

Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos

Nohemí Cortés-López¹, Juan Montor-Antonio¹, Clarita Olvera-Carranza², Julián Peña-Castro¹, Sandra del Moral-Ventura¹

División de Estudios de Posgrado¹, Instituto de Biotecnología²
Universidad del Papaloapan, Universidad Nacional Autónoma de México
Tuxtepec, Oax.¹, Cuernavaca, Mor.²; México

[jay14_8, noga_cl]@hotmail.com, clarita@ibt.unam.mx, [smoral, julianpc]@unpa.edu.mx

Abstract— Metagenomics is a novel tool for the study of microbial genes in a population. Discoveries made through its experimental framework include new antibiotics, genes, enzymes, protein structures, metabolic pathways and population dynamics of several habitats. Metagenomics studies have been performed in different human organs including intestine, mouth and skin and have found interesting relationships between health state and microbiota. In this work, the theoretical and technical bases of metagenomics are analyzed with special emphasis on the new possibilities to widen our current genomic knowledge and reach novel biotechnological applications.

Keywords— *Metagenomics, microorganisms, genes, enzymes, biocatalysts.*

Resumen— La metagenómica es una herramienta novedosa que estudia los genes microbianos de una población. Sus alcances han sido sorprendentes, ya que ha permitido el descubrimiento de nuevos antibióticos, genes, enzimas, estructuras proteicas y rutas metabólicas, así mismo ha permitido conocer la dinámica poblacional de diversos hábitats. En el humano se han realizado estudios metagenómicos en diversos órganos: intestino, boca, piel, etc., encontrando una relación importante entre el estado de salud del comensal y la microbiota localizada. En este trabajo, se analizan los fundamentos teóricos y técnicos de la metagenómica y las posibilidades que ofrece de ampliar el conocimiento genómico actual y la obtención de aplicaciones biotecnológicas novedosas.

Palabras claves— *Metagenómica, microorganismos, genes, enzimas, biocatalizadores.*

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son una fuente importante de productos y procesos biotecnológicos. Hasta hace unos años, estos procesos se basaban en el análisis de las capacidades metabólicas de los microorganismos que podían ser cultivados en el laboratorio mediante técnicas microbiológicas tradicionales. Los métodos clásicos de cultivo sólo permiten recuperar entre el 0.1 y el 10% de los microorganismos ambientales (microorganismos cultivables) [1, 2, 3]. Lo anterior se debe a que se desconocen los requerimientos nutricionales necesarios de todos ellos, las condiciones fisicoquímicas precisas de su ambiente natural y la información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que se mantienen en una comunidad microbiana [1, 4, 5]. Debido a esta problemática, se han buscado metodologías alternativas para determinar la diversidad de una población que no dependan del cultivo de microorganismos sino del estudio y análisis de su información genética. Un método pionero fue el análisis del gen 16S mediante el uso de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y de técnicas electroforéticas como DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización), ARDRA (Análisis de Restricción de ADN Ribosomal Amplificado), RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción), RADP (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico), entre otras [6].

La evolución metodológica de las técnicas de aislamiento y purificación de ácidos nucleicos, secuenciación y de ensamblado de secuencias, han hecho posible el desarrollo de una metodología alternativa: la metagenómica. La metagenómica es el análisis del metagenoma, el cual es el conjunto del

ADN de los diversos microorganismos presentes en un hábitat [7, 8]. En la última década, esta tecnología ha revolucionado el estudio de la diversidad microbiana, la obtención de metabolitos y el entendimiento de la dinámica de poblaciones microbianas.

Desde el punto de vista biotecnológico, la metagenómica es una herramienta importante en la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas de interés industrial, que en conjunto con los avances en los métodos de secuenciación, permiten el escrutinio masivo de todo el conjunto de genomas de microorganismos presentes en una muestra (cultivables y no cultivables).

El primer trabajo donde se demostró el potencial de la metagenómica en el descubrimiento de nuevos genes fue realizado en el año 2000 [9] donde a partir de suelos se identificaron nuevas enzimas con diversas actividades hemolíticas, lipolíticas y amilolíticas. Posteriormente, se han identificado otros productos y actividades de interés biotecnológico como antibióticos nuevos (turbomicina A y B), enzimas (lipasas, esterases, quinasas), proteínas de membrana, genes que codifican la ruta metabólica de síntesis de compuestos como el poli-hidroxibutirato (PHB) y vitaminas [9, 10]. En el año 2003, se identificaron en muestras de suelos, agarasas (de las cuales seis fueron totalmente nuevas), celulasas, amilasas, pectato-liasas, lipasas, así como diversas proteínas desconocidas en muestras de suelo [11].

A partir de estos primeros estudios, la metagenómica se diversificó en la búsqueda de nuevos antibióticos, enzimas, rutas metabólicas y estudios de dinámica de poblaciones no caracterizadas y de importancia biotecnológica. Estos trabajos también sentaron la base metodológica de la metagenómica que consiste en la: selección de la muestra ambiental, extracción de ADN, selección del método de análisis (secuenciación, escrutinio funcional, etc.) e integración de la información. El objetivo del presente trabajo es dar a conocer al lector las estrategias de estudio del ADN metagenómico, los alcances de la metagenómica en diversas áreas del conocimiento, su impacto en estudios ecológicos y aplicación en el descubrimiento de enzimas con propiedades funcionales novedosas.

II. ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE MUESTRAS METAGENÓMICAS

Una vez seleccionada la muestra (suelo, agua, alimentos fermentados, sedimentos, tejidos humanos y animales, entre otros), el ADN se aísla y se purifica (Figura 1a y b). Este proceso es crucial, ya que la presencia de compuestos orgánicos como melanina, hematina, sales biliares, ácidos húmicos o fúlvicos, inhibe la actividad de las enzimas que son utilizadas posteriormente en el análisis del ADN (ADN polimerasas, ligasas y endonucleasas). Para purificar el ADN se requiere probar diversos productos, optimizar las técnicas de purificación, y/o utilizar resinas o sílicas [12]. Para la purificación de ADN de muestras de ambientes extremos, los protocolos han tenido que modificarse, ya que los existentes han sido diseñados para de ADN de muestras mesófilas [13]. Estos problemas se han abordado con el diseño de columnas de purificación que excluyen o atrapan a los inhibidores más comunes y con el diseño de polimerasas más eficientes. Así mismo, desde el paso de purificación es necesario tener altas concentraciones de ADN porque el material genético se perderá en las múltiples etapas de manipulación subsecuentes.

Debido a que la concentración, la cantidad total y la calidad del ADN metagenómico suele ser un factor limitante, en estudios recientes se ha optado por amplificarlo utilizando la técnica de amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), la cual emplea a la ADN polimerasa ϕ 29 bacteriofaga que produce amplicones 7-10 kb de longitud con una alta fidelidad [14, 15], con ello se puede obtener cantidades suficientes de ADN. Al extraer un ADN metagenómico de calidad, se pueden seguir diferentes rutas de análisis no excluyentes (Figura 1).

En los inicios de la metagenómica, a partir del ADN purificado se construían librerías metagenómicas con la finalidad de realizar un análisis funcional. Sin embargo, hoy en día la secuenciación es el método más común de análisis debido al bajo costo de las técnicas post-Sanger de

secuenciación entre las que se encuentran la pirosecuenciación, la secuenciación por síntesis (Illumina) y por liberación de protones (Ion Torrent) [16], por lo tanto la tendencia es secuenciar el ADN metagenómico, provocando que sea el método de análisis preferido. Entre las ventajas que presenta este método es la obtención de terabites de información genética, no se involucra algún proceso de selección (cultivo o enriquecimiento del medio) y se minimiza el sesgo de algunas metodologías (ej. amplificación de 16S rDNA). Sin embargo, una desventaja de la secuenciación es el ensamblado bioinformático de las secuencias obtenidas (Figura 1e). El ensamblado se basa en el solapamiento de las secuencias para reconstruir secciones completas y contiguas de ADN (contigs), con la finalidad de armar genomas completos. Muchas veces los “contigs” no son lo suficientemente grandes para abarcar toda una región (es como si perdiéramos fichas internas de un rompecabezas) y por lo tanto no pueden ensamblarse. Es preferible que los fragmentos producidos por la secuenciación sean grandes, ya que su ensamblado será más fácil que si los fragmentos fueran más pequeños.

Por otro lado, una vez obtenido el ensamblado, es necesario que las secuencias que conforman una región se encuentren secuenciadas varias veces, a esto se le conoce como profundidad de la cobertura de secuenciación y un genoma completo se considera confiable si tiene más de seis repeticiones (6X). El esfuerzo computacional que requiere este proceso amerita instalaciones informáticas especiales, además el ensamblaje automático dista mucho de ser perfecto por lo que frecuentemente requiere la asistencia humana [17]. Así mismo, existe una gran cantidad de información depositada en las bases de datos (Gen Bank, IMG, KEGG GENOME, GOLD, etc.) que no ha sido completamente identificada. En numerosos estudios metagenómicos, cerca del 50% de las secuencias obtenidas no corresponde a genes previamente identificados [18], lo que dificulta la asignación de función, es decir aún nos encontramos generando o descubriendo secuencias que no sabemos qué codifica. Será interesante indagar la funcionalidad de estas moléculas.

Otra estrategia de análisis del ADN metagenómico es el diseño de oligonucleótidos degenerados (Figura 1d), estos se crean mediante programas bioinformáticos, como primers4clades [19], a partir de grupos de secuencias previamente alineadas del gen de interés, sin embargo hay varios inconvenientes. El primero y más importante, es el sesgo y la limitación de la información, ya que el diseño de los oligonucleótidos dependerá sólo de las secuencias reportadas en las bases de datos, por lo que será difícil encontrar secuencias nuevas. Otra desventaja es que en el proceso de purificación del ADN no se eliminan por completo las sustancias inhibitorias que afectan la PCR, generando dificultades para amplificar los genes de interés [20]. Finalmente, sólo un fragmento del gen se logra clonar debido a que los programas que crean los oligonucleótidos, sean degenerados o no, arrojan los mejores modelos con base en contenido de GC, Tm, longitud, etc., y muchas veces estas características no se cumplen para que los oligonucleótidos se anclen exactamente al inicio y al final del gen, por lo que después hay que buscar el resto del gen por medio de diseño de nuevos oligonucleótidos y amplificaciones sucesivas, lo que puede tornarse complicado [21, 22, 23]. Sin embargo, este método tiene la ventaja de requerir concentraciones bajas de ADN.

Finalmente, en el escrutinio funcional, se debe elegir un sistema de clonación y determinar el tamaño de los insertos a clonar, los cuales dependerán de la integridad del ADN, el tamaño de los genes de interés y la estrategia de escrutinio (Figura 1c, d y e). Los más comunes son los plásmidos (15 kb), los fagos (hasta 20 kb), los fósmidos y cósmidos (hasta 40 kb) y finalmente los Cromosomas Artificiales Bacterianos (BACs) para fragmentos mayores [24]. Generalmente, para la búsqueda de actividades enzimáticas se utilizan librerías de insertos pequeños (4-12 kb) ya que un tamaño pequeño permite que la mayoría de los genes sean influenciados por las señales de expresión del vector, por lo tanto tienen buena posibilidad de ser expresados y detectados por escrutinio funcional [25]. En cambio para la búsqueda de “clusters” o vías metabólicas completas, se requieren librerías con insertos de mayor tamaño. Es importante colocar puntos de control durante la elaboración de la librería, para corroborar una adecuada construcción. Una vez hecha la ligación, y después de haber transformado bacterias

competentes, es posible probar la funcionalidad de la librería mediante expresión inducida de los genes clonados. Esto se puede lograr mediante la detección fenotípica de la actividad deseada y/o por complementación heteróloga de mutantes o cepas hospederas [26]. Posteriormente, las clonas que expresan la actividad deseada son caracterizadas bioquímicamente, secuenciadas y analizadas mediante herramientas bioinformáticas (Figura 1c). Una de las principales desventajas de esta técnica es el sistema de expresión, ya que muchas proteínas que requieran un plegamiento asistido o modificaciones postraduccionales difícilmente expresarán su actividad. Además, en el escrutinio funcional se requiere de un método robusto, reproducible y barato, ya que se requerirá analizar millones de clonas. Así mismo, un reto de esta fase es el diseño cuidadoso del sistema de selección pues de ello dependerá lo novedoso de las secuencias que se aislen así como las propiedades fisicoquímicas de las proteínas que se detecten. Entre las ventajas que este método presenta es que no se requieren conocimientos previos de la secuencia de los genes de interés, con ello hay más posibilidades de obtener secuencias novedosas [27, 28].

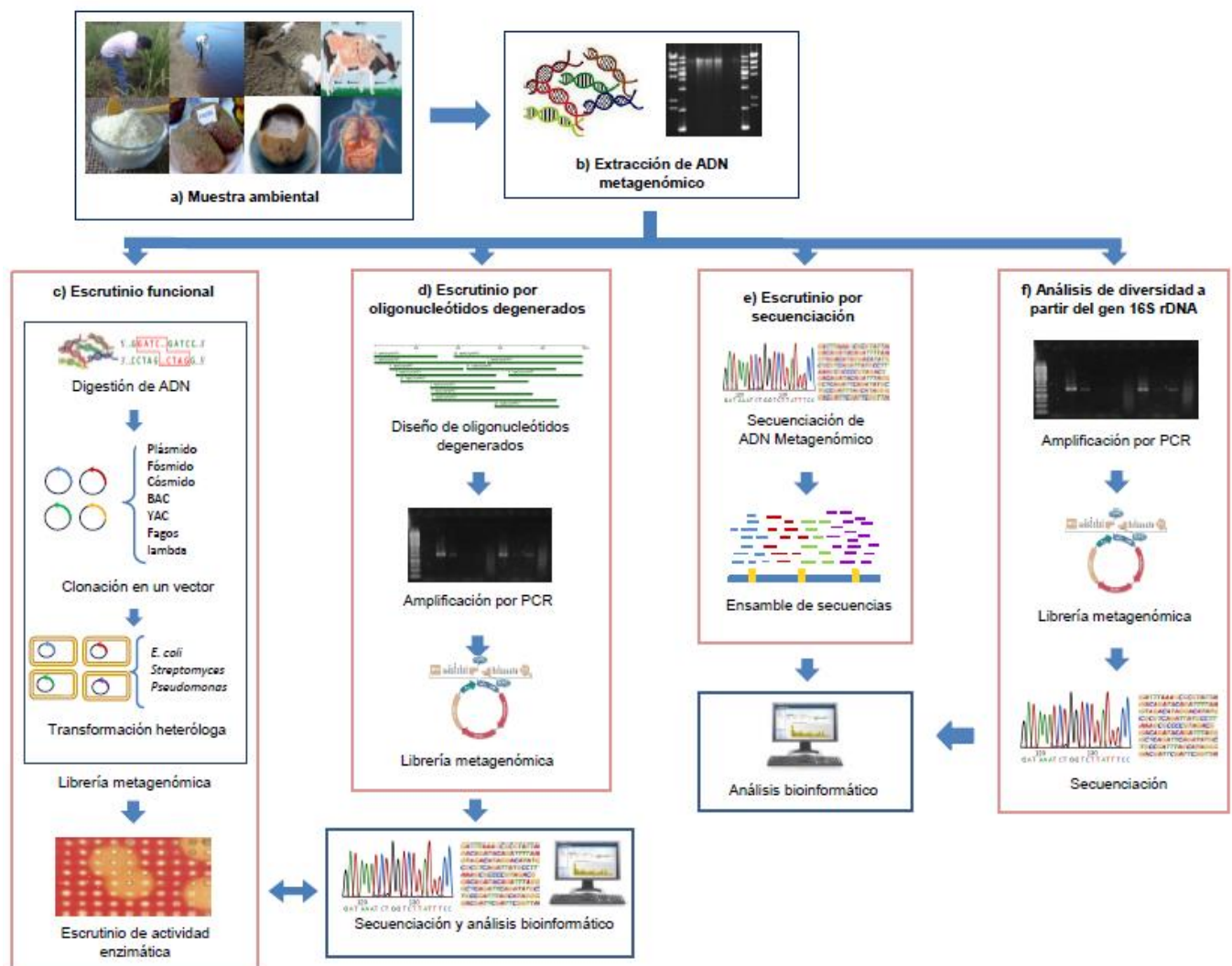


Fig. 1. Estrategias para el estudio metagenómico de muestras ambientales.

Actualmente los estudios metagenómicos son muy ambiciosos y suelen utilizar varios métodos de análisis con la finalidad de tener un panorama más completo y entender fenómenos que van desde los procesos biogeoquímicos en ambientes extremos, hasta el cambio del microbioma del cuerpo humano por enfermedades crónicas como la diabetes. Hoy en día los esfuerzos por lograr establecer los protocolos adecuados para la realización de estudios metagenómicos no cesan, sin embargo mientras eso sucede, el investigador decidirá qué estrategia seguir, todo con la finalidad de entender con mayor claridad y profundidad lo que ocurre en una comunidad microbiana.

III. DESCUBRIMIENTO DE NUEVAS ENZIMAS MEDIANTE METAGENÓMICA

El suelo (sobre todo el rizosférico), ha sido uno de los microambientes predilectos para realizar estudios metagenómicos debido a su alta diversidad [29, 30]. No obstante, se han realizado estudios en otros nichos ecológicos como superficies de sedimentos contaminados [31], agua de ríos [32, 33], hielo glaciar [13], suelo antártico [34] y rumen de bovinos [35], entre muchos otros. Algunos ejemplos de nuevos biocatalizadores con capacidades enzimáticas diferentes a las reportadas son las lipasas con aminoácidos catalíticos distintos a los comunes en este tipo de enzimas o enzimas con actividad a temperaturas cercanas a la congelación; o una glucosidasa que no es inhibida ni por agentes quelantes ni por glucosa e incluso la actividad es incrementada a altas concentraciones de glucosa [36, 37]. Recientemente se reportó una esterasa (obtenida de metacultivos de naftaleno) [38] altamente promiscua, capaz de hidrolizar a 44 ésteres con diferente estructura y niveles de enantioselectividad [39]. Por otro lado, en suelo agrícola se identificaron dos α -glucosidasas que no son inhibidas por producto, incluso su actividad se incrementa a altas concentraciones de glucosa; además de ser estables a surfactantes como SDS y tritón [40].

En la actualidad se exploran ambientes extremos (medios hipersalinos, aguas termales, medios ácidos, drenajes de minas, hielo glaciar, etc.) utilizando herramientas metagenómicas con el fin de identificar enzimas de utilidad industrial activas bajo esas condiciones. Los ambientes extremos de temperatura (alta o baja) son los preferidos para este tipo de estudios. Recientemente, dos genes nuevos con actividad lipolítica y estabilidad en detergentes y sales se aislaron de una poza térmica en la península de Kamchatka (Siberia, Rusia) [41]. Incluso se han identificado enzimas lipolíticas que presentan tanto actividad esterasa como actividad lipasa [42]. Otro caso interesante es el de una lipasa termolábil identificada en aguas termales de la India, cuya termoestabilidad fue mejorada por ingeniería de proteínas, aumentando su estabilidad 144 veces a 60°C [43], este es un ejemplo donde la evolución dirigida (*in vitro*) en conjunto con la metagenómica puede mejorar las capacidades catalíticas de una enzima.

En el caso de estudios metagenómicos en ambientes extremos con temperaturas bajas, se destaca la construcción de la primera librería metagenómica de suelo de la Antártica donde se descubrió una esterasa con intervalo de actividad a temperatura muy amplia y con bajo porcentaje de identidad aminoacídica con las esterases ya reportadas [34]. A pesar de la aparente hostilidad ambiental de la Antártica, se reportó una amplia diversidad filogenética [44]. La presencia de nuevas y diversas taxas sugiere la potencialidad de esta zona como fuente de material genético para encontrar enzimas industriales activas a temperaturas bajas [45]. Otro caso exitoso fue la construcción de una librería metagenómica a partir de hielo glaciar, de la cual se lograron recuperar nueve ADN polimerasas tipo I, las cuales mostraron poca identidad a las ya reportadas [13]. Aún son pocos los casos de construcción de librerías de ambientes con condiciones extremas en comparación con los de ambientes con condiciones moderadas.

En la tabla I se muestran las enzimas recuperadas mediante metagenómica en los años 2013 y 2014, se puede observar que el suelo, es la muestra ambiental más estudiada (69%). El suelo es uno de los compartimentos ecológicos de mayor diversidad genética microbiana [46], debido a la riqueza de

texturas y estructuras, determinadas principalmente por el contenido de arena, limo, arcilla, materia orgánica, contenido de agua, y pH [47]. Tan solo, un solo gramo puede contener más de 4000 especies diferentes de microorganismos [48], principalmente procariotas, que a su vez poseen miles de enzimas diferentes, constituyendo una reserva enorme de nuevas moléculas [47]. También se puede observar que la clonación en plásmido y el escrutinio funcional son los métodos de análisis más frecuentes para la recuperación de enzimas. Las enzimas que comúnmente se obtienen de metagenomas de suelos son lipasas, esterasas y α -glucosidasas, éstas pueden hidrolizar enlaces C-C y C-O; desde una perspectiva ecológica, pueden contribuir al ciclo del carbono y posiblemente por ello sus genes están ampliamente distribuidos en las comunidades microbianas [36].

La metagenómica es una herramienta poderosa para identificar enzimas con nuevas secuencias, propiedades bioquímicas y cinéticas y proveer a la industria biocatalizadores que optimicen los procesos. El descubrimiento de enzimas continúa creciendo (Tabla I), ahora el reto es la utilización de éstas en procesos con impacto biotecnológico.

IV. ESTUDIOS DE ECOLOGÍA MICROBIANA A TRAVÉS DE LA METAGENÓMICA

La metagenómica se puede considerar como la técnica que define a la nueva microbiología. Este argumento se basa en que la metagenómica tiene una amplia incidencia en estudios ecológicos de regiones poco comunes y/o de importancia ambiental como: aguas termales, regiones salinas, mar Mediterráneo, regiones árticas, compostas, suelos contaminados, regiones oligotróficas, etc.

Un ejemplo es el estudio de diversidad microbiana realizado en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México (CC). CC es un conjunto de 300 pozas de agua salada en el desierto de Chihuahua, muchas de ellas termales (30-40°C) y algunas ricas en sales pero pobres en nutrientes (oligotrófico) con condiciones ambientales semejantes a la tierra primitiva y a otros planetas como Marte [69, 70, 71]. Mediante el uso de metagenómica se descubrió que la diversidad acuática encontrada en CC es sorprendentemente comparable con la localizada en comunidades rizosféricas, las cuales son de las más diversas del planeta [72]. Se destacan las comunidades formadoras de estromatolitos (cianobacterias), que fueron las productoras de oxígeno masivo en la tierra primitiva y por lo tanto generadoras de la atmósfera oxidante, y hoy en CC como hace 500 millones de años, son la base de la cadena trófica [70, 71]. Se encontraron 38 filotipos encontrados son divergentes y de filiación marina, en su mayoría de origen bacteriano, aun cuando CC es un ambiente oligotrófico [70]. Por medio de metagenómica comparativa se estudió la población de dos comunidades de tapetes microbianos acuáticos (rojos y verdes) con nutrientes limitantes distintos en CC. Se encontró que a pesar de que el medio es pobre en distintos nutrientes, los complejos microbianos utilizan distintas estrategias de sobrevivencia [73]. Otro de los resultados trascendentes de este megaproyecto es la secuenciación del genoma de *Bacillus coahuilensis*, una bacteria aislada de CC. *Bacillus coahuilensis* que tiene el genoma más pequeño para los *Bacillus* secuenciados actualmente (3.35 Mb). Se propone que el genoma de *B. coahuilensis* refleja la adaptación de una bacteria marina ancestral a un ambiente nuevo a través de la transferencia horizontal de genes. Por ejemplo, *B. coahuilensis* tiene genes relacionados con la optimización de uso del fósforo, ya que produce sulfolípidos en lugar de fosfolípidos de membrana [74].

Las regiones frías del planeta como el Polo Norte, la Antártica, los Andes, regiones congeladas de países nórdicos entre otros han sido de interés para estudiar la diversidad y la dinámica microbiana debido a que son sitios interesantes desde distintos puntos de vista: estructura de proteínas, mecanismos de supervivencia, aplicaciones industriales y astrobiológico (astrobiología: disciplina científica que estudia el origen de la vida en el universo).

Tabla I. Enzimas recuperadas mediante metagenómica en los años 2013 y 2014.

Código (actividad enzimática)	Muestra ambiental y localización	Método metagenómico de análisis
JMB19063 (β -glucosidasa) [49]	Composta adaptada de pasto varilla (switchgrass) de 31 días de fermentación, California, E.U	Secuenciación al azar de librería de plásmidos
LAE1, LEA2, LEE3, LAE4, LEA5, LAE6, LAE7 (lipasas) [36]	Sedimento, Lago Arreo, España	Escrutinio funcional de librería de fósidos
1I, 2I, 3I, 4I, 6I, 7I y 9I (catecol 2,3-dioxigenasas) [50]	Suelo agrícola contaminado con petróleo, Ilhéus, Brasil	Escrutinio funcional de librería de fósidos
Tan410 (feruloil esterasa) [51]	Suelo sembrado con algodón, Nanchang, China	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
Pbg125-217 (6-fosfo- β -glucosidasa) [52]	Sedimento de aguas residuales de un planta de celulosa, Shandong, China	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
GtfC (Enzima modificadora de flavonoides) [53]	Heces de elefante, Hamburgo, Alemania	Escrutinio funcional de librería de fósidos
Mxyl (Xilanasa) [54]	Composta, New Delhi, India	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
MHlip (Esterasa) [55]	Suelo, Antártica	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
SBCas3.3 (serin proteasa) [56]	Suelo de bosque, Gembloux, Bélgica	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
SCXyl (endoxilanasa) [57]	Suelo sembrado con caña de azúcar, Sao Carlos, Brasil	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
CelEx-SF301, CelEx-SF309, CelEx-BR12, CelEx-BR15 (exocelulasas) [58]	Suelo sembrado con papas dulces y rumen, Jeonbuk, Korea	Escrutinio de librería de fósidos mediante un sistema robótico de detección de alto rendimiento
TreS (Trealosa sintetasa) [59]	Suelo, Lop Nur, China	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
ArmEst (Subfamilia de esterases) [60]	Suelo, zonas suburbanas y rurales de China	PCR gen-específico de metagenoma (MGS-PCR)
LipHim1 (Lipasa) [61]	Suelo, Mahabubnagar, India	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
AS-Esc6 y AS-Esc10 (β -glucosidasas) [40]	Suelo sembrado con trigo, Gembloux, Bélgica	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
ATII-LCL (mercurio reductasa) [62]	Agua, Mar rojo	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
MgCel44 (endoglucanasa) [63]	Suelo de manglar, Hainan, China	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
Enzimas antibacteriales (Peptidasas, lipasas y enzimas glucolíticas) [64]	Suelo, Arizona, E.U	Escrutinio de librería de cósmidos con pruebas de detección basados en el fenotipo
Glyt110 (β -glucosidasa) [65]	Suelo, Cuenca Turpan, China	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
RB4 (Pectinasa) [66]	Suelo de bosque, Ghats, India	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
AmBGL17 y AmBGL18 (β -glucosidasas) [67]	Suelo, Amazonia, Brasil	Escrutinio funcional de librería de plásmidos
Chi18H8 (Quitinasa) [68]	Suelo sembrado con col, Uppsala, Sweden	Escrutinio funcional de librería de plásmidos

De los análisis metagenómicos y metatranscriptómicos (metatranscriptómica: estudio del ARN de una comunidad ambiental) en ambientes hipersalinos de la Antártica se han identificado genes que no corresponden a taxas conocidas de ambientes fríos y que podrían ser nuevos representantes de estas taxas capaces de sobrevivir en crioambientes halofílicos. En el mismo estudio se identificaron numerosos genes relacionados con el estrés oxidativo y osmótico cuya importancia reside en la eliminación de oxígeno disuelto, ya que a bajas temperaturas la solubilidad del oxígeno aumenta, incrementando las reacciones de óxido-reducción que provocan daño celular [14]. En cuanto a las especies localizadas en estos ambientes, se han identificado bacterias de los grupos: Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria, siendo los dos primeros los dominantes en distintas zonas frías. Mientras que los grupos de Arqueas están poco representados (menos del 2%) [14, 15]. En estos estudios también se logró reconstruir las vías metabólicas responsables de los procesos biogeoquímicos como nitrificación/desnitrificación/amonificación y reducción del sulfuro a partir de organismos relacionados con estos ciclos [14].

Así mismo, mediante metagenómica comparativa entre ambientes mesófilos y psicrófilos se han observado diversas estrategias que los microorganismos utilizan para sobrevivir a bajas temperaturas. Por ejemplo, los microorganismos psicrófilos producen metabolitos con actividad crioprotectora (glicina, betaína, glicerol, etc), para disminuir el punto de congelamiento del citoplasma y estabilizar a las proteínas presentes. En ese sentido, también generan proteínas con afinidad al hielo (IBPs, por sus siglas en inglés) las cuales evitan el crecimiento de cristales y así se evita el deterioro de proteínas y estructuras celulares. También, incluyen en sus membranas ácidos grasos insaturados con la finalidad de mantener fluida la membrana. En esas condiciones condiciones donde disminuye rápidamente la temperatura, se encontró que numerosos genes llamados “cold-shock response” se activan para regular el metabolismo a diferentes niveles, desde la protección del ADN, hasta la inducción de vías metabólicas relacionadas con la síntesis de crioprotectores [15, 75].

Las enzimas de organismos psicrófilos comparadas con sus homólogas provenientes de organismos mesófilos muestran baja estabilidad térmica y alta eficiencia catalítica [15]. Lo anterior tiene implicaciones cinéticas y de afinidad que la naturaleza ha resuelto incrementando la k_{cat} y disminuyendo la K_m . Estos cambios cinéticos son atribuibles a una baja estabilidad conformacional (las estructuras son más flexibles), tienen sitios activos más disponibles y por lo tanto el sitio catalítico complementa mejor con el sustrato lo que se ve reflejado en la disminución del costo energético de activación y por lo tanto en el aumento de la velocidad de reacción [76]. Estos estudios proveen evidencia de cómo los microorganismos son exitosos en ambientes extremos de nuestro planeta y plantear hipótesis de cómo podrían sobrevivir en otros sistemas exoplanetarios donde se ha encontrado agua, como Marte y las lunas Europa y Encelado [14].

V. UNA NUEVA MIRADA A LOS RECOVECOS DE LAS CAVIDADES HUMANAS A TRAVÉS DE LA METAGENÓMICA

El ser humano cohabita con microorganismos presentes en las superficies y cavidades del cuerpo. En 2007 se inició el Programa del Metagenoma Humano (PHM) con el objetivo de construir un mapa genético de los microorganismos que coexisten en diferentes tejidos [77]. Uno de los órganos más diversos es el intestino, por lo que ha sido estudiado de manera particular a través del proyecto MetaHit. El objetivo es entender la dinámica de las poblaciones microbianas en diferentes estados de desarrollo del ser humano, así como su comportamiento en enfermedades crónicas como la diabetes, la enfermedad de Crohn y el síndrome del colon irritable, entre otras.

Se estima que las células microbianas en el cuerpo humano ascienden a 100 trillones de células, 10 veces más que el número de células humanas, por lo que se sugiere que los microorganismos codifican 100 veces más genes únicos que nuestro genoma [78, 79]. Así, se puede considerar al microbioma

(genoma colectivo de microorganismos que residen en un nicho) como otro órgano, un segundo genoma e incluso investigadores colocan al humano como un “supraorganismo”, donde el metabolismo global representa una mezcla de los atributos microbianos y humanos [78].

El microbioma intestinal está colonizado por cerca de 1500 diferentes especies bacterianas, muchas desconocidas hasta ahora, las cuales son las responsables de la síntesis de vitaminas como biotina, filoquinona (vitamina K1), degradación de ciertos compuestos xenobióticos, y desempeñar un papel relevante en las funciones inmunitarias. Se ha demostrado que existen diferencias significativas en la composición del microbioma entre personas obesas o que sufren de enfermedades inflamatorias intestinales e individuos sanos, de lo que se deduce, que los desequilibrios del microbioma digestivo pueden facilitar la aparición de enfermedades [79]. El suministro prolongado de antibióticos orales también merma la población microbiana afectando la diversidad y la cantidad, como consecuencia disminuye la producción de metabolitos benéficos para el huésped como acetato, propionato y butirato los cuales son útiles para diferentes órganos como el corazón, hígado, músculo, cerebro y eritrocitos [80].

El análisis del microbioma por metagenómica llevó a agrupar las comunidades bacterianas en tres enterotipos (término recién acuñado que relaciona bacterias con rutas metabólicas en común): Bacteroides, Prevotella y Ruminococcus. Los enterotipos no son dependientes ni de la edad, ni del sexo o condición social. El primer enterotipo se caracteriza por ser rico en Bacteroides y Parabacteroides, obtiene su energía principalmente de la fermentación de carbohidratos y proteínas, por lo tanto, la glucólisis y la vía de las pentosas son las rutas metabólicas predominantes. El segundo enterotipo se caracteriza por ser rico en Prevotella y Desulfobivrio, degradan sinérgicamente la mucina, la cual es la glicoproteína preponderante de la capa mucosa intestinal. En el tercer enterotipo dominan los géneros Ruminococcus y Akkermansia, este grupo también es especialista en degradar mucina, además es rico en transportadores de membrana, principalmente de azúcares, así que la forma de producir energía es mediante la hidrólisis de la mucosa y su rápida absorción [81].

VI. LA METAGENÓMICA Y OTRAS ÓMICAS

Como hemos descrito a lo largo de texto, los alcances de la metagenómica son diversos y permiten analizar estructuralmente una comunidad, describir nuevas taxas relacionados con organismos no-cultivables, elucidar cuales especies están relacionadas con ciclos biogeoquímicos, hacer análisis funcionales que abarcan el estudio de rutas metabólicas, síntesis de nuevos antibióticos y enzimas hidrolíticas. Sin embargo, la metagenómica también cuenta con herramientas adicionales de apoyo para evaluar una perturbación, tales como la metatranscriptómica, la metaproteómica y la metabolómica.

La metatranscriptómica determina cuáles genes se están transcribiendo en una determinada condición y así podemos tener un panorama de un fenómeno en otro de los pasos de la transmisión de la información genética. Los resultados obtenidos en diversos estudios donde se ha utilizado tanto metagenómica y metatranscriptómica indican que las comunidades bacterianas se activan de acuerdo a una condición en particular. Cabe señalar que los estudios no deben ser excluyentes sino incluyentes, ya que nos proporcionan información complementaria. Esto tiene implicaciones sobre todo en estudios ecológicos, ayudando a entender la dinámica espacial y temporal de una comunidad o bien de genes determinados [82]. En ese sentido en ecosistemas de suelos, agua dulce y de mar han encontrado que los genes relacionados con la síntesis de ARN, proteínas, plegamiento de proteínas y reparación de ADN son los más abundantes, sugiriendo la importancia de esta clase de genes [83].

Otra forma de relacionar la diversidad genómica con la funcional es a través de la metaproteómica, que es el estudio de las proteínas de una muestra ambiental. La metaproteómica permite investigar qué proteínas se están expresando en una comunidad en un tiempo seleccionado. Debido a la complejidad de extracción, separación y purificación de proteínas, la metaproteómica se ha utilizado poco en el análisis

de comunidades microbianas, a diferencia de la metagenómica y la metatranscriptómica [82]. No obstante lo anterior, hay estudios de ecología y dinámica de poblaciones donde se ha utilizado la metaproteómica y se han identificado a las proteínas más abundantes, por ejemplo las relacionadas con el metabolismo energético o con mantenimiento celular y difícilmente se han detectado enzimas asociadas con procesos biogeoquímicos específicos [23]. Sin embargo, la metaproteómica tiene gran potencial de desarrollo en el descubrimiento de rutas metabólicas para la síntesis de productos naturales con interés farmacológico e industrial, donde el marcaje de proteínas blanco en conjunto con espectrofotometría de masas bidimensional y cromatografía líquida ayudan a la recuperación del metaproteoma [28].

VII. CONCLUSIONES

La metagenómica brinda la oportunidad de aislar nuevas secuencias de ADN que codifican para enzimas y proteínas útiles como fármacos o que participen en vías metabólicas. En conjunto con la tecnología del ADN recombinante y las diversas metodologías de evolución molecular *in vitro* permitirán obtener biomoléculas con propiedades fisicoquímicas adecuadas para las más demandantes aplicaciones industriales. A nivel ecológico, la metagenómica busca ser capaz de estudiar con mayor profundidad a las comunidades microbianas, tanto su estructura como diversidad y entender la sinergia entre las especies, su relación con los ciclos biogeoquímicos. En el caso particular de estudios de suelos, tiene el propósito de comprender mejor los sitios ecológicos de relevancia biológica y biotecnológica. Del mismo modo, los datos generados por secuenciación han permitido encontrar organismos no reportados con anterioridad, como es el caso de *Bacillus coahuilensis*, lo cual es un ejemplo de que a través de la metagenómica se ampliará y modificará el conocimiento que tenemos del árbol de la vida.

La metagenómica nos ayuda a entender la dinámica de las poblaciones microbianas no solo de nichos ambientales sino de nuestro propio cuerpo en diferentes estados fisiológicos y de desarrollo que nos llevan a la formulación de preguntas: ¿quién está ahí? ¿qué está haciendo ahí? ¿cómo lo está haciendo?. Por otro lado, la metagenómica en conjunto con otras técnicas ómicas como la metatranscriptómica y metaproteómica, buscan entender desde un punto de vista holístico el metabolismo en una población. El conocimiento generado por estas técnicas tendrá implicaciones no solo en la comprensión de los ecosistemas, también en la generación de metabolitos de interés biotecnológico. Sin embargo, como toda herramienta, la metagenómica tiene sus bemoles, en este caso, la utilización de técnicas novedosas de secuenciación genera mucha información que aún no ha podido ser clasificada o que no ha sido anotada correctamente. También es necesario que los estudios ecológicos de una muestra ambiental vayan acompañados de estudios metatranscriptómicos, con la finalidad de conocer las vías metabólicas de la comunidad y se puedan proponer a posteriori medios de cultivos con los requerimientos nutricionales necesarios con la finalidad de incrementar el cultivo de nuevos microorganismos.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por el apoyo de la Red Temática 245413 “Biotatálisis para Las Industrias Alimentaria, Técnica y Médica” (BIOCATEM) y a los proyectos CONACyT 154683 y PROMEP 2009-02 103.5/11/6149. Juan Montor-Antonio (28094) y Nohemí Cortés-López (20254) agradecen a CONACyT por las becas otorgadas.

REFERENCIAS

- [1] L.A. Escalante, L.G. Gosset, J.A. Martínez, F.Z. Bolívar. “Soil bacterial diversity: microbial culture-independent methods of study and biotechnological implications”. *Agrociencia*, 2004, 38:583-592.

- [2] J. Handelsman, M. Liles, D. Mann, C. Riesenfeld, R.M. Goodman. "Cloning the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world". *J Microbiol Methods*, 2002, 33:241-255.
- [3] M.R. Rondon, R.M. Goodman, J. Handelsman. "The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity". *Trends Biotechnol*, 1999, 10:403-409.
- [4] M. Keller, K. Zengler. "Tapping into microbial diversity". *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2:141-150.
- [5] K. Zengler, G. Toledo, M.J. Rappe, J. Elkins, E.J. Mathur, *et al.* "Cultivating the uncultured". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99:15681-15686.
- [6] G. Bedoya, L.G. Carvajal, N.R. Bermúdez, F.L. Moreno. "Estructura molecular y poblacional del ganado criollo colombiano (GCC)". *rev Colombiana cienc anim*, 2001, 2:109-120.
- [7] M. Ferrer. "Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables". *Microbiología*, 2004, 38:11-17.
- [8] E.C. Herrera, F. Castellanos. "Análisis metagenómico de la microbiota edáfica de la reserva de la biósfera de Calakmul". *Ide@s*, 2007, 29:802-823.
- [9] M.R. Rondon, P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, *et al.* "Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms". *J App Environ Microbiol*, 2000, 6: 2541-2547.
- [10] D.E. Gillespie, S.F. Brady, A.D. Bettermann, N.P. Cianciotto, M.R. Liles, *et al.* "Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA". *J App Environ Microbiol*, 2002, 9:4301-4306.
- [11] S. Voget, C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K.E. Jaeger, *et al.* "Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome". *J App Environ Microbiol*, 2003,10: 6235-6242.
- [12] H.R. Rojas, Z.J. Narvaez, M.M. Zamudio, M.M.E. Mena. "A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments". *Mol Biotechnol*, 2008, 40:13-17.
- [13] C. Simon, J. Herath, S. Rockstroh, R. Daniel. "Rapid identification of genes encoding DNA polymerases by function-based screening of metagenomic libraries derived from glacial ice". *J App Environ Microbiol*, 2009, 75:2964-2968.
- [14] C.Y. Lay, N.C.S. Mykytczuk, E. Yergeau, G.G. Lamarche, C.W. Greer, *et al.* "Defining the functional potential and active community members of a sediment microbial community in a high-arctic hypersaline subzero spring". *J Appl Environ Microbiol*, 2013, 12:36-37.
- [15] A. Lewin, A. Wentzel, S. Valla. "Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments". *Current Opinion Biotechnol*, 2013, 24:516-525.
- [16] J.M. Peña C., O. Gregorio R., B.E. Barrera F. "Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas". *Educación Química*, 2013, 2:237-246.
- [17] R.G. Bonilla, V. Souza, L.E. Eguiarte. "Metagenómica, genómica y ecología molecular: la nueva ecología en el bicentenario de Darwin". *Tip*, 2008, 1:41-51.
- [18] D.J. Jimenez, F.D. Andreote, D. Chaves, J.S. Montaña, F.C. Osorio, *et al.* "Structural and functional insights from the metagenome of an acidic hot spring microbial planktonic community in the colombian Andes". *PLoS One*, 2012, 12:1-15.
- [19] B. Contreras M., B. Sachman R, I. Figueroa P., P. Vinuesa. "primers4clades: a web server that uses phylogenetic trees to design lineage-specific PCR primers for metagenomic and diversity studies". *Nucleic Acids Res*, 2009, 37:95-100.
- [20] J. Rajendhran, P. Gunasekaran. "Strategies for accessing soil metagenome for desired applications". *Biotechnol Adv*, 2008, 26:576-590.
- [21] D. Cowan, Q. Meyer, W. Stafford, S. Muyanga, R. Cameron, *et al.* "Metagenomic gene discovery: past, present and future". *Trends Biotechnol*, 2005, 6:321-329.
- [22] R.N. Mishra, P.S.L. Singla, S. Nair, S.K. Sopory, M.K. Reddy. "Directional genome walking using PCR". *Biotechniques*, 2002, 33:830-834.
- [23] K.V. Myrick, W.M. Gelbart. "Universal fast walking for direct and versatile determination of flanking sequence". *Gene*, 2002, 284: 125-131.
- [24] C. Simon, R. Daniel. "Metagenomic analyses: past and future trends". *J App Environ Microbiol*, 2011, 1153-1161.

- [25] T. Waschkowitz, S. Rockstroh, R. Daniel. "Isolation and characterization of metalloproteases with a novel domain structure by construction and screening of metagenomic libraries". *J App Environ Microbiol*, 2009, 75:2506-2516.
- [26] I.C. Chen, V. Thiruvengadam, W.D. Lin, H.H. Chang, W.H. Hsu. "Lysine racemase: a novel non-antibiotic selectable marker for plant transformation". *Plant Mol Biol*, 2010, 72:153-169.
- [27] C.S. Riesenfeld, R.M. Goodman, J. Handelsman. "Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes". *Environ Microbiol*, 2004, 6:981-989.
- [28] P.D. Schloss, J. Handelsman. "Biotechnological prospects from metagenomics". *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14:303-310.
- [29] G.P. Pathak, A. Ehrenreich, A. Losi, W.R. Streit, W. Gartner. "Novel blue light-sensitive proteins from a metagenomic approach". *Environ Microbiol*, 2009, 11: 2388-2399.
- [30] S. Voget, H.L. Steele, W.R. Streit. "Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase". *J Biotechnol*, 2006, 126:26-36.
- [31] B.C. Abulencia, D.L. Wyborski, J.A. Garcia, M. Podar, W. Chen, *et al.* "Environmental whole-genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments". *J App and Environ Microbiol*, 2006, 5:3291-3301.
- [32] T. Uchiyama, T. Abe, T. Ikemura, K. Watanabe. "Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes". *Nat Biotechnol*, 2005, 23:88-93.
- [33] C. Wu, B. Sun. "Identification of novel esterase from metagenomic library of Yangtze river". *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19:187-193.
- [34] C. Heath, X.P. Hu, S.C. Cary, D. Cowan. "Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from Antarctic desert soil". *J App Environ Microbiol*, 2009, 75: 4657-4659.
- [35] C.J. Duan, L. Xian, G.C. Zhao, Y. Feng, H. Pang, *et al.* "Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens". *J App Microbiol*, 2009, 107:245-56.
- [36] M.M. Martínez, M. Alcaide, A. Tchigvintsev, O. Reva, J. Polaina, *et al.* "Biochemical diversity of carboxyl esterases and lipases from lake Arreo (Spain): a metagenomic approach". *J App Environ Microbiol*, 2013, 79:3553-3562.
- [37] T. Uchiyama, K. Miyazaki, K. Yaoi. "Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity". *World J Biol Chem*, 2013, 288:18325 -18334.
- [38] M.E. Guazzaroni, F.A. Herbst, I. Lores, J. Tamames, A.I. Peláez, *et al.* "Metaproteogenomic insights beyond bacterial response to naphthalene exposure and bio-stimulation". *ISME J*, 2013, 7:122-36.
- [39] M. Martínez M., I. Lores, C. Peña G., R. Bargiela, D.D. Reyes, *et al.* "Biochemical studies on a versatile esterase that is most catalytically active with polyaromatic esters". *J Microb Biotechnol*, 2014, 2:184-191.
- [40] S. Biver, A. Stroobants, D. Portetelle, M. Vandenbol. "Two promising alkaline β -glucosidases isolated by functional metagenomics from agricultural soil, including one showing high tolerance towards harsh detergents, oxidants and glucose". *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41:479-488.
- [41] B. Wemheuer, R. Taube, P. Akyol, F. Wemheuer, R. Daniel. "Microbial diversity and biochemical potential encoded by thermal spring metagenomes derived from the Kamchatka peninsula". *Archaea*, 2013, 2013:1-13.
- [42] P. Tirawongsoroj, R. Sriprang, P. Harnpichamchai, T. Thongaram, V. Champreda, *et al.* "Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library". *J Biotechnol*, 2008, 133: 42-49.
- [43] L.A. López, D.H. Pieper, M.R. Rosselló, J. Sánchez, J. Seifert, *et al.* "Metaproteogenomic insights beyond bacterial response to naphthalene exposure and bio-stimulation". *ISME J*, 2013, 1:122-36.
- [44] J.M. Aislabie, K.L. Chhour, D.J. Saul, S. Miyauchi, J. Ayton, *et al.* "Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica". *Soil Biol and Biochem*, 2006, 38:3041-3056.
- [45] D. Cowan, N. Russell, A. Mamais, D. Sheppard. "Antarctic dry valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass". *Extremophiles*, 2002, 6:431-436.
- [46] T.P. Curtis, W.T. Sloan, J.W. Scannell. "Estimating prokaryotic diversity and its limits". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99:10494-10499.
- [47] P. Robe, R. Nalin, C. Capellano, T.M. Vogel, P. Simonet. "Extraction of DNA from soil". *Eur J Soil Biol*, 2003, 39:183-90.

- [48] V. Torsvik, L. Ovreas. "Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems". *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5:240-245.
- [49] R.P. McAndrew, J.I. Park, R.A. Heins, W. Reindl, G.D. Friedland, *et al.* "From soil to structure, a novel dimeric β -glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 3 isolated from compost using metagenomic analysis". *J Biol Chem*, 2013, 288:14985-14992.
- [50] T.B.A. Pessoa, S.S. de Souza, A.F. Cerqueira, P.R. Rezende, C.P. Pirovaniand, *et al.* "Construction and validation of metagenomic DNA libraries from land farm soil microorganisms". *Genet Mol Res*, 2013, 2: 2148-2155.
- [51] J. Yao, C.Q. Long, S.A. Xi, W. Cao, L.Y. Huan. "A novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library with tannase activity". *J Mol Catal B Enzym*, 2013, 95:55-61.
- [52] C. Yang, Y. Niu, C. Li, D. Zhu, W. Wang, *et al.* "Characterization of a novel metagenome-derived 6-phospho- β -glucosidase from black liquor sediment". *J Appl Environ Microbiol*, 2013, 7:2121-2127.
- [53] U. Rabausch, J. Juergensen, N. Ilmberger, S. Böhnke, S. Fischer, *et al.* "Functional screening of metagenome and genome libraries for detection of novel flavonoid-modifying enzymes". *J Appl Environ Microbiol*, 2013, 15:4551-4563.
- [54] D. Verma, Y. Kawarabayasi, K. Miyazaki, T. Satyanarayana. "Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (Mxyl) retrieved from compost-soil metagenome". *PLoS One*, 2013, 8:1-8.
- [55] R. Berlemont, O. Jacquin, M. Delsaute, M. La Salla, J. Georis, *et al.* "Novel Cold-adapted esterase MHLip from an antarctic soil metagenome". *Biology*, 2013, 2:177-188.
- [56] S. Biver, D. Portetelle, M. Vandenberg. "Characterization of a new oxidant-stable serine protease isolated by functional metagenomics". *Springerplus*, 2013, 2:1-10.
- [57] T.M. Álvarez, R. Goldbeck, C.R. dos Santos, D.A. Paixão, T.A. Gonçalves, *et al.* "Development and biotechnological application of a novel endoxylanase family GH10 identified from sugarcane soil metagenome". *PLoS One*, 2013, 8:1-13.
- [58] K.C. Ko, Y. Han, D.E. Cheong, J.H. Choi, J.J. Song. "Strategy for screening metagenomic resources for exocellulase activity using a robotic, high-throughput screening system". *J Microbiol Methods*, 2013, 94:311-316.
- [59] L. Jiang, M. Lin, Y. Zhang, Y. Li, X. Xu, *et al.* "Identification and characterization of a novel trehalose synthase gene derived from saline-alkali soil metagenomes". *PLoS One*, 2013, 8:1-11.
- [60] A. Zhang, R. Zhao, P. Jin, L. Ma, X. Xiong, *et al.* "Discovery of a novel esterase subfamily sharing an identified arm sequence (ArmEst) by gene-specific metagenomic PCR". *Biotechnol Lett*, 2013, 35:1937-1944.
- [61] P.K. Pindi, R. RS, T.L. Pavankumar. "Isolation and characterization of novel lipase gene LipHim1 from the DNA isolated from soil samples". *J Microbiol*, 2014, 5:384-388.
- [62] A. Sayed, M.A. Ghazy, A.J. Ferreira, J.C. Setubal, F.S. Chamberg, *et al.* "A novel mercuric reductase from the unique deep brine environment of Atlantis II in the Red Sea". *J Biol Chem*, 2014, 3:1675-1687.
- [63] Z. Mai, H. Su, J. Yang, S. Huang, S. Zhang. "Cloning and characterization of a novel GH44 family endoglucanase from mangrove soil metagenomic library". *Biotechnol Lett*, 2014, 1:1-9.
- [64] H.A. Iqbal, J.W. Craig, S.F. Brady. "Antibacterial enzymes from the functional screening of metagenomic libraries hosted in *Ralstonia metallidurans*". *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 1:19-26.
- [65] S.D. Wang, G.S. Guo, L. Li, L.C. Cao, L. Tong, *et al.* "Identification and characterization of an unusual glycosyltransferase-like enzyme with β -galactosidase activity from a soil metagenomic library". *Enzyme Microb Technol*, 2014, 57:26-35.
- [66] T.A. Sathya, A.M. Jacob, M. Khan. "Cloning and molecular modelling of pectin degrading glycosyl hydrolase of family 28 from soil metagenomic library". *Mol Biol Rep*, 2014, 4:2645-2656.
- [67] J.C. Bergmann, O.Y. Costa, J.M. Gladden, S. Singer, R. Heins, *et al.* "Discovery of two novel β -glucosidases from an Amazon soil metagenomic library". *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 2:147-155.
- [68] K. Hjort, I. Prest, A. Elväng, F. Marinell, S. Sjöling. "Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics". *J Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 6:2819-2828.
- [69] A.E. Escalante, L.E. Eguiarte, A.L. Esponosa, L.J. Forney, A.M. Noguez, *et al.* "Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin". *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 1:50-60.

- [70] V. Souza, A.L. Espinosa, A.E. Escalante, L.E. Eguiarte, J. Farmer, *et al.* "An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahua desert". *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2006, 17:6565-6570.
- [71] V. Souza, L.E. Eguiarte, J. Siefert, J.J. Elser. "Microbial endemism: does phosphorus limitation enhance speciation?" *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6:559-564.
- [72] S. Nee. "Unveiling prokaryotic diversity". *Trends Ecol Evol*, 2003, 18:62-63.
- [73] M. Peimbert, L.D. Alcaraz, A.G. Olmedo, O.F. García, L. Segovia, *et al.* "Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas basin I: ancient lessons on how to cope with an environment under severe nutrient stress". *Astrobiology*, 2012, 12:648-658.
- [74] L.D. Alcaraz, G. Olmedo, G. Bonilla, R. Cerritos, G. Hernández, *et al.* "The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105:5803-8.
- [75] A. Casanueva, M. Tuffin, C. Cary, D. Cowan. "Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies". *Trends Microbiol*, 2010, 18:374-381.
- [76] N. Aghajari, F. Van Petegem, V. Villeret, J.P. Chessa, C. Gerday, *et al.* "Crystal structures of a psychrophilic metallo protease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases". *Proteins*, 2003, 50: 636-647.
- [77] G.G. Cárdenas. "El microbioma humano". *¿Cómo ves?* 2012, 167: 10-14.
- [78] S.R. Gill, M. Pop, R.T. Deboy, P.B. Eckburg, P.J. Turnbaugh, *et al.* "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome". *Science*, 2006, 312:1355-1359.
- [79] J. Qin, R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K.S. Burgdorf, *et al.* "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing". *Nature*, 2010, 464: 59-65.
- [80] A.E. Perez, M.J. Gosalbes, A. Friedrichs, H. Knecht, A. Artacho, *et al.* "Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach". *Gut*, 2012, 11:1591-1601.
- [81] M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, *et al.* "Enterotypes of the human gut microbiome". *Nature*, 2011, 473:174-180.
- [82] I. Zarraindia, D.P. Smith, J.A. Gilbert. "Beyond the genome: community-level analysis of the microbial world". *Biol Philos*, 2013, 28:261-282.
- [83] J.A. Gilbert, D. Field, Y. Huang, R. Edwards, W. Li, *et al.* "Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities". *PLoS One*, 2008, 3:1-13.