

# APORTES Y DIFICULTADES DE LA METAGENÓMICA DE SUELOS Y SU IMPACTO EN LA AGRICULTURA.

## Contributions and difficulties of soil metagenomics and its impact on agriculture

América Rivera-Urbalejo<sup>1,3</sup>, Daniel Vazquez-Sandoval<sup>1</sup>, José Luis Fernández-Vázquez<sup>2</sup>, María Rosete-Enríquez<sup>1,4</sup>, Catherine Cesa-Luna<sup>1</sup>, Y. Elizabeth Morales-García<sup>4</sup>, Jesús Muñoz-Rojas<sup>1</sup>\*, Verónica Quintero-Hernández<sup>1,5</sup>\*

<sup>1</sup> Grupo de Ecología y Supervivencia de microorganismos (GESM), "Ecology and Survival of Microorganisms", Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias (IC), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, México. Edificio IC-11, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570.

<sup>2</sup> Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología Clínica. Unidad de Investigación en Medicina Experimental. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Calle Dr. Balmis, número 148. Colonia Doctores, Alcaldía Cuauhtémoc, Ciudad de México. CP. 06720.

<sup>3</sup> Facultad de Estomatología, BUAP. Av. Manuel Espinosa Yglesias 31 Pte. 1304, Col. Los Volcanes, Puebla, Pue. CP. 72410.

<sup>4</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP. Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio, Ed. BIO 1 CU, Col, Jardines de San Manuel, Puebla, Pue., C.P 72570.

<sup>5</sup> CONACYT-GESM, LEMM, CICM, IC, BUAP.

\* **For correspondence:** joymerre@hotmail.com, vquinterohe@conacyt.mx

**Received:** 18<sup>th</sup> March 2020. **Returned for revision:** 21<sup>st</sup> September 2020. **Accepted:** 13<sup>th</sup> October 2020.

**Associate Editor:** Juan F. González

**Citation/ citar este artículo como:** Rivera-Urbalejo A, Vazquez-Sandoval D, Fernández-Vázquez J, Rosete-Enríquez M, Cesa-Luna C, Morales-García YE, Muñoz-Rojas J, Quintero-Hernández V. Aportes y dificultades de la metagenómica de suelos y su impacto en la agricultura. Acta Biol Colomb. 2021;26(3):449-461. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.85760>

### RESUMEN

Los microorganismos son de gran interés porque colonizan todo tipo de ambiente, sin embargo, uno de los problemas al que nos enfrentamos para conocer su diversidad biológica es que no todos los microorganismos son cultivables. El desarrollo de nuevas tecnologías como la generación de vectores de clonación aunado al desarrollo de técnicas de secuenciación de alto rendimiento ha favorecido el surgimiento de una nueva herramienta llamada metagenómica, la cual nos permite estudiar genomas de comunidades enteras de microorganismos. Debido a que ningún ambiente es idéntico a otro, es importante mencionar que dependiendo del tipo de muestra a analizar será el tipo de reto al cual nos enfrentaremos al trabajar con metagenómica, en el caso específico del suelo existen diversas variantes como la contaminación del suelo con metales pesados o diversos compuestos químicos que podrían limitar los estudios. Sin embargo, pese a las limitaciones que el mismo ambiente presenta, la metagenómica ha permitido tanto el descubrimiento de nuevos genes como la caracterización de las comunidades microbianas que influyen positivamente en el desarrollo de plantas, lo cual en un futuro podría generar un gran impacto en la agricultura. En este artículo se realizó una revisión de diversas investigaciones que han empleado metagenómica, reportadas en las bases de datos de PubMed y Google Scholar, con el objetivo de examinar los beneficios y limitaciones de las diversas metodologías empleadas en el tratamiento del ADN metagenómico de suelo y el impacto de la metagenómica en la agricultura.

**Palabras Clave:** metagenómica, suelo, agricultura, inoculantes, bacterias promotoras del crecimiento PGPR's.

### ABSTRACT

Microorganisms are of great interest because they colonize all types of environment, however, one of the problems we face in knowing biological diversity is that not all microorganisms are cultivable. The development of new technologies such as the generation of cloning vectors coupled with the development of high performance sequencing techniques, have favored the emergence of a new tool in science called metagenomics, which allows us to study genomes of entire communities. Since all environments are different, the type of challenge that we will face when working with metagenomics is going to change depending of the type of sample, in the specific case of soils, there are several variables, such as soil contamination with heavy metals or chemical compounds that could

limit metagenomic studies. However, despite the limitations that the environment presents, with the help of metagenomics, both gene discovery and the characterization of microbial communities that positively influence plant development have been achieved, which could generate a greater impact on agriculture in the future. In this article a review of several investigations that have used metagenomics, reported in the PubMed and Google Scholar databases was carried out, with the aim of examining the benefits and limitations of the various methodologies used in the treatment of metagenomic DNA from soil and the impact of metagenomics in agriculture.

**Keywords:** metagenomics, soil, agriculture, inoculants, PGPR's growth promoting bacteria.

## INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento y hasta la fecha los microorganismos han sido de gran interés ya que colonizan todo tipo de ambiente, lo que les permite participar en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos importantes para el mantenimiento de la vida (Abreu y Taga, 2016). Sin embargo, hoy en día sabemos que solo conocemos las condiciones idóneas para cultivar muy pocos microorganismos del total de los existentes en nuestro planeta, lo cual nos ha obligado a replantearnos la siguiente pregunta ¿realmente cuánto conocemos sobre la diversidad microbiana? En la actualidad, la microbiología ha tomado un nuevo enfoque basado en tratar de conocer y comprender el gran número de microorganismos no cultivables a través del uso de nuevas herramientas como la metagenómica (Solden *et al.*, 2016).

La metagenómica es una herramienta que ha generado un gran avance científico, al permitir la obtención de nuevos genes y conocer la interrelación entre comunidades de microorganismos. En la búsqueda de nuevos microorganismos no cultivables, se desarrollaron nuevas técnicas de biología molecular que permiten la clonación de genes y su secuenciación (Jiang *et al.*, 2016). Esto ha permitido en conjunto con otras áreas como la bioinformática y la genética, estudiar los genomas de toda una comunidad ambiental sin la necesidad de un cultivo previo o del aislamiento de los microorganismos, proporcionándonos mayor información sobre la composición microbiana de un nicho ecológico, su historia evolutiva, las interacciones de los microorganismos, así como, el potencial metabólico que toda la información que se podría obtener de las poblaciones cultivables (Mirete *et al.*, 2016; Faner *et al.*, 2017).

Como menciona el National Research Council (US) Committee on Metagenomics: la metagenómica nunca estará delimitada por una definición, pero algo muy parecido a la conceptualización de la metagenómica sería “la ciencia de descubrir, modelar, comprender y finalmente gestionar a nivel molecular las relaciones dinámicas entre las moléculas que definen micro-comunidades y la biosfera” (National Research Council (US) Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications, 2007).

Por consiguiente, la metagenómica se divide en dos categorías: la metagenómica funcional, la cual se basa en buscar genes con una función determinada apoyándose en el tamizado de una biblioteca metagenómica y

la metagenómica estructural, la cual a partir de la secuenciación de ADN metagenómico se realizan análisis bioinformáticos para tratar de resolver dos preguntas clave ¿Qué microorganismos están presentes? y ¿Qué hace cada uno de ellos? (Ravin *et al.*, 2015).

Sin importar el ambiente o ecosistema a estudiar existen tres pasos importantes en la realización de un estudio metagenómico; el primero es la colecta de la muestra de interés, el segundo es la extracción del ADN total de la muestra y el tercero son las tres diferentes opciones que existen para analizar la muestra. **A)** El ADN metagenómico puede ser sometido a un proceso de digestión y clonación en vectores de expresión como los denominados cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YACs), Cósmidos, o Fósmidos, que nos permiten construir librerías metagenómicas recuperando insertos de ADN mayores a 40 Kb (Jung y Kim, 2018; Piel *et al.*, 2018; Tocchetti *et al.*, 2018; Buckley y Ettensohn, 2019). **B)** amplificación por PCR de los genes que codifican para los ARN's ribosomales (ARN's) 16S o 18S, lo cual permite conocer la diversidad de microorganismos en la muestra (bacterias, arqueas o eucariontes) para realizar un análisis filogenético. **C)** secuenciación directa de la muestra, usando la plataforma de Biosistemas SOLID system o las de nueva generación (NGS) como las de Illumina sequencing technology o Roche Genome Sequencer (Dabdoub *et al.*, 2016; Roeh *et al.*, 2017; Ravi *et al.*, 2018). En cualquiera de las opciones anteriores el paso final es el análisis de secuencias de los genes buscando alguna actividad de interés.

Actualmente se han realizado análisis metagenómicos de diversos ambientes, por ejemplo, los estudios en la cavidad oral nos han proporcionado una mejor comprensión sobre los microorganismos presentes en infecciones endodónticas que afectan a humanos o los microorganismos presentes en enfermedades como la periodontitis (Dabdoub *et al.*, 2016; Sánchez-Sanhueza *et al.*, 2018). Un estudio realizado al aire hospitalario nos ha permitido conocer la diversidad de microorganismos y en un futuro ayudará a tener una mejor comprensión de cómo estos pueden influir en la propagación de infecciones asociadas a la atención médica (King *et al.*, 2016). Los análisis metagenómicos realizados en lodos activados usados para tratar aguas residuales contaminadas con compuestos fenólicos permitieron detectar nuevos genes de resistencia a bleomicina, el cual

es un agente antitumoral de uso clínico (Mori *et al.*, 2008). El estudio enfocado al intestino de las vacas permitió conocer los microorganismos presentes en este ambiente y como estos influyen en la producción de leche (Pitta *et al.*, 2016). Un análisis metagenómico de las aguas subterráneas de Yucatán permitió el descubrimiento de dos nuevos genes que codifican para proteasas (Apolinar-Hernández *et al.*, 2016). El proyecto metagenómico realizado a la producción del vino permitió elucidar el consorcio de microorganismos asociados con la fermentación maloláctica (Berbegal *et al.*, 2019). Además, los estudios metagenómicos de suelo que también han permitido el aislamiento de nuevos compuestos orgánicos como la Turbomicina A y Turbomicina B que exhiben actividad antibiótica contra microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos (Gillespie *et al.*, 2002). Cada uno de los estudios mencionados, más los que se pueden observar en la tabla suplementaria 1, en donde se muestran las diferentes metodologías usadas, el tipo de ambiente de donde proviene la muestra, el método para la generación de librerías y la plataforma elegida para la secuenciación, reafirman que la metagenómica es una herramienta muy poderosa que se puede aplicar a diversos ambientes generando un impacto a nivel de la salud, en química, biotecnología o a nivel farmacéutico. En este artículo se realizó una revisión de trabajos científicos que emplearon metagenómica, usando las bases de datos de PubMed y Google Scholar, con el objetivo de examinar los beneficios y limitaciones de las diversas metodologías empleadas, específicamente en el tratamiento del ADN metagenómico de suelo y el impacto de la metagenómica en la agricultura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos sobre análisis metagenómicos publicados entre los años 2015 a 2020. Los criterios de inclusión en la búsqueda fueron: metagenómica de agua, metagenómica de aire, metagenómica de suelo, metagenómica en alimentos, metagenómica en la agricultura, análisis metagenómicos en salud humana, métodos de extracción de ADN metagenómico y tipo de cepas receptoras de la banca metagenómica.

La revisión se realizó a través de los buscadores PubMed y Google Scholar, los idiomas de los artículos revisados estaban en el idioma inglés seguido del español y los criterios de selección de los artículos hallados se basó en el tipo de ambiente que se usa para el análisis metagenómico, tipo de secuenciación, metodología para la realización de librerías genómicas, área geográfica y metodologías empleadas para el tratamiento del ADN metagenómico.

## METAGENÓMICA DE SUELOS

El suelo es uno de los ambientes más complejos a estudiar debido a su composición y enorme diversidad microbiológica;

ambos elementos influyen en procesos importantes como los ciclos biogeoquímicos que contribuyen a la nutrición y al buen estado de la tierra para diferentes ambientes tanto agrícolas como ambientes extremos.

Si bien se han realizado diversos trabajos metagenómicos enfocados en el suelo, cada uno de ellos ha presentado un reto diferente y esto se debe a que el suelo puede presentar diversas variantes que podrían convertirse en limitaciones si no se elige la metodología correcta para su estudio. Dos de los factores que podrían convertirse en una limitante son la composición y la diversidad microbiana del suelo por ejemplo en el trabajo de Llacsá *et al.* (2019), se buscó identificar los microorganismos presentes en la rizosfera de los árboles de *Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia billbergii*, los cuales son nativos de la región de Tumbes en Perú y se encuentran en peligro de extinción, con la finalidad de implementar programas de reforestación. El estudio mostró que para el árbol *T. billbergii* los filos más abundantes fueron *Glomeromycota*, *Ascomycota*, *Firmicutes*, *Actinobacterias* y *Proteobacterias*, en cuanto a *T. chrysantha* los filos presentes fueron *Ascomycota*, *proteobacterias* y *actinobacterias*, los autores concluyen que se observó una gran diversidad de géneros y de especies de hongos y bacterias, información que forma parte de la base para generar un plan estratégico que les permita mantener la diversidad genética para futuros programas de reforestación.

Otro estudio metagenómico es el realizado por Mendes y Tsai (2018) en una región de bosque y manglar en el sureste de Brasil con la finalidad de conocer la composición taxonómica y funcional de tres regiones: bosque-descanso-manglar que se encuentran muy cercanos entre sí, los resultados obtenidos demostraron que el 94 % de los microorganismos detectados correspondían a bacterias, 3,5 % correspondían a eucariotas y el 1,8 % correspondió a arqueas. Aunque estos microorganismos estaban presentes en las tres áreas, hubo diferencia en su abundancia, la cual está correlacionada con las características específicas de cada suelo, por lo que los autores concluyen que el estudio permitió una mejor comprensión de la relación que existe entre la diversidad microbiana, las funciones y los parámetros ambientales que se podrían utilizar para una mejor conservación de los ambientes.

El análisis metagenómico del suelo de la sabana neotropical ubicado al centro de Brasil compuesto por una combinación de ambientes que abarcan desde los pastizales hasta las formaciones forestales que combinan suelos arcillosos, incluyó ARN ribosomales de alto rendimiento para explorar la composición taxonómica y las funciones potenciales de las comunidades microbianas de cuatro diferentes tipos de suelo: suelos de cerrado denso, cerrado sensu estricto, campo sujo y bosque, bajo las condiciones de dos estaciones diferentes, temporada seca y temporada de lluvias. Como resultado se encontró que durante la temporada de lluvias aumentaban los filos de *Proteobacterias*

y Ascomycetos, mientras que durante la temporada seca existía abundancia de los filos Planctomycetes, Thermoprotei y Glomeromycota. Este estudio permitió ampliar la comprensión de cómo las comunidades microbianas del suelo de la sabana tropical pueden verse influenciadas por la cubierta vegetal y las variaciones temporales de la humedad del suelo (de Castro *et al.*, 2016).

La diversidad y estructura de comunidades fúngicas en suelos neotropicales también ha sido importante, por tal motivo se ha realizado un análisis metagenómico para lograr comprender la distribución y posibles interacciones fúngicas con los árboles endomicorrícicos entre dos diferentes suelos: una plantación y un bosque natural. El análisis mostró 42 ordenes y 14 clases fúngicas diferentes, existiendo heterogeneidad espacial entre los dos tipos de suelos; los autores mencionan que no se observó una fuerte variación en la riqueza de especies, ni en la uniformidad entre las parcelas de árboles. Sin embargo, las especies arbóreas dieron forma a los ensamblajes fúngicos de suelo y cubierta vegetal, explicando hasta el 18 % de la variación entre las comunidades en el bosque natural (Schimann *et al.*, 2017).

Finalmente, Fonseca *et al.* (2018) Realizo un estudio para conocer la diversidad y función de los microbiomas presentes en la reserva forestal amazónica de Snakewood y un suelo a granel, teniendo en cuenta la importancia de los microorganismos en el mantenimiento de los ecosistemas forestales a través de la descomposición del tejido vegetal y liberación nutrientes hacia las plantas. Los resultados indican que existen cambios significativos entre los dos ambientes, los taxones bacterianos y fúngicos son más abundantes en la muestra de la rizosfera forestal, mientras que las arqueobacterias fueron más abundantes en el suelo a granel, sin embargo, se consideró que se requería un mayor número de muestreos para poder comprender que factores son los que impulsan los cambios entre los dos diferentes perfiles microbianos.

Todos los estudios mencionados anteriormente fueron realizados en suelos del trópico y neotrópico cuya finalidad era conocer la composición taxonómica y funcional de diversos ambientes para tener una mejor comprensión de la relación que existe entre la diversidad microbiana y con ello poder resolver problemas como la reforestación. Cada uno de los autores tuvo el reto de elegir un método de extracción de ADN metagenómico que les permitiera conocer la gran diversidad de microorganismos presentes bajo las características específicas de cada suelo, tomaron en cuenta el pH del suelo, sus propiedades químicas y la cantidad de muestra a evaluar, evitando el sesgo de los resultados hacia un grupo específico de microorganismos, hecho en el cual radica el éxito de sus resultados.

Otro factor que podría representar un obstáculo al momento de realizar estudios metagenómicos es la alta concentración de metales o la contaminación del suelo. Por

ejemplo, Smulek *et al.* (2020) realizaron un estudio para caracterizar la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por parte de consorcios nativos de bacterias, este estudio fue realizado en muestras de suelo sujetas a contaminación por más de 40 años. Este estudio reveló las bacterias nativas *Pseudomonas mendocina* y *Brevundimonas olei* estaba presentes y eran capaces de degradar cerca del 60 % de los HAP, además de que el contacto a largo plazo con los compuestos aromáticos indujo a las cepas bacterianas a utilizar los HAP como fuente de carbono y energía.

Otro ejemplo es el estudio del suelo de las aguas termales de Topovan ubicadas en la India, que tuvo la finalidad de conocer la comunidad bacteriana en el suelo con características extremas como alta concentración de azufre y variación de metales dependiendo de la temporada. Se encontraron 14 filos bacterianos diferentes para el periodo de primavera, siendo el filo más representativo el de los Firmicutes y el menos representativo el de Chlorobi (Rawat y Joshi, 2019). Para ambos trabajos el reto consistió en realizar análisis fisicoquímicos del suelo que les permitiera conocer el contenido de HAP o de nitrógeno, fósforo, carbono, azufre y otros metales, así como determinar la humedad del suelo, el nivel de pH, la temperatura e incluso la elección de la distribución del tamaño del grano del suelo. Todos se consideraron factores importantes para que se realizara una correcta extracción de ADN metagenómico y una correcta amplificación de los genes ARN<sup>r</sup> 16S.

El uso de sustratos como indicadores para la identificación de enzimas o la selección de cepas receptoras de las librerías metagenómicas pueden ayudar al desarrollo experimental de algunos estudios. Por ejemplo, el análisis en donde se descubrieron nueve carbapenemasas de clase B, conocidas como metalo-beta-lactamasas (MLB), las cuales no tenían ninguna relación con las MLB anteriormente reportadas y que permitió ampliar la comprensión de la diversidad de MLB en la microbiota del suelo (Gudeta *et al.*, 2016). Para este análisis utilizaron cultivos de selección con antibióticos para seleccionar a las bacterias productoras de carbapenemasas.

Un ejemplo similar es el caso de identificación de microorganismos que usan como fuente de carbono y energía al DMS (sulfato de dimetilo) en ambientes terrestres, el cual permitió detectar bacterias de la familia *Methylophilaceae* que desempeñan una función importante como metilótrofos, los cuales probablemente utilizan enzimas para degradar el DMS; que aún se desconocen ya que estas bacterias tampoco se han logrado cultivar (Eyice *et al.*, 2015). Sin embargo, para detectar esas bacterias utilizaron como sustrato de identificación al propio DMS.

Por último, el análisis de unas muestras provenientes de la Reserva Natural de Kogelberg en Sudáfrica, presentó el reto de realizar una correcta selección tanto del vector en donde se generarían las librerías como de la cepa receptora y la

elección del tamaño de las librerías metagenómicas a tamizar. Con esta cuidadosa metodología se lograron identificar a varios genes, la mayoría cuyas secuencias eran de identidad y función desconocida pero uno de ellos codificando para una proteína con actividad de endonucleasa no específica, abriendo la posibilidad de realizar nuevas caracterizaciones de enzimas que ayuden en el diagnóstico de laboratorio (Mtimka *et al.*, 2020).

Como se puede observar varios son los factores que influyen en el desarrollo del análisis del ADN metagenómico, estos factores se relacionan directamente con el rendimiento y la pureza del ADN extraído del suelo a analizar, la poca diversidad de secuencias reportadas o el tipo de cepa bacteriana receptora de la biblioteca metagenómica, pero ¿Por qué la composición y diversidad microbiana, la contaminación del suelo, el uso de sustratos indicadores para identificación de enzimas o el mismo pH pueden afectar en el análisis del ADN metagenómico? (Katz *et al.*, 2016; Makhalanyane *et al.*, 2016; Holland *et al.*, 2018; Gobbi *et al.*, 2019), a continuación abordaremos estas preguntas.

### Rendimiento y pureza

La obtención de ADN metagenómico de suelo es un paso crítico ya que debe obtenerse en cantidades suficientes y ser de alta calidad. El ADN metagenómico puede obtenerse mediante dos métodos de extracción: directa e indirecta (Gobbi *et al.*, 2019). La extracción de ADN directa consiste, como su nombre lo dice, en extraer el ADN directamente de la muestra ambiental y todos los protocolos reportados se caracterizan por dos pasos, la ruptura de la pared celular que permite liberar a los ácidos nucleicos y la purificación para separar los ácidos nucleicos de los restos celulares y partículas del suelo (Gobbi *et al.*, 2019). Esta metodología presenta ciertas dificultades debido a las propiedades del suelo como el contenido de ácido húmico, la dispersión del suelo, el valor del pH, el contenido celular y otros contaminantes que se encuentran en algunos sedimentos como hidrocarburos aromáticos policíclicos o metales pesados, los cuales pueden dificultar la extracción, cuantificación y amplificación del ADN (Zhou *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2017; Sáenz *et al.*, 2019).

Por otra parte, la extracción de ADN indirecta consiste en separar las células de la matriz en la cual se encuentran, para después lisarlas, con este procedimiento se separan las células bacterianas y arqueas de las células eucariotas a través de un gradiente de densidad (Högfors-Rönholm *et al.*, 2018). Este paso de exclusión genera ciertas ventajas, si se quiere trabajar únicamente con bacterias y arqueas ya que incrementa la cantidad de secuencias que se pueden encontrar en una muestra y el grado de pureza que se obtiene del ADN es mayor, así como el tamaño del ADN que se recupera; lo cual es importante cuando el objetivo del estudio es generar librerías con insertos grandes de ADN. Sin embargo, las desventajas de esta metodología

son que el proceso de exclusión impide realizar estudios de interacciones entre diversos microorganismos y que los rendimientos que se obtienen de ADN son bajos en comparación con la extracción directa (Högfors-Rönholm *et al.*, 2018).

La diversidad de métodos de extracción también genera variación en el rendimiento, calidad y tamaño del ADN obtenido ya que durante cada paso del procedimiento existen variantes. Tan solo en la lisis celular se puede incluir uno o los tres elementos siguientes: ruptura física, lisis química o lisis enzimática, a esto le sumamos que cada uno de los elementos anteriores puede realizarse de diversas maneras. Para la ruptura física se han descrito cuatro técnicas, congelación-descongelación, homogeneización de molinos de bolas, ultrasonido y molienda bajo nitrógeno líquido. En cuanto a las mezclas utilizadas en lisis química, se pueden categorizar en mezclas que contienen detergentes y cloruro de sodio (NaCl) y mezclas que contienen diversos tampones. En el caso de lisis enzimática se ha utilizado lisosima, proteinasa K, acromopeptidasa y pronasa E (Bruner *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2015; Kashi, 2016; Mazziotti *et al.*, 2018). Otro punto importante es el pH del suelo, ya que en suelos arcillosos que poseen un pH bajo, durante el paso de lisis celular se favorece la absorción del ADN en la superficie de la arcilla provocando bajos rendimientos de ADN, ahora se sabe que en algunos casos se pueden obtener mejores rendimientos de ADN utilizando nuevas formulaciones de buffer (solución tampón) (Narayan *et al.*, 2016).

La capacidad de dispersión de los suelos puede variar cuando están en líquido debido a sus propiedades, en algunos no se genera una mezcla homogénea entre el suelo y el buffer, mientras que en otros las muestras absorben gran cantidad de buffer, por lo que es importante garantizar una buena dispersión del suelo para obtener mejores rendimientos de ADN (Ettenauer *et al.*, 2012). Se ha observado que se obtiene mejor rendimiento de ADN al utilizar cantidades de muestras más grandes, lo cual puede ser explicado por la relación entre la cantidad de muestra utilizada y el volumen de buffer utilizado para la extracción, si la dispersión del suelo durante la lisis es problemática, una opción sería reducir el tamaño de la muestra y hacer múltiples extracciones de ADN para el análisis (Ettenauer *et al.*, 2012). La composición de la comunidad bacteriana también puede influir en los rendimientos de ADN, Zhou *et al.* (1996) proponen que la baja lisis celular de algunos suelos puede deberse a un mayor contenido de células Gram-positivas y de estructuras más resistentes como endoesporas.

La extracción del ADN directamente de la muestra ambiental, también puede resultar en una coextracción de otros componentes como los ácidos húmicos y metales pesados, los cuales pueden interferir con las subsiguientes reacciones analíticas, tales como la modificación enzimática del ADN, el análisis por PCR, puede reducir la eficacia de

transformación así como la especificidad en un proceso de hibridación (Técher *et al.*, 2010; Hemmat-Jou *et al.*, 2018). Además, no se recomienda la estimación de la concentración del ADN mediante análisis densitométrico en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (EtBr) debido a que los valores de absorbancia a 260 nm pueden no concordar entre sí debido a la presencia de ácidos húmicos (Kuhn *et al.*, 2017). Se han reportado algunos métodos para eliminar compuestos aromáticos como sustancias húmicas y polifenoles de las muestras del suelo utilizando resinas de intercambio catiónico y detergentes, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxapatita y carbono activado, pero la purificación compromete el rendimiento de ADN (Hemmat-Jou *et al.*, 2018). Otros contaminantes como el cobre pueden estar presentes en las extracciones de ADN de suelos contaminados como lo demostró Sabrina R. Muller-Spitz y colaboradores (Mueller-Spitz *et al.*, 2006), los cuales también interfieren con las modificaciones enzimáticas.

### ¿Cantidad o diversidad?

La evaluación de muchos protocolos para la extracción de ADN se basa frecuentemente en la cantidad y pureza, pero no debemos olvidar que una mayor cantidad de ADN no necesariamente equivale a una mayor diversidad de especies. Stach y colaboradores (2001) evaluaron distintos procedimientos de extracción de ADN observando que los métodos que produjeron las mayores cantidades de ADN no necesariamente presentaban la mayor diversidad de secuencias. En estudios donde se ha usado electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) y electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de fragmentos de ARNr 16S se ha comparado la eficacia y la reproducibilidad de diferentes protocolos de extracción de ADN y han mostrado que los patrones de TGGE y DGGE varían dependiendo del método de lisis (Liu *et al.*, 2016). Se recomienda el uso de varios métodos de extracción y purificación de ADN en el suelo, para estudiar la ecología de un hábitat, debido a que la evaluación de la calidad en la extracción de ADN basadas solo en la cantidad y la pureza son engañosas.

### Tamizado de la biblioteca

La metagenómica funcional tiene dos limitaciones importantes: la primera de ellas es que la expresión del ADN metagenómico se debe llevar a cabo en un huésped diferente del cual proviene, lo que puede generar que no se detecten clones que posean secuencias de nuestro interés. Este sesgo provocado durante el tamizado de la biblioteca metagenómica por la cepa receptora se debe a diversos factores entre los que se incluyen: la preferencia del uso codones, los sustratos faltantes y la incapacidad de reconocer elementos reguladores externos, incluidos los promotores y los sitios de unión ribosómica. Debido a estas consideraciones se ha propuesto que el tamizado de las bibliotecas metagenómicas se realice en diferentes

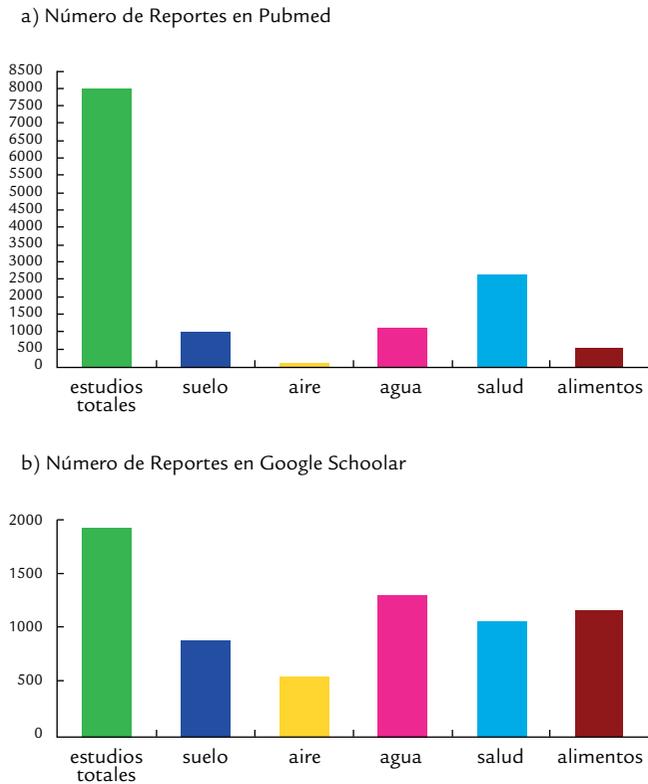
hospederos (Bouhajja *et al.*, 2016). Una suposición general es que el mejor huésped heterólogo probablemente sea un organismo similar o estrechamente relacionado con la fuente donadora del material genético, esta hipótesis no ha sido rigurosamente probada y existe evidencia empírica limitada para respaldar esta afirmación (Zhang *et al.*, 2017). En varios estudios se ha informado que ninguna especie huésped revela la función de todos los genes en una biblioteca metagenómica, por lo que, para la selección de la cepa receptora se recomienda el uso de múltiples especies y tomar en consideración otras características que tengan que ver más con la facilidad de realizar el tamizado de la biblioteca metagenómica, por ejemplo utilizar una cepa receptora en la cual los genes clonados corrijan algún tipo de mutación que no existe en cepas utilizadas convencionalmente como cepas receptoras (Katzke *et al.*, 2017).

La segunda limitante tiene que ver con los sustratos indicadores que se utilizan para la identificación de enzimas, los cuales pueden favorecer a las enzimas más similares al indicador. La utilización de más de un indicador para el tamizado de bibliotecas metagenómicas se ha utilizado con éxito como lo reporta Terrón (Terrón-González *et al.*, 2016), quien obtuvo una gran diversidad de genes que codifican a la enzima dioxigenasa extradiol (Edos); los cuales no se atribuyeron a las subfamilias de Edos previamente definidas. Además, se encontró una relación entre el tipo de sustrato utilizado para el tamizado y el tipo de familia a la cual pertenecen estas Edos, por lo que se sugiere que existe un fuerte sesgo que depende del sustrato utilizado para el tamizado.

La gran diversidad de microorganismos desconocidos que habitan en el suelo representa un gran recurso inexplorado para ser usado tanto en la biotecnología como en la agricultura, por tal motivo desde el 2016 algunos países han desarrollado proyectos metagenómicos enfocados en el estudio del microbioma del suelo como Earth Microbiome Project (<http://www.earthmicrobiome.org>), TerraGenome (<https://www.terragenome.org>), the Brazilian Microbiome Project (<https://www.brmicrobiome.org>) y China soil Microbiome (<http://english.issas.cas.cn/>), con el fin de obtener respuestas a las preguntas: ¿Qué organismos están unidos en un hábitat de suelo? ¿Cómo la abundancia de los microorganismos cambia con el cambio de condiciones edáficas? y ¿Cómo los conjuntos microbianos interactúan e influyen unos con otros? (Nesme *et al.*, 2016; Shao y Gao, 2018; Lacerda-Júnior *et al.*, 2019).

## METAGENÓMICA EN LA AGRICULTURA

Como sabemos, la mayoría de los alimentos que comemos a diario provienen del suelo, por lo que éste también desempeña una función importante en el bienestar de los humanos. En la búsqueda por satisfacer las necesidades alimenticias de una población en crecimiento, en los años 1950-1960 se implementó una



**Figura 1.** Número de análisis metagenómicos reportados en dos diferentes bases de datos y los diversos ambientes estudiados en a) PudMed y en b) Google Scholar.

alternativa denominada revolución verde la cual implicaba la producción masiva de productos agrícolas a través del uso de nuevas variedades de cultivos, grandes cantidades de fertilizantes químicos, pesticidas y mayor irrigación (Davis *et al.*, 2019; Karunarathne *et al.*, 2020). Con esta medida los rendimientos de cultivos se elevaron, sin embargo, con el tiempo estas técnicas provocaron daños al ambiente como la pérdida significativa de la biodiversidad microbiana del suelo y contaminación del aire y del agua (Vassilev *et al.*, 2015). Este hecho a su vez ha generado preocupación sobre el impacto que pueden tener los fertilizantes químicos y los pesticidas en la salud humana, ya que algunos estudios reportan que el exceso de nitrógeno utilizado por el uso continuo de fertilizantes, conduce a la lixiviación del nitrato en el agua subterránea o superficial. A su vez, el nitrato al ser suministrado a las personas a través del agua y entrar en contacto con la flora intestinal se transforma en un compuesto tóxico, ya que la microflora intestinal convierte el nitrato en nitrito y el nitrito a su vez reacciona con la hemoglobina formando metahemoglobina, lo que evita que el oxígeno sea transportado a todo el cuerpo generando, la enfermedad de metahemoglobinemia y en algunos niños la de cianosis (Bryan y Ivy, 2015; Steffan *et al.* 2018). En cuanto a los pesticidas, también se ha reportado que su uso excesivo en la agricultura puede afectar a los humanos, ya

que éstos al ingresar al cuerpo, viajan a través del torrente sanguíneo acumulándose en algunos órganos como el hígado produciendo la enfermedad del hígado graso, también pueden alterar el sistema inmune o pueden llegar hasta el sistema nervioso acumulándose en las neuronas desencadenando enfermedades neuronales como Alzheimer o Parkinson (Pellacani y Costa, 2018). Además de lo anterior, en el sistema reproductivo se ha observado que los pesticidas también pueden producir un desorden hormonal tanto en hombres como mujeres (Liu *et al.*, 2016; Pellacani y Costa, 2018; He *et al.*, 2020).

Una alternativa a la aplicación de fertilizantes y pesticidas es el uso de inoculantes, los cuales están hechos a base de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR's), que en asociación con otros organismos benéficos promueven el crecimiento de las plantas y les confieren protección contra presiones ambientales como las heladas, la salinidad y el estrés por presencia de contaminantes xenobióticos (Baez-Rogelio *et al.*, 2017), lo que se traduce en elevados rendimientos agrícolas, mejor salud y preservación del medio ambiente, ya que con esta alternativa se disminuye el uso de fertilizantes y pesticidas. Hasta el momento se ha observado que la inoculación de plantas con más de tres diferentes bacterias del tipo PGPR's proporcionan mayor beneficio a las plantas en comparación con las inoculadas con una o dos bacterias de este tipo, si bien algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azobacter*, *Variovorax*, *Azospirillum* y *Serratia* han sido comercializadas para ser usadas en el campo aún hace falta tener mayor conocimiento sobre microorganismos que sean benéficos al inocularlos con las plantas y que puedan coexistir en consorcio con otras bacterias (Vejan *et al.*, 2016; Morales-García *et al.*, 2019).

Es por esto que la metagenómica también se ha utilizado para analizar los suelos agrícolas con la finalidad de conocer las comunidades bacteriales endófitas que les permita mejorar la producción y salud de las plantas. Ejemplo de ello, es el estudio de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L), en el cual se identificaron tanto las bacterias como los genes involucrados en la promoción del crecimiento de la remolacha, siendo *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Streptomyces* los géneros bacterianos más abundantes. Mientras que los genes mayormente expresados fueron el gen B-1,3-gluconasa, genes que codifican para quitinasa, el gen que codifica para el isocrotonato piruvato liasa y el gen que codifica para la quinoproteína glucosa deshidrogenasa. Los genes mencionados están involucrados en la supresión de enfermedades de las plantas ya que actúan como antifúngicos y antibióticos contra diversos microorganismos (Tsurumaru *et al.*, 2015). Por otro lado, en *Crocus sativus* (azafrán) se determinó la diversidad fúngica asociada a la rizósfera y a la cormósfera en dos etapas diferentes de floración y durante la etapa latente, mostrando que el filo dominante en la rizósfera fue el

*Zygomycota* mientras que en la cormósfera durante la etapa de floración el filo predominante fue Basidiomycota y en la etapa latente *Zygomycota* y *Rhizopus* fueron los filos más representativos. Sin embargo, tanto Ascomycota como *Fusarium* son filos presentes en ambas etapas siendo este último el hongo responsable de la pudrición del cormo en *C. sativus* (Ambardar *et al.*, 2016).

Otro estudio metagenómico fue el realizado a la rizosfera de plantas de cebada y alfalfa sembradas en suelos contaminados con petróleo con la finalidad de conocer los microorganismos que desempeñan una función importante en la fitorremediación. De este estudio se determinó que tanto en la planta de alfalfa como en la de cebada los microorganismos más abundantes fueron Proteobacterias, Bacteroidetes, Nitrosomonas, Thermi y Chloroflexi, mientras que los microorganismos conocidos como degradadores fueron del género *Alcanivorax* y *Aequorivita* reafirmando su importancia como fitorremediadores presentes en estos dos diferentes tipos de plantas (Kumar *et al.*, 2018). Por otra parte, en el 2015 se conformó el Consorcio Internacional de Microbiomas de Cítricos con la finalidad de conocer el microbioma de la rizósfera de los cítricos. Para este estudio se recolectaron 23 muestras de suelo y de la rizósfera de cítricos de ocho países productores que abarcan a seis continentes, estas muestras incluyeron siete tipos diferentes de suelo con variaciones en el pH que iban desde el rango de 5,2 a 8,8, seis diferentes tipos de clima y suelos con contenidos orgánicos variables en carbono, nitrógeno y fósforo. El estudio reveló que pese a las diferencias geográficas el microbioma central de los cítricos está conformado por *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Cupriavidus*, *Bradiirrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Cellvibrio*, *Sphingomonas*, *Variovorax* y *Paraburkholderia*. Los autores mencionan que este resultado podría sugerir una selección dirigida por la misma planta para rasgos particulares, además de que con este estudio se logra proporcionar información importante que permitirá aislar microorganismos para mejorar la producción y salud de las plantas (Xu *et al.*, 2018). De igual modo el estudio realizado a la rizósfera de la planta *Paspalum scrobiculatum* L (comúnmente llamada kodo millet), del cual se obtiene un grano con valor nutricional importante en los países de Nepal, India, Filipinas, Indonesia, Vietnam, Tailandia y África reveló que el filo bacteriano más abundante en la rizosfera es el de las *Actinobacterias* y *Firmicutes*. Sin embargo, también hay predominancia de otro grupo de bacterias que no se pudieron clasificar pese a la gran cantidad de secuencias analizadas (Prabha *et al.*, 2018).

Un estudio más, fue el realizado a la rizósfera de la planta del cacahuate (*Arachis hypogaea* L) cuya productividad se ve limitada por la sequía, el análisis se realizó bajo las condiciones de sequía y sin ella, para lo cual los resultados obtenidos demostraron que los filos de *Actinobacterias*, *Proteobacterias*, *Saccharibacterias*, *Chloroflexi*, *Acidobacterias* y *Cyanobacterias* eran los dominantes en la rizosfera del

cacahuate; sin embargo bajo las condiciones de sequía los filos de Actinobacterias y Acidobacterias aumentaron tanto en la etapa de plántulas como en la de vainas. En la etapa de floración los filos con mayor presencia fueron Cyanobacterias y Gemmatimonadetes concluyendo que el estudio aportó información importante sobre la relación que existe entre la sequía y los microorganismos presentes en la rizosfera por lo que en un futuro se podrían hacer mejoras a la resistencia ante la sequía modificando los microorganismos presentes en el suelo (Dai *et al.*, 2019).

Muchos suelos agrícolas se encuentran contaminados con aceite de motor, es por ello que Salam *et al.* (2017) realizaron un análisis metagenómico de un suelo agrícola tropical en Nigeria con la finalidad de conocer la composición y función de la microbiota presente. El análisis demostró una abundancia de miembros del filo de Proteobacterias y Actinobacterias, en particular de la especie *Geodermatophilus*, cuya importancia radica en que cada uno de estos microorganismos poseen enzimas que son capaces de degradar hidrocarburos por lo que este estudio podría servir para diseñar mejores estrategias para la biorremediación de suelos contaminados con aceite de motor.

Por último el estudio realizado al cultivo del camote con diferentes tipos de suelo y condiciones climáticas, permitió conocer que en general no existe variación en la comunidad bacteriana con respecto a las condiciones usadas, sin embargo, si existe una predominancia del género bacteriano de *Pseudomonas*, por lo que los autores mencionan que si las bacterias predominantes encontradas tienen propiedades promotoras del crecimiento representarían un enorme potencial para ser utilizadas en los sistemas de producción agrícola (Puri *et al.*, 2019).

En cuanto a la agricultura, la metagenómica nos permite utilizar el conocimiento adquirido en beneficio de la salud y economía, ya que cada análisis anteriormente mencionado nos proporciona información valiosa sobre microorganismos que podrían utilizarse para realizar inoculantes que incluyan más de tres microorganismos capaces de coexistir en consorcio con otras bacterias y potenciar tanto el rendimiento de las cosechas como la protección contra patógenos de plantas disminuyendo o eliminando, en un futuro, el uso de contaminantes.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La Metagenómica surge gracias al desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular y al avance tecnológico en los métodos de secuenciación, con esta herramienta se ha logrado dar un paso importante en la ciencia debido a que se pueden estudiar comunidades enteras de microorganismos en diversos ambientes como podemos observar en la Tabla suplementaria 1, hasta el día 23 de enero del 2020, de acuerdo a las referencias reportadas en PubMed existen 7956 análisis metagenómicos, de los cuales 78 son estudios

realizados en aire, 962 son análisis metagenómicos realizados en alimentos, 1011 son estudios metagenómicos realizados a partir de muestras de suelo, 1114 corresponden a estudios metagenómicos realizados en agua y 2667 corresponden a estudios metagenómicos enfocados en la salud humana (Fig. 1a). Mientras que en el buscador Google Scholar se reportan 1950 estudios metagenómicos, de los cuales, 876 son estudios realizados a partir de muestras de suelo, 534 son estudios realizados en aire, 1310 estudios corresponden a trabajos realizados en agua, 1060, son estudios enfocados en la salud humana y 1160 son estudios realizados en alimentos (Fig. 1b), si bien existe una variación en cuanto a los número de trabajos reportados por los dos diferentes buscadores cada uno de los estudios se ha apoyado en el uso de diversas metodologías de secuenciación y han generado grandes aportes como el descubrimiento de nuevos genes, también nos han permitido tener un mejor conocimiento sobre las comunidades microbianas presentes en espacios físicos, alimentos o enfermedades específicas. Sin embargo, el suelo representa uno de los ambientes más complejos a estudiar, no solo por su composición y diversidad microbiológica, si no por ser la base de la agricultura para la obtención de alimentos. Aunado al desarrollo industrial, el suelo ha sido contaminado con el uso excesivo de pesticidas, fertilizantes y diversos desechos químicos como el petróleo, solventes o metales pesados; los cuales han generado mayor dificultad al momento de realizar estudios metagenómicos. Por lo que debemos tomar en cuenta el tipo de extracción de ADN que realizaremos si pretendemos conocer la diversidad microbiológica para no generar un sesgo en la identificación de estos microorganismos, o que se extraigan otros componentes como ácidos húmicos y metales pesados que nos interfieran con la modificación enzimática del ADN, el análisis de PCR o la eficacia de transformación. Si requerimos identificar enzimas, lo recomendable es usar diversos sustratos indicadores de la presencia de la o las enzimas a identificar y posteriormente amplificar los genes correspondientes, en caso de realizar librerías debemos cerciorarnos de que las cepas receptoras estén relacionadas con la fuente donadora del material genético o usar múltiples especies receptoras para poder detectar clonas con secuencias de nuestro de interés. A pesar de los problemas técnicos, con la metagenómica de suelos ha sido posible conocer genes que participan en procesos importantes para la salud de los humanos. Por ejemplo, la metagenómica aplicada al área de la agricultura no solo nos ha permitido descubrir y comprender la interacción de microorganismos en un nicho específico, sino también ha permitido usar ese conocimiento para mejorar nuestra calidad de vida, ya que si logramos generar inoculantes con más de tres microorganismos del tipo PGPR's, en un futuro no tan lejano se podrían aplicar para potenciar el crecimiento de cultivos agrícolas, hacer un mejor uso de los recursos naturales y evitar el desgaste del medio ambiente.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Ángeles Pérez Oseguera por su invaluable apoyo y asesoría bibliográfica en la realización del presente manuscrito.

## REFERENCIAS

- Abreu NA, Taga ME. Decoding molecular interactions in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(5):648-663. Doi: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw019>
- Al-Amoudi S, Razali R, Essack M, Amini MS, Bougouffa S, Archer JAC, *et al.* Metagenomics as a preliminary screen for antimicrobial bioprospecting. *Gene.* 2016;594(2):248-258. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.021>
- Ambardar S, Singh HR, Gowda M, Vakhlu J. Comparative Metagenomics Reveal Phylum Level Temporal and Spatial Changes in Mycobiome of Belowground Parts of *Crocus sativus*. *PloS One.* 2016;11(9):e0163300. Doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0163300>
- Apolinar-Hernández MM, Peña-Ramírez YJ, Pérez-Rueda E, Canto-Canché BB, De Los Santos-Briones C, O'Connor-Sánchez A. Identification and in silico characterization of two novel genes encoding peptidases S8 found by functional screening in a metagenomic library of Yucatán underground water. *Gene.* 2016;593(1):154-161. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.009>
- Baez-Rogelio A, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Muñoz-Rojas J. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. *Microb Biotechnol.* 2017;10(1):19-21. Doi: <http://doi.org/10.1111/1751-7915.12448>
- Berbegal C, Borruso L, Fragasso M, Tufariello M, Russo P, Brusetti L, *et al.* A Metagenomic-Based Approach for the Characterization of Bacterial Diversity Associated with Spontaneous Malolactic Fermentations in Wine. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16):3980. Doi: <http://doi.org/10.3390/ijms20163980>
- Bouhajja E, Agathos SN, George IF. Metagenomics: Probing pollutant fate in natural and engineered ecosystems. *Biotechnol Adv.* 2016;34(8):1413-1426. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.006>
- Bruner EA, Okubara PA, Abi-Ghanem R, Brown DJ, Reardon CL. Use of pressure cycling technology for cell lysis and recovery of bacterial and fungal communities from soil. *BioTechniques.* 2015;58(4):171-180. Doi: <http://doi.org/10.2144/000114273>
- Bryan NS, Ivy JL. Inorganic nitrite and nitrate: evidence to support consideration as dietary nutrients. *Nutr Res.*

- 2015;35(8):643-654. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.06.001>
- Buckley KM, Etensohn CA. Chapter 7 Techniques for analyzing gene expression using BAC-based reporter constructs. *Methods Cell Biol.* 2019;151:197-218. Doi: <http://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.01.004>
- de Castro AP, Silva MRSS, Quirino BF, Bustamante MMC, Krüger RH. Microbial Diversity in Cerrado Biome (Neotropical Savanna) Soils. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148785. Doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148785>
- Chekanov K, Kublanovskaya A, Lobakova E. Eukaryotic Sequences in the 16S rRNA Metagenomic Dataset of Algal-bacterial Consortia of the White Sea Coastal Zone. *J Eukaryot Microbiol.* 2019;66(5):853-856. Doi: <http://doi.org/10.1111/jeu.12722>
- Dabdoub SM, Ganesan SM, Kumar PS. Comparative metagenomics reveals taxonomically idiosyncratic yet functionally congruent communities in periodontitis. *Sci Rep.* 2016;6:38993. Doi: <http://doi.org/10.1038/srep38993>
- Dai L, Zhang G, Yu Z, Ding H, Xu Y, Zhang Z. Effect of Drought Stress and Developmental Stages on Microbial Community Structure and Diversity in Peanut Rhizosphere Soil. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):2265. Doi: <http://doi.org/10.3390/ijms20092265>
- Davis KF, Chhatre A, Rao ND, Singh D, Ghosh-Jerath S, Mridul A, *et al.* Assessing the sustainability of post-Green Revolution cereals in India. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(50):25034-25041. Doi: <http://doi.org/10.1073/pnas.1910935116>
- Díaz-Torres ML, McNab R, Spratt DA, Villedieu A, Hunt N, Wilson M, *et al.* Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(4):1430-1432. Doi: <http://doi.org/10.1128/aac.47.4.1430-1432.2003>
- Duan C-J, Xian L, Zhao G-C, Feng Y, Pang H, Bai X-L, *et al.* Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. *J Appl Microbiol.* 2009;107(1):245-256. Doi: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04202.x>
- Elend C, Schmeisser C, Leggewie C, Babiak P, Carballeira JD, Steele HL, *et al.* Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(5):3637-3645. Doi: <http://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3637-3645.2006>
- Etenauer JD, Piñar G, Lopandic K, Spangl B, Ellersdorfer G, Voithl C, *et al.* Microbes on building materials--evaluation of DNA extraction protocols as common basis for molecular analysis. *Sci Total Environ.* 2012;439:44-53. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.005>
- Eyice Ö, Namura M, Chen Y, Mead A, Samavedam S, Schäfer H. SIP metagenomics identifies uncultivated Methylophilaceae as dimethylsulphide degrading bacteria in soil and lake sediment. *ISME J.* 2015;9(11):2336-2348. Doi: <http://doi.org/10.1038/ismej.2015.37>
- Faner R, Sibila O, Agustí A, Bernasconi E, Chalmers JD, Huffnagle GB, *et al.* The microbiome in respiratory medicine: current challenges and future perspectives. *Eur Respir J.* 2017;49(4):1620286. Doi: <http://doi.org/10.1183/13993003.02086-2016>
- Fonseca JP, Hoffmann L, Cabral BCA, Dias VHG, Miranda MR, de Azevedo Martins AC, *et al.* Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve. *Gene.* 2018;642:389-397. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.039>
- Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, Cianciotto NP, Liles MR, Rondon MR, *et al.* Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(9):4301-4306. Doi: <http://doi.org/10.1128/aem.68.9.4301-4306.2002>
- Gobbi A, Santini RG, Filippi E, Ellegaard-Jensen L, Jacobsen CS, Hansen LH. Quantitative and qualitative evaluation of the impact of the G2 enhancer, bead sizes and lysing tubes on the bacterial community composition during DNA extraction from recalcitrant soil core samples based on community sequencing and qPCR. *PLoS One.* 2019;14(4):e0200979. Doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0200979>
- Gudeta DD, Bortolaia V, Pollini S, Docquier J-D, Rossolini GM, Amos GCA, *et al.* Expanding the Repertoire of Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- $\beta$ -Lactamases by Functional Metagenomic Analysis of Soil Microbiota. *Front Microbiol.* 2016;7:1985. Doi: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01985>
- He B, Wang X, Yang C, Zhu J, Jin Y, Fu Z. The regulation of autophagy in the pesticide-induced toxicity: Angel or demon? *Chemosphere.* 2020;242:125138. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125138>
- Hemmat-Jou MH, Safari-Sinegani AA, Mirzaie-Asl A, Tahmourespour A. Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicol Lond Engl.* 2018;27(9):1281-1291. Doi: <http://doi.org/10.1007/s10646-018-1981-x>
- Hjelmsø MH, Hellmér M, Fernandez-Cassi X, Timoneda N, Lukjancenko O, Seidel M, *et al.* Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170199. Doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0170199>
- Högfors-Rönholm E, Christel S, Engblom S, Dopson M. Indirect DNA extraction method suitable for acidic soil with high clay content. *MethodsX.* 2018;5:136-140. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.mex.2018.02.005>
- Holland JE, Bennett AE, Newton AC, White PJ, McKenzie BM, George TS, *et al.* Liming impacts on soils, crops and biodiversity in the UK: A review. *Sci Total Environ.* 2018;610-611:316-332. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.020>

- Hong CE, Kim JU, Lee JW, Bang KH, Jo IH. Metagenomic analysis of bacterial endophyte community structure and functions in *Panax ginseng* at different ages. *3 Biotech*. 2019;9(8):300. Doi: <http://doi.org/10.1007/s13205-019-1838-x>
- Jiang L, You W, Zhang X, Xu J, Jiang Y, Wang K, *et al.* Construction of the BAC Library of Small Abalone (*Haliotis diversicolor*) for Gene Screening and Genome Characterization. *Mar Biotechnol* (NY). 2016;18(1):49-56. Doi: <http://doi.org/10.1007/s10126-015-9666-4>
- Jung H-M, Kim Y-H. Simultaneous Overexpression of Integrated Genes by Copy Number Amplification of a Mini-Yeast Artificial Chromosome. *J Microbiol Biotechnol*. 2018;28(5):821-825. Doi: <http://doi.org/10.4014/jmb.1711.11061>
- Karunaratne A, Gunnell D, Konradsen F, Eddleston M. How many premature deaths from pesticide suicide have occurred since the agricultural Green Revolution? *Clin Toxicol Phila*. 2020;58(4):227-232. Doi: <http://doi.org/10.1080/15563650.2019.1662433>
- Kashi FJ. An Improved Procedure of the Metagenomic DNA Extraction from Saline Soil, Sediment and Salt. *Int. Lett. Nat. Sci*. 2016; 60:38-45. Doi: <http://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.60.38>
- Katz M, Hover BM, Brady SF. Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2016;43(2-3):129-141. Doi: <http://doi.org/10.1007/s10295-015-1706-6>
- Katzke N, Knapp A, Loeschcke A, Drepper T, Jaeger K-E. Novel Tools for the Functional Expression of Metagenomic DNA. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1539:159-196. Doi: [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-6691-2\\_10](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-6691-2_10)
- King P, Pham LK, Waltz S, Sphar D, Yamamoto RT, Conrad D, *et al.* Correction: Longitudinal Metagenomic Analysis of Hospital Air Identifies Clinically Relevant Microbes. *PloS One*. 2016;11(12):e0169376. Doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0169376>
- Kuhn R, Böllmann J, Krahl K, Bryant IM, Martienssen M. Comparison of ten different DNA extraction procedures with respect to their suitability for environmental samples. *J Microbiol Methods*. 2017;143:78-86. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.007>
- Kumar V, AlMomin S, Al-Aqeel H, Al-Salameen F, Nair S, Shajan A. Metagenomic analysis of rhizosphere microflora of oil-contaminated soil planted with barley and alfalfa. *PloS One*. 2018;13(8):e0202127. Doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0202127>
- Lacerda-Júnior GV, Noronha MF, Cabral L, Delforno TP, de Sousa STP, Fernandes-Júnior PI, *et al.* Land Use and Seasonal Effects on the Soil Microbiome of a Brazilian Dry Forest. *Front Microbiol*. 2019;10:648. Doi: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00648>
- Liu Y, Yang D, Zhang N, Chen L, Cui Z, Shen Q, *et al.* Characterization of Uncultured Genome Fragment from Soil Metagenomic Library Exposed Rare Mismatch of Internal Tetranucleotide Frequency. *Front Microbiol*. 2016;7:2081. Doi: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02081>
- Llaca LX, Solis-Castro RL, Mialhe E, García-Seminario R. Metagenomic Analysis of the Bacterial and Fungal Community Associated to the Rhizosphere of *Tabebuia chrysantha* and *T. billbergii*. *Curr Microbiol*. 2019;76(9):1073-1080. Doi: <http://doi.org/10.1007/s00284-019-01725-5>
- Mahenthiralingam E, Baldwin A, Drevinek P, Vanlaere E, Vandamme P, LiPuma JJ, *et al.* Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. *PloS One*. 2006;1(1):e17. Doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000017>
- Makhalanyane TP, Van Goethem MW, Cowan DA. Microbial diversity and functional capacity in polar soils. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;38:159-166. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.011>
- Manoharan L, Kozłowski JA, Murdoch RW, Löffler FE, Sousa FL, Schleper C. Metagenomes from Coastal Marine Sediments Give Insights into the Ecological Role and Cellular Features of Loki- and Thorarchaeota. *MBio*. 2019;10(5):e02039. Doi: <http://doi.org/10.1128/mBio.02039-19>
- Mazziotti M, Henry S, Laval-Gilly P, Bonnefoy A, Falla J. Comparison of two bacterial DNA extraction methods from non-polluted and polluted soils. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(1):85-92. Doi: <http://doi.org/10.1007/s12223-017-0530-y>
- Mendes LW, Tsai SM. Distinct taxonomic and functional composition of soil microbiomes along the gradient forest-restinga-mangrove in southeastern Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111(1):101-114. Doi: <http://doi.org/10.1007/s10482-017-0931-6>
- Mirete S, Morgante V, González-Pastor JE. Functional metagenomics of extreme environments. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;38:143-149. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.017>
- Morales-García YE, Baez A, Quintero-Hernández V, Molina-Romero D, Rivera-Urbalejo AP, Pazos-Rojas LA, *et al.* Bacterial Mixtures, the Future Generation of Inoculants for Sustainable Crop Production. En: Maheshwari DK, Dheeman S, editores. *Field Crops Sustain Manag PGPR*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 11-44. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8_2)
- Mori T, Mizuta S, Suenaga H, Miyazaki K. Metagenomic screening for bleomycin resistance genes. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(21):6803-6805. Doi: <http://doi.org/10.1128/AEM.00873-08>
- Mtimka S, Pillay P, Rashamuse K, Gildenhuis S, Tsekoa TL. Functional screening of a soil metagenome for DNA endonucleases by acquired resistance to bacteriophage infection. *Mol Biol Rep*. 2020;47(1):353-361. Doi: <http://doi.org/10.1007/s11033-019-05137-3>

- Mueller-Spitz SR, Vonderheide AP, Shann JR, Caruso JA, Kinkle BK. Use of SEC-ICP-MS with a collision cell for determining the interaction of chromium with DNA extracted from metal-contaminated soils. *Anal Bioanal Chem.* 2006;386(1):142-151. Doi: <http://doi.org/10.1007/s00216-006-0575-2>
- Munar MP, Takahashi H, Okamura Y. Discovery of a Novel Gene Conferring Tellurite Tolerance Through Tellurite Reduction to *Escherichia coli* Transformant in Marine Sediment Metagenomic Library. *Mar Biotechnol (NY).* 2019;21(6):762-772. Doi: <http://doi.org/10.1007/s10126-019-09922-w>
- Narayan A, Jain K, Shah AR, Madamwar D. An efficient and cost-effective method for DNA extraction from athalassohaline soil using a newly formulated cell extraction buffer. *3 Biotech.* 2016;6(1):62. Doi: <http://doi.org/10.1007/s13205-016-0383-0>
- National Research Council (US). Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications. *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet.* Washington D.C.: National Academies Press (US); 2007. p. XX. Doi: <http://doi.org/10.17226/11902>
- Nesme J, Achouak W, Agathos SN, Bailey M, Baldrian P, Brunel D, *et al.* Back to the Future of Soil Metagenomics. *Front Microbiol.* 2016;7:73. Doi: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00073>
- Pellacani C, Costa LG. Role of autophagy in environmental neurotoxicity. *Environ Pollut.* 2018;235:791-805. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.102>
- Piel L, Pescher P, Späth GF. Reverse Epidemiology: An Experimental Framework to Drive Leishmania Biomarker Discovery in situ by Functional Genetic Screening Using Relevant Animal Models. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:325. Doi: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00325>
- Pitta DW, Indugu N, Kumar S, Vecchiarelli B, Sinha R, Baker LD, *et al.* Metagenomic assessment of the functional potential of the rumen microbiome in Holstein dairy cows. *Anaerobe.* 2016;38:50-60. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.12.003>
- Prabha R, Singh DP, Verma MK, Sahu P, Kumar P. Bacterial diversity in rhizosphere of *Paspalum scrobiculatum* L. (kodo millet) is revealed with shotgun metagenome sequencing and data analysis. *Data Brief.* 2018;20:1653-1657. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.dib.2018.09.006>
- Puri RR, Adachi F, Omichi M, Saeki Y, Yamamoto A, Hayashi S, *et al.* Metagenomic study of endophytic bacterial community of sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivated in different soil and climatic conditions. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019;35(11):176. Doi: <http://doi.org/10.1007/s11274-019-2754-2>
- Pyzik A, Ciezewska M, Krawczyk PS, Sobczak A, Drewniak L, Dziembowski A, *et al.* Comparative analysis of deep sequenced methanogenic communities: identification of microorganisms responsible for methane production. *Microb Cell Fact.* 2018;17(1):197. Doi: <http://doi.org/10.1186/s12934-018-1043-3>
- Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2018;1706:223-232. Doi: [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9\\_12](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12)
- Ravin NV, Mardanava AV, Skryabin KG. [Metagenomics as a Tool for the Investigation of Uncultured Microorganisms. *Genetika.* 2015;51(5):519-528.
- Rawat N, Joshi GK. Bacterial community structure analysis of a hot spring soil by next generation sequencing of ribosomal RNA. *Genomics.* 2019;111(5):1053-1058. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.06.008>
- Rehman ZU, Ali M, Iftikhar H, Leiknes To. Genome-resolved metagenomic analysis reveals roles of microbial community members in full-scale seawater reverse osmosis plant. *Water Res.* 2019;149:263-271. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.012>
- Roeh S, Weber P, Rex-Haffner M, Deussing JM, Binder EB, Jakovcevski M. Sequencing on the SOLiD 5500xl System - in-depth characterization of the GC bias. *Nucleus.* 2017;8(4):370-380. Doi: <http://doi.org/10.1080/19491034.2017.1320461>
- SáenzJS, RoldanF, JuncaH, ArbeliZ. Effect of the extraction and purification of soil DNA and pooling of PCR amplification products on the description of bacterial and archaeal communities. *J Appl Microbiol.* 2019;126(5):1454-1467. Doi: <http://doi.org/10.1111/jam.14231>
- Salam LB, Obayori SO, Nwaokorie FO, Suleiman A, Mustapha R. Metagenomic insights into effects of spent engine oil perturbation on the microbial community composition and function in a tropical agricultural soil. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017;24(8):7139-7159. Doi: <http://doi.org/10.1007/s11356-017-8364-3>
- Salazar JK, Carstens CK, Ramachandran P, Shazer AG, Narula SS, Reed E, *et al.* Metagenomics of pasteurized and unpasteurized gouda cheese using targeted 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol.* 2018;18(1):189. Doi: <http://doi.org/10.1186/s12866-018-1323-4>
- Sánchez-Sanhueza G, Bello-Toledo H, González-Rocha G, Gonçalves AT, Valenzuela V, Gallardo-Escárate C. Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using Next-generation sequencing. *Int Endod J.* 2018;51(12):1336-1348. Doi: <http://doi.org/10.1111/iej.12953>
- Schimann H, Bach C, Lengelle J, Louisanna E, Barantal S, Murat C, *et al.* Diversity and Structure of Fungal Communities in Neotropical Rainforest Soils: The Effect of Host Recurrence. *Microb Ecol.* 2017;73(2):310-320. Doi: <http://doi.org/10.1007/s00248-016-0839-0>
- Shao K, Gao G. Soil microbial communities of three grassland ecosystems in the Bayinbuluke, China. *Can J Microbiol.*

- 2018;64(3):209-213. Doi: <http://doi.org/10.1139/cjm-2017-0585>
- Shen F, Li Y, Zhang M, Awasthi MK, Ali A, Li R, *et al.* Atmospheric Deposition-Carried Zn and Cd from a Zinc Smelter and Their Effects on Soil Microflora as Revealed by 16S rDNA. *Sci Rep.* 2016;6:39148. Doi: <http://doi.org/10.1038/srep39148>
- Smulek W, Sydow M, Zabielska-Matejuk J, Kaczorek E. Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH - A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;187:109843. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109843>
- Solden L, Lloyd K, Wrighton K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. *Curr Opin Microbiol.* 2016;31:217-226. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.020>
- StachJEM, BatheS, ClappJP, BurnsRG. PCR-SSCPcomparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001;36(2-3):139-151. Doi: <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00834.x>
- Steffan JJ, Brevik EC, Burgess LC, Cerdà A. The effect of soil on human health: an overview. *Eur J Soil Sci.* 2018;69(1):159-171. Doi: <http://doi.org/10.1111/ejss.12451>
- Stoops J, Ruyters S, Busschaert P, Spaepen R, Verreth C, Claes J, *et al.* Bacterial community dynamics during cold storage of minced meat packaged under modified atmosphere and supplemented with different preservatives. *Food Microbiol.* 2015;48:192-199. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.012>
- Tavares TCL, Normando LRO, de Vasconcelos ATR, Gerber AL, Agnez-Lima LF, Melo VMM. Metagenomic analysis of sediments under seaports influence in the Equatorial Atlantic Ocean. *Sci Total Environ.* 2016;557-558:888-900. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.141>
- Técher D, Martinez-Chois C, D'Innocenzo M, Laval-Gilly P, Bennisroune A, Foucaud L, *et al.* Novel perspectives to purify genomic DNA from high humic acid content and contaminated soils. *Sep Purif Technol.* 2010;75(1):81-86. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.07.014>
- Terrón-González L, Martín-Cabello G, Ferrer M, Santero E. Functional Metagenomics of a Biostimulated Petroleum-Contaminated Soil Reveals an Extraordinary Diversity of Extradiol Dioxygenases. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(8):2467-2478. Doi: <http://doi.org/10.1128/AEM.03811-15>
- Tocchetti A, Donadio S, Sosio M. Large inserts for big data: artificial chromosomes in the genomic era. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(9). Doi: <http://doi.org/10.1093/femsle/fny064>
- Tsurumaru H, Okubo T, Okazaki K, Hashimoto M, Kakizaki K, Hanzawa E, *et al.* Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet. *Microbes Environ.* 2015;30(1):63-69. Doi: <http://doi.org/10.1264/jsme2.ME14109>
- Vassilev N, Vassileva M, Lopez A, Martos V, Reyes A, Maksimovic I, *et al.* Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(12):4983-4996. Doi: <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6656-4>
- Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review. *Molecules.* 2016;21(5):573. Doi: <http://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Vigneron A, Alsop EB, Cruaud P, Philibert G, King B, Baksmaty L, *et al.* Comparative metagenomics of hydrocarbon and methane seeps of the Gulf of Mexico. *Sci Rep.* 2017;7(1):16015. Doi: <http://doi.org/10.1038/s41598-017-16375-5>
- Wagner AO, Praeg N, Reitschuler C, Illmer P. Effect of DNA extraction procedure, repeated extraction and ethidium monoazide (EMA)/propidium monoazide (PMA) treatment on overall DNA yield and impact on microbial fingerprints for bacteria, fungi and archaea in a reference soil. *Appl Soil Ecol.* 2015;93:56-64. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.005>
- Watanabe N, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi JS, Takeshita M, Kirimura Y, *et al.* Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis. *PloS One.* 2018;13(8):e0202049. Doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0202049>
- Xu J, Zhang Y, Zhang P, Trivedi P, Riera N, Wang Y, *et al.* The structure and function of the global citrus rhizosphere microbiome. *Nat Commun.* 2018;9(1):4894. Doi: <http://doi.org/10.1038/s41467-018-07343-2>
- Yan K, Dong Z, Wijayawardena MAA, Liu Y, Naidu R, Semple K. Measurement of soil lead bioavailability and influence of soil types and properties: A review. *Chemosphere.* 2017;184:27-42. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.143>
- Zhang JJ, Tang X, Zhang M, Nguyen D, Moore BS. Broad-Host-Range Expression Reveals Native and Host Regulatory Elements That Influence Heterologous Antibiotic Production in Gram-Negative Bacteria. *MBio.* 2017;8(5). Doi: <http://doi.org/10.1128/mBio.01291-17>
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(2):316-322.