *Applied and Environmental Microbiology* 78: 4691-701.
- Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh H., Hidehiro T., Atsushi T., Hideto T., Hidetoshi M., Vineet K., Sharma T.P., Srivastava T.D., Taylor H., Noguchi H., Mori Y., Ogura D.S., Ehrlich K.I., Toshihisa T., Yoshiyuki S., Tetsuya H., Masahira H. 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research* 14: 169-181.
- Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R. 2012 .Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 251-364.
- Lorenz P., Eck J. 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology* 3: 510-516.
- López-Reyes L., Carcaño-Montiel M., Tapia-Hernández A., Jiménez-Salgado T., Mauricio-Gutiérrez A. 2015. saberes y ciencias 48:
- Matilla M.A., Espinosa-Urgel M., Rodriguez-Herva J.J., Ramos J.L., Ramos-Gonzalez M.I .2007. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biology* 8: 9.
- Mavrodi D.V., Mavrodi J.A., Hassan K.A., Weller D.M., Paulsen I.T., Loper J.E., Alfano J.R., Thomashow L.S. 2011. Structural and functional analysis of the type III secretion system from *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Journal of Bacteriology* 193: 177-189.
- Mendes R., Kruijt M., de Bruijn I., Dekkers E., van der Voort M., Schneider J.H., Piceno Y.M., De Santis T.Z., Andersen

- G.L., Bakker P.A., Raaijmakers J.M. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332: 1097-100.
- Mendes R., Garbeva P., Raaijmakers J.M. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *Federation of European Microbiological Societies* 37: 634-663.
- Merriman B., Rothberg J.M., IonTorrent R&D Team. 2012. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* 33: 3397-3417.
- Metzker M.L. 2010. Sequencing technologies-the next generation. *Nature reviews Genetics* 11: 31-46.
- Minard G., Mavingui P., Moro C.V. 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites y Vectors* 6: 146.
- Nichols D. 2007. Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 351-357.
- Niedringhaus T. P., Milanova D., Kerby M. B., Snyder M. P., Barron A. E. 2011. Landscape of next-generation sequencing technologies. *Journal of Analytical Chemistry* 83: 4327-4341.
- Pareek C. S., Smoczyński R., Tretyn A. 2011. Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics* 52: 413-435.
- Qu A., Brulc J. M., Wilson M. K., Law B. F., Theoret J. R., Joens L. A., Konkel M. E., Angly F., Dinsdale E. A., Edwards R. A. 2008. Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS One* 3: e2945.
- Richardson A. E., Barea J. M., McNeill A. M., Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321: 305-339.
- Roeselers G., Mittge E. K., Stephens W. Z., Parichy D. M., Cavanaugh C. M., Guillemin K., Rawls J.F. 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME Journal* 5: 1595-1608.
- Rolf D. 2005. The Metagenomics of Soil. *Nature Reviews* 3: 470-478.
- Schmeisser C., Helen S., Wolfgang R.S. 2007. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 955-962.
- Segata-Boernigen D., Tickle T. L., Morgan X. C., Garrett W.S., Huttenhower C. 2013. Computational meta'omics for microbial community studies. *Molecular Systems Biology* 9: 666.
- Shakya M., Quince C., Campbell J. H., Yang Z. K., Schadt C. W., Podar M. 2013. Comparative metagenomic and rRNA microbial diversity characterization using Archaeal and Bacterial synthetic communities. *Environmental Microbiology* 15: 1882-1899.
- Siddique M.A., Chauhan P.S., Anandham R., Han G.H., Sa T. 2010. Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of a *ccdc* deaminase-producing halotolerant bacterium derived from coastal soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 1577-1584.
- Silby M. W., Cerdeno-Tarraga A. M., Vernikos G. S., Giddens S. R., Jackson R. W., Preston G. M., Zhang X. X., Moon C. D., Gehrig S. M., Godfrey S. A. C., Knight C. G., Malone J. G., Robinson Z., Spiers A. J., Harris S., Challis G. L., Yaxley A. M., Harris D., Seeger K., Murphy L., Rutter S., Squares R., Quail M. A., Saunders E., Mavromatis K., Brettin T. S., Bentley S. D., Hothersall J., Stephens E., Thomas C. M., Parkhill J., Levy S. B., Rainey P. B., Thomson N. R. 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology* 10: R51.
- Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A., Vanderleyden J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil* 312: 15-23.
- Spaepen S., Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3: a001438.
- Stevens C.E., Hume I.D. 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews* 78: 393-427.
- Shakira G., Atiya A., Mudassar AG., Muhammad I. 2010. Metagenomics and its application in soil microbial community studies: biotechnological prospects. *Journal of Animal & Plant Sciences* 2: 611-622.
- Sun Y., Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production: A review. *Bioresource Technology* 83: 1-11.
- Schadt E.E., Turner S., Kasarskis A. 2010. A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics* 19: R227-R240.
- Thompson J.F., Milos P.M. 2011. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biology and Evolution* 12: 217.
- Turnbaugh P. J., Ley R. E., Mahowald M. A., Magrini V., Mardis E. R., Gordon J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.
- Turnbaugh P. J., Backhed F., Fulton L., Gordon J. I. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3: 213-223.
- Turnbaugh P. J., Gordon J. I. 2008. An invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics. *Cell* 134: 708-713.
- Turnbaugh P. J., Ley R. E., Mahowald M. A., Magrini V., Mardis E. R., Gordon J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.
- Turnbaugh P. J., Ridaura V. K., Faith J. J., Rey F. E., Knight R., Gordon J. I. 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine* 1: 6ra14.
- Uroz S., Buee M., Murat C., Frey-Klett P., Martin F. 2010. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental Microbiology* 2: 281-88.
- Voget S., Steele H. L., Streit W. R. 2006. Characterization of a metagenome derived halo tolerant cellulase. *Journal of Biotechnology* 126: 26-36.
- Wang P., Du Y., Zhao X., Miao Y., Song C.P. 2013. The MPK6-ERF6-ROS-responsive cis-acting element/GCC box complex modulates oxidative gene transcription and the oxidative response in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 161: 1392-1408.
- Wilmes P., Bond P.L. 2006. Metaproteomics: studying functional gene expression

- in microbial ecosystems. *Trends Microbiolgy* 14: 92-97.
- Wold B., Myers R.M. 2008. Sequence census methods for functional genomics. *Nature Methods* 5: 19-21.
- Yuan J. J., Zweers J. C., Van Dijken J. M., Dalbey R. E. 2010. Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 179-199.
- Yun J., Seowon K., Sulhee P., Hyunjin Y., Myo-Jeong K., Sunggi H., Sangyeol R. 2004. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7229-7235.
- Zhang X. X., George A., Bailey M. J., Rainey P. B. 2006. The histidine utilization (hut) genes of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 are active on plant surfaces, but are not required for competitive colonization of sugar beet seedlings. *Microbiology Society Journals* 152: 1867-1875.
- Zhang H. M., Xie X. T., Kim M. S., Kornyejew D. A., Holaday S., Pare P. W. 2008. Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucosesensing and abscisic acid levels in planta. *The Plant Journal* 56: 264-273.

