



## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Métodos moleculares avanzados para el monitoreo de muestras ambientales: una propuesta para Cuba

*Unconventional molecular approaches for environmental samples monitoring: A proposal for Cuba*

Janet Jiménez <sup>1</sup>, Annerys Carabeo-Pérez <sup>1</sup>, Gilda Guerra-Rivera <sup>2</sup>

1 Centro de Estudios de Energía y Procesos Industriales. Universidad de Sancti Spíritus "José Martí Pérez", Sancti Spíritus, Cuba

2 Facultad de Biología. Universidad de la Habana, La Habana, Cuba.

\*Autora para correspondencia:  
[janet@uniss.edu.cu](mailto:janet@uniss.edu.cu)

### RESUMEN

La diversidad y dinámica de comunidades microbianas ante cambios ambientales y nutricionales, así como las relaciones metabólicas que se establecen resultan de especial interés para entender el funcionamiento de los ecosistemas. En este trabajo se describen las principales técnicas moleculares utilizadas para determinar la estructura, diversidad, dinámica, o la identificación microbiana en una muestra ambiental, ya sea de un ambiente natural (suelo agrícola) o de un ambiente construido (digestor anaerobio). Además, se proponen estrategias de combinación de métodos moleculares bajo enfoque polifásico basado en experiencias exitosas. Teniendo en consideración las comunidades de diversas bacterias, arqueas y hongos que habitan los ambientes citados, se proponen desde los cebadores a utilizar para aislar genes conservados, las secuencias de sondas de ADN marcadas, hasta las combinaciones de técnicas utilizables para caracterizar una comunidad microbiana bajo enfoque polifásico, según su dinámica, diversidad, cuantificación e identificación. Las técnicas metagenómicas clásicas y de última generación constituyen herramientas poderosas para monitorear muestras ambientales, con un costo beneficio aceptable para países como Cuba.

**Palabras clave:** métodos moleculares, 16S ARNr, metagenómica, microbiología del suelo, digestores anaerobios

### ABSTRACT

*The diversity and dynamics of microbial communities during environmental and nutritional changes, as well as the metabolic relationships established, are of special interest to understand the functioning of ecosystems. This paper describes the main molecular techniques used to determine the structure, diversity, dynamics, or microbial identification in an environmental sample, either from a natural environment (agricultural soil) or from a built environment (anaerobic digester). In addition, strategies for the combination of molecular methods under a polyphasic*

Recibido: 2020-08-26

Aceptado: 2021-05-22

*approach based on successful experiences are proposed. Taking into consideration the communities of diverse bacteria, archaea and fungi that inhabit the mentioned environments, we propose from the primers to use to raise conserved genes, the sequences of labeled DNA probes, to the combinations of techniques usable to characterize a low microbial community polyphasic approach, according to its dynamics, diversity, quantification and identification. The classical and next generation metagenomic techniques are powerful tools for monitoring environmental samples, with a cost benefit acceptable to countries like Cuba.*

**Keywords:** molecular methods, 16S rRNA, metagenomics, soil microbiology, anaerobic biodigesters

## INTRODUCCIÓN

El estudio de poblaciones microbianas en sedimentos marinos y ambientes contaminados de suelo y agua, ha sido crucial para elucidar las evidencias científicas del cambio climático. A su vez, el creciente desarrollo de tecnologías ambientales para el tratamiento de residuales y/o su aprovechamiento bioenergético (obtención de bioetanol, biogás, biometano, biohidrógeno) ha conllevado al estudio de la microbiota responsable de estos procesos. En estos ambientes las comunidades microbianas resultan complejas dado por la diversidad de especies de bacterias, arqueas y hongos que coexisten e interactúan en un mismo ecosistema.

La dinámica de estas poblaciones ante cambios ambientales y nutricionales, así como las relaciones metabólicas que se establecen resultan de especial interés para entender el funcionamiento de estos ecosistemas y los ciclos biogeoquímicos (Nazaries *et al.*, 2013). Los estudios de caracterización de estos ambientes basados en técnicas microbiológicas dependientes de cultivo no satisfacen las necesidades actuales ya que únicamente entre 0,1 y 10% de las bacterias en el ambiente son cultivables (Handelsman *et al.*, 2002). Por ello, se hizo necesaria la búsqueda de métodos de evaluación independientes del cultivo, como los métodos moleculares, que permiten analizar la diversidad taxonómica y estructura espacial de comunidades microbianas complejas, identificar poblaciones microbianas específicas en su hábitat natural, generando resultados confiables y en un corto período de tiempo. El aislamiento de genomas de diferentes especies a partir de una muestra (metagenoma) ha permitido la caracterización filogenética de diversos microbiomas, la identificación de nuevos genes, incluso elucidar relaciones metabólicas (Escalante-Lozada *et al.*, 2004).

En Cuba, se han informado muy pocos estudios ambientales donde se apliquen las técnicas metagenómicas, en específico aquellos ambientes de suelos conta-

minados o sistemas de descontaminación construidos como los digestores anaerobios (Jiménez *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2015; Jiménez *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2017). La apropiación de estas técnicas moleculares de avanzada, en países en vías de desarrollo, ha estado limitada a los costos de adquisición de equipos, reactivos y consumibles además, al análisis costo beneficio, pues muchos se preguntan si es necesario o no la identificación microbiológica de estas comunidades complejas. Es por ello, que este trabajo pretende describir las principales técnicas moleculares utilizadas para determinar la estructura, diversidad, dinámica, o la identificación microbiana en una muestra ambiental, ya sea de un ambiente natural (suelo agrícola) o de un ambiente construido (digestor anaerobio). Para estos casos se proponen estrategias de selección de métodos moleculares bajo enfoque polifásico basado en la experiencia exitosa de estudios previos de los autores.

### Comunidades microbianas de importancia ambiental: microbiota en suelo y en digestores anaerobios

La diversidad genética del metagenoma de muestras de suelo ha permitido conocer a profundidad su diversidad metabólica, incluyendo la de aquellos microorganismos considerados cultivables y de los aún no descritos (Escalante-Lozada *et al.*, 2004). Algunos estudios han demostrado que en un suelo agrícola coexisten principalmente bacterias y hongos. Borneman *et al.*, (1996) obtuvieron en muestras de suelo una composición dada por *Proteobacterias* (16,1%), y del grupo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (2,18%); 21,8% del grupo de bacterias Gram (+) con bajo porcentaje de G+C, 39,4% distribuidas en grupos desconocidos dentro del Dominio *Bacteria*. Otros autores detectaron baja proporción de *Firmicutes*,  $\alpha$ -*Proteobacterias* en comparación con la representación de las Subdivisiones  $\beta$ - y  $\gamma$ -*Proteobacteria* en otro tipo de suelo agrícola; y

presencia de secuencias relacionadas con subdivisiones que carecen de representantes cultivables (Liles *et al.*, 2003). Los hongos, por su parte, están representados por una amplia variedad de familias según los estudios de diversidad, teniendo en cuenta que tienen importantes funciones en el suelo. Por ejemplo, tienen la capacidad de establecer asociaciones simbióticas con las plantas, descomponer materia orgánica, catalizar procesos fermentativos, producir moléculas bioactivas (Floudas *et al.*, 2012; Raja *et al.*, 2017), entre otras. Con el empleo de marcadores moleculares en hongos, se han llegado a identificar numerosas especies que forman parte de la microbiota del suelo. Entre los géneros identificados se incluyen *Fusarium*, *Trichoderma*, *Ceratocystis*, *Colletotrichum*, *Melampsora*, *Monilinia*, *Mycosphaerella*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Puccinia*, *Stenocarpella*, *Thecaphora*, *Verticillium* y *Aspergillus* (Singh *et al.*, 2006; Raja *et al.*, 2017).

Sessitsch *et al.*, en 2001 estudiaron, por técnicas moleculares, cómo el tamaño de partícula de suelo tiene mayor impacto sobre la diversidad bacteriana que el pH y el tipo y cantidad de compuestos orgánicos. Otros estudios también mostraron el predominio de bacterias Gram (+) y pocos miembros del grupo de las proteobacterias y bacterias verde-sulfurosas (15% y 5%) (Smit *et al.*, 2001). Este autor logró aislar especies de los géneros *Micrococcus*, *Arthobacter* y *Corynebacterium* (presentes todo el año), y especies de *Bacillus* (sólo en julio). Además, detectó especies de *Acidobacterium*, *Proteobacteria*, *Nitrospora*, cianobacterias y bacterias verde-sulfurosas.

Por su parte, en ambientes construidos como los digestores anaerobios coexiste una compleja y variada comunidad microbiana, cuya interacción sinérgica de diferentes grupos de bacterias, hongos y arqueas, permiten convertir la materia orgánica en metano y dióxido de carbono. En general, se informan diferentes bacterias como los que pertenecen al *phylum Firmicutes* y los miembros de los géneros *Clostridium* y *Bacillus* y los que pertenecen al *phylum Bacteroidetes* de amplia distribución en el medio ambiente, donde la clase *Bacteroidetes* es una de las más importantes pues incluye el género *Bacteroides*, (Madigan *et al.*, 2010). Además, pueden encontrarse, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* predominantes (Wang *et al.*, 2018). En cuanto a las arqueas metanógenas se han notificado más de 60 especies pertenecientes a 3 órdenes, 7 familias y 19 géneros como *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanobrevi-*

*bacter* y *Methanomicrobium* (Wang *et al.*, 2018). De igual forma se han identificado y descrito hongos en sistemas anaerobios pertenecientes a los géneros *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Buwchfawromyces*, *Oontomyces*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces* y *Orpinomyces* fundamentalmente (Callaghan *et al.*, 2015; Dagar *et al.*, 2015; Griffith *et al.*, 2010; Gruninger *et al.*, 2014; Haitjema *et al.*, 2014; Dollhofer *et al.*, 2016).

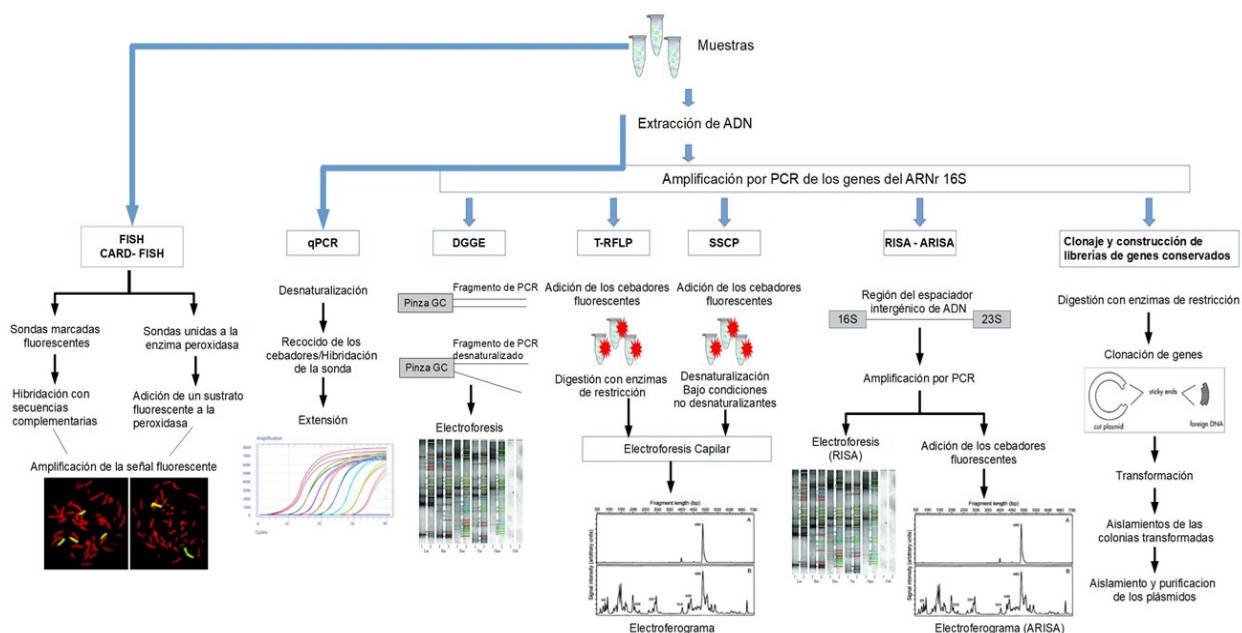
### Técnicas moleculares utilizadas para el monitoreo de muestras ambientales

El uso del análisis comparado de la secuencia del gen *ARNr 16S* ha sido muy importante para el desarrollo de la taxonomía moderna de los procariotas. En el caso de los hongos se utiliza el gen *18S* (Baker *et al.*, 2003). Los genes ribosomales constituyen un marcador evolutivo dado por su distribución universal, su función constante y su cambio con suficiente lentitud como para permitir detectar relaciones muy antiguas. El gen *16S ARNr* es de un tamaño relativamente pequeño (1,5 kb) y tiene una estructura de mosaico que alterna regiones hipervariables altamente conservadas en el reino Procariota. El gen *rrs* conocido comúnmente como gen *ARNr 16S*, ha sido el más utilizado como marcador molecular (Madigan *et al.*, 2010).

Con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) y la secuenciación, se han agilizado los análisis mediante la clonación y posterior secuenciación clásica (método Sanger) del gen *ARNr 16S* usando cebadores universales que permiten un análisis más profundo de las comunidades microbianas (Cortés, 2010). Para el monitoreo de las comunidades microbianas anaerobias, las herramientas moleculares más usadas pueden agruparse en dos categorías: sondas moleculares, usadas con mayor eficiencia cuando se tiene un conocimiento previo de la población microbiana, y análisis de fragmentos de ADN, usada cuando no se conoce la estructura de la comunidad microbiana (Anneli *et al.*, 2007). Las técnicas basadas en sondas moleculares más usadas, incluye a la Hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH, del inglés *Fluorescence In Situ Hybridization*) y la FISH combinada con la amplificación enzimática de la señal de fluorescencia (deposición de la preteína fluorogénica catalizada) (CARD-FISH, del inglés *Catalyzed Reporter Depositin-Fluorescence In Situ Hybridization*) (Sanz y Kochling, 2007; Amann y Fuchs, 2008).

Las técnicas basadas en el análisis de fragmentos de ADN, parten de la necesidad de extraer el ADN y amplificar las secuencias por PCR y se diferencian en cuanto a la separación de los fragmentos amplificados y su visualización (Anneli *et al.*, 2007). A continuación

se presentan los detalles de las técnicas moleculares más utilizadas para el monitoreo de muestras ambientales las cuales pueden agruparse en forma del esquema siguiente (fig. 1).



**Figura 1.** Resumen de las técnicas moleculares clásicas más usadas en muestras ambientales

**Figure 1.** Summary of the most commonly used classical molecular techniques in environmental samples

### Hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH)

La técnica de FISH utiliza sondas marcadas con fluorescencia y se basa en la hibridación específica de dos secuencias de ácidos nucleicos complementarios, donde la sonda marcada forma un híbrido con secuencias específicas de la célula diana. La señal de la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia y la muestra se clasifica según la presencia o ausencia de la señal (Wagner *et al.*, 2002; Rodríguez, 2011). Ha sido muy utilizada en estudios filogenéticos o la cuantificación de poblaciones, pues es una técnica confiable y rápida, además de no requerir extracción ni amplificación y de ser útil en la identificación de microorganismos filamentosos, los cuales acumulan lodo y forman espuma lo que dificulta el tratamiento de aguas residuales (Wilderer *et al.*, 2002). Además, las sondas fluorescentes se pueden marcar con colorantes de diferente emisión de longitud de onda, permitiendo de esta manera detectar varios tipos de sondas en un mismo experimento (Pernthaler y Amann, 2004).

Una variante de esta metodología es la técnica denominada CARD-FISH, en la cual la sonda no está unida directamente a un fluorocromo, sino que está acoplada a la enzima peroxidasa revelándose su hibridación mediante la adición de un sustrato fluorescente para la peroxidasa y permite amplificar la señal de las células hibridadas, facilitando su visualización al microscopio de fluorescencia (Pernthaler *et al.*, 2002; Zwirgmaier, 2010). En ambos casos, las desventajas de estas técnicas radican en el muestreo, las repeticiones biológicas y la adecuada fijación de la muestra.

### Polimorfismo de longitud de fragmentos terminales de restricción (T-RFLP)

El análisis de T-RFLP es una herramienta molecular efectiva para determinar la composición de la comunidad microbiana y la abundancia relativa de las poblaciones respectivas (Liu *et al.*, 1997; Schütte *et al.*, 2008). El TRFLP utiliza fragmentos marcados con fluorescencia que también han sido amplificados por

medio de PCR. Utiliza las tecnologías de secuencias automatizadas para separar los fragmentos terminales polimórficos después de la digestión con enzimas de restricción, donde se detectan las bandas fluorescentes. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis capilar acoplados a moléculas de peso molecular correspondiente para determinar el largo de los fragmentos marcados fluorescentes (Contreras Medina, 2011). Esta herramienta ha sido aplicada exitosamente en diferentes ecosistemas como los bio-reactores anaerobios (Padmasiri *et al.*, 2007; Rademacher *et al.*, 2012, Jiménez *et al.*, 2014, Jiménez *et al.*, 2016).

#### **Electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) o gradiente de temperatura (TGGE)**

La DGGE (del inglés denaturing gradient gel electrophoresis) es un método que permite distinguir la composición de una comunidad microbiana particular, con base en las diferencias en secuencia genética de fragmentos de ADN generados por PCR cuando se sujetan a un gradiente desnaturante, lo que conlleva la separación de los fragmentos con base en su composición nucleotídica. Las diferentes secuencias de ADN (de diversos microorganismos) se desnaturalizan a distintas concentraciones del desnaturante, lo que resulta en un patrón de bandas específico. Cada banda representa, teóricamente, una población microbiana específica presente en la comunidad (Andrade Ochoa *et al.*, 2015). Esta es una técnica simple que posee altas tasas de sensibilidad y detección, sin embargo, su principal dificultad es que especialmente en comunidades complejas las bandas pueden originarse a partir de dos o más fragmentos que migran simultáneamente en el gel, por eso el proceso de extracción y amplificación son claves para el éxito de los resultados (Schramm y Amann, 1999).

La TGGE (del inglés temperature gradient gel electrophoresis) se basa en el mismo principio que la DGGE pero en este caso la separación de los fragmentos de ADN ocurre en un gradiente de temperatura lineal. La DGGE y la TGGE tienen algunas limitaciones específicas, por ejemplo, se pueden utilizar para separar solamente los fragmentos relativamente pequeños (Myers *et al.*, 1985) y exhiben solamente los amplicones del ADN<sub>r</sub> obtenidos de las especies predominantes (Murray *et al.*, 1996; Myuzer y Smalla 1998).

#### **Librerías de clones**

Una librería de ADN genómico, es un conjunto de fragmentos de ADN de un organismo que han sido clonados en vectores (plásmidos), que son almacenados en células bacterianas. Las bibliotecas genómicas tienen diversas aplicaciones como: secuenciar un gen entero o una región de un cromosoma, secuenciación de genomas o para identificar promotores (Posadas, 2014). Las librerías de comunidades microbianas contienen información acerca de las propiedades funcionales y la distribución filogenética de un ecosistema. Dependiendo del propósito de investigación, dichas bibliotecas pueden ser construidas por fragmentos de bajo o alto peso molecular; aquellas construidas con insertos de bajo peso molecular (1-10 Kb) pueden ser usadas para la búsqueda individual de la función de un gen "function screening". En contraparte existen métodos que utilizan ADN de alto peso molecular, que llevan a la construcción de bibliotecas con insertos de gran tamaño (20-100Kb) favoreciendo de este modo el descubrimiento de genes múltiples u operones, además, insertos que pueden contener marcadores filogenéticos dentro del mismo (Henao, 2013).

#### **Polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP)**

Esta técnica se basa en el análisis del polimorfismo a través de las diferencias conformacionales de los fragmentos de ADN de una sola hebra. Las diferentes conformaciones son detectables como un cambio de movilidad en geles de poliacrilamida no desnaturantes. Es especialmente útil cuando las PCR producen bandas de ADN grande, o bandas de tamaño muy similar; Permite distinguir cambios de pocos nucleótidos. El análisis SSCP se usa ampliamente para comparar la diversidad microbiana en respuesta a los cambios en las condiciones ambientales o de operación del proceso, especialmente cuando la diversidad es baja (Cabezas *et al.*, 2015).

#### **Análisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA)**

RISA (del inglés *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) es un método de análisis de la comunidad microbiana que proporciona estimaciones de la diversidad microbiana y la composición de la comunidad. El método se basa en la amplificación de la región intergénica, localizada entre los genes ARNr de la subunidad 16S y 23S. Esta región se caracteriza por una variabilidad

significativa en la longitud y la secuencia de nucleótidos entre diferentes genotipos microbianos (Fisher y Triplett, 1999). Es un método robusto que permitió el análisis detallado de la estructura de la comunidad arqueal durante la conversión de biomasa orgánica en biogás (Ciesielski *et al.*, 2013).

Posteriormente el proceso de separación del ADN amplificado se mejoró al involucrar un cebador oligonucleotídico marcado con fluorescencia para la amplificación por PCR y la posterior electroforesis en un sistema automatizado; es decir, Análisis Automatizado del Espaciador Intergénico Ribosomal (ARISA, por sus siglas en inglés *automated approach for ribosomal intergenic spacer*) (Ciesielski *et al.*, 2013). ARISA es una técnica rápida y eficaz para evaluar la diversidad y la composición de la comunidad microbiana que puede ser especialmente útil en las escalas espaciales y temporales en los estudios ecológicos (Fisher y Triplett, 1999).

#### **Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (q-PCR)**

Los enfoques cuantitativos de PCR se aplican ampliamente en la ecología microbiana para cuantificar la abundancia y la expresión de marcadores genéticos taxonómicos y funcionales en el medio ambiente (Smith y Osborn 2009). Aunque se puede usar para detectar y cuantificar especies individuales en un entorno determinado en tiempo real, no es posible cuantificar a toda la población si la comunidad no se conoce previamente (Yu *et al.* 2005). En consecuencia, en ecosistemas complejos como la digestión anaeróbica, se requieren otros enfoques de metagenómica para identificar los dominantes o las especies clave.

#### **Técnicas moleculares de tercera y cuarta generación: técnicas metagenómicas**

Para abordar un análisis del complejo y denso ecosistema microbiano, los métodos anteriores proporcionan una visión incompleta de la composición microbiana, revelando solo la existencia de los taxones más abundantes. En los últimos años, el rápido desarrollo de las técnicas de secuenciación de última generación ha permitido secuenciar un gran número de taxones mediante el gen *16S ARNr* de bacterias no cultivables, con un coste económico y de tiempo mucho más bajo que la secuenciación tipo *Sanger*. Además, estas técni-

cas evitan el paso previo por procedimientos basados en la clonación y/o cultivo, que antes eran necesarios, con sus sesgos asociados, permitiendo que las comunidades microbianas puedan ser investigadas con una mayor resolución e identificando taxones que son menos abundantes (Maccaferri *et al.*, 2011).

El desarrollo de enfoques metagenómicos basados en la secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*), ha sido uno de los grandes avances en biología molecular, especialmente para explorar microbiomas que participan en el recambio de biomasa y redes funcionales tanto en hábitats naturales como en sistemas de ingeniería biotecnológica. Metagenómica es el análisis del material genético microbiano total recuperado directamente de muestras ambientales, que permite el análisis de genomas de las especies microbianas más abundantes sin la necesidad de aislar y cultivar especies microbianas individuales (Vélez, 2009; Hernández-León *et al.*, 2010). En resumen, mediante la aplicación de estrategias metagenómicas, muchos problemas se vuelven factibles, por ejemplo: i) la caracterización filogenética de la estructura de la comunidad microbiana, ii) la caracterización de genomas de especies microbianas no caracterizadas hasta la fecha, iii) la identificación del potencial metabólico de una comunidad microbiana en términos de la presencia de genes que codifican enzimas involucradas en vías metabólicas específicas presentes o incluso nuevas vías metabólicas (Bosi *et al.*, 2017; Bedoya *et al.*, 2019); iv) la identificación de mecanismos biológicos de resistencia a compuestos contaminantes (p. ej., toxinas) y factores estresantes bióticos (p. ej., fagos y especies microbianas competitivas).

El rápido desarrollo de las tecnologías NGS ha permitido la identificación de una gran cantidad de taxones de bacterias difíciles o incluso no cultivables, mediante la secuenciación del amplicón del gen *16S ARNr*, a costos comparativamente bajos (Maccaferri *et al.*, 2011; Heather and Chain 2016). Mediante el análisis de metagenomas, es decir, la aplicación de estrategias de ensamblaje y agrupación, es posible determinar casi todo el potencial genético de esas especies microbianas no caracterizadas (Maus *et al.*, 2018).

Entre estas tecnologías se encuentran la pirosecuenciación (454 *Life Sciences*) (Ronaghi *et al.*, 1996), la secuenciación masiva utilizando el sistema *Illumina* (Lazarevic *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010; Oulas *et al.*, 2015), la secuenciación por ligadura (SOLiD) y

secuenciación basada en la detección de pH (*Ion Torrent*) (Pennisi, 2010). En los últimos años, la plataforma de secuenciación de *Illumina* se aplica más ampliamente y, por lo tanto, se puede considerar que ha hecho la mayor contribución a la segunda generación de secuenciadores de ADN (Heather y Chain, 2016).

### Tecnologías de tercera generación

Las tecnologías de tercera generación consideran las secuencias de nucleótidos que se leen a nivel de una sola molécula, evitando los requisitos de amplificación de ADN que se exigen en todas las tecnologías anteriores (Heather y Chain, 2016). Al permitir la secuenciación directa de moléculas de ADN individuales, las tecnologías de secuenciación de tercera generación tienen la capacidad de producir lecturas más largas que la secuenciación de la segunda generación (Bleidorn, 2016). Sin embargo, debido a varios desafíos técnicos, la secuenciación de tercera generación tiene índices de error en niveles casi irreparables, lo que hace que las tecnologías no sean prácticas para ciertas aplicaciones como el ensamblaje del genoma *de novo* (Gupta, 2008). La secuenciación de tercera generación supera los métodos existentes, especialmente si se combina con otras tecnologías de NGS con bajo índice de errores (Eid *et al.*, 2009; Ortiz y Carrara, 2017).

### La secuenciación de nanoporos

Esta una de las tecnologías más prometedoras que se está desarrollando como una alternativa más económica y más rápida con respecto a los métodos de secuenciación convencionales (Rhee y Burns, 2006; Schneider y Dekker, 2012). Los nanoporos biológicos, también llamados canales de proteínas transmembrana, generalmente se insertan en un sustrato, como bicapas lipídicas planas, liposomas u otras películas de polímeros. Hay dos áreas principales de secuenciación de nanoporos en desarrollo: nanoporos de estado sólido sintético y nanoporos biológicos (Buermans y den Dunnen, 2014). Sus ventajas incluyen su estructura y tamaño bien definidos y altamente reproducibles, y su fácil modificación mediante técnicas moleculares modernas, por ejemplo, cambiando el residuo de aminoácido en un sitio específico por una mutación de nucleótido específica, dirigida a identificar y cuantificar una amplia variedad de muestras (Feng *et al.*, 2015). Se espera que esta tecnología reduzca el costo de la secuenciación (Torre *et al.*, 2012), haciéndolo accesible para laboratorios pequeños o individuales

(Ortiz y Carrara, 2017). Sin embargo, como limitación, carecen de estabilidad y tienen un tamaño y perfil de poros constantes. Además, las celdas de flujo y los consumibles para este sistema son aproximadamente de \$ 500 a \$ 900 (Nanopore Store 2018), lo que sigue siendo demasiado costoso y, por lo tanto, no es de fácil acceso para, por ejemplo, laboratorios en países en desarrollo.

### Estrategias para el monitoreo de muestras ambientales bajo enfoque polifásico

La taxonomía polifásica no es más que el consenso de utilizar varios métodos para distinguir especies en base a su genética y fenética. Esta incluye la taxonomía numérica, la clasificación de los organismos basado en su similitud, morfología o en cualidades observables, además incluye el análisis de los genes codificantes del ARN ribosómico (ribotipado), la hibridación ADN-ADN, el análisis de ácidos grasos de la membrana externa y la pared celular, la filogenia o relación evolutiva, etc. (Madigan *et al.*, 2010). El análisis polifásico consiste en determinar a la vez diferentes indicadores como la dinámica, la diversidad la cuantificación y la identificación que describa a una misma muestra. Por tanto, no es más que la combinación de diferentes técnicas moleculares para monitorear una misma muestra.

### ¿Qué cebadores utilizar?

El importante papel de los genes *ARNr 16S* y *ARNr 18S* como marcadores filogenéticos, el uso de genes específicos como *mcrA* (para detectar metanogénas) o *GH5* (para detectar hongos celulolíticos podría considerarse para monitorear la respuesta de los microbiomas en ambientes como el suelo agrícola o biodigestores anaerobios. La Tabla 1 muestra varios cebadores diseñados para detectar especies de bacterias, archaeas y hongos en ecosistemas naturales de un suelo agrícola, o en un biodigestor anaerobio.

### ¿Qué estrategia a seguir para monitorear la población microbiana de biodigestores anaerobios?

Las técnicas basadas en las sondas moleculares más utilizadas en la digestión anaerobia, incluyen FISH y CARD-FISH, descritas anteriormente y representadas en la Tabla 2 (Sanz y Köchling, 2007; Amann y Fuchs, 2008). Estas técnicas permiten la visualización directa de microorganismos no cultivados, su cuantificación y el conocimiento de si están activos en su propio hábitat natural (Sanz y Köchling, 2007; Amann y Fuchs, 2008).

**Tabla 1.** Cebadores diseñados para amplificar genes conservados de Bacterias, Archaeas y hongos en muestras de suelo y biodigestores anaerobios  
**Table 1:** Primers designed to amplify conserved genes of bacteria, archaea, and fungi in soil samples and anaerobic biodigesters

Dominio	Grupo diana	Cebador "Forward"	Cebador "Reverse"	Referencia
Bacteria	Bacteria Total	EUB338(5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT)	EUB518 (5'-ATTACCGGGGCTGCTGG)	(Amann et al. 1990b; Lane 1991; Fierer et al. 2005)
		27f(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)	1492r(5'-TACGGYTACCTTGTTCACGACT)	(Lane 1991)
	Alpha-proteobacteria	EUB338	ALF685(5'-TCTACGRATTTACCCTAC)	(Lane 1991; Manz et al. 1996; Fierer et al. 2005)
	Beta-proteobacteria	EUB338	BET680 (5'-TCACTGCTACACGYG)	(Manz et al. 1996; Fierer et al. 2005)
	Gamma-proteobacteria	EUB338	GAM42a (5'-GCCTTCCCACATCGTTT)	(Manz et al. 1996)
	Bacterias reductoras de sulfato	EUB338	SRB385(5'-CGGCGTGCCTGCTCAGG)	(Amann et al. 1990a)
	Firmicutes	LGC353(5'-GCAGTAGGAATCTTCCG)	EUB518	(Fierer et al. 2005)
	Bacteroidetes	CFB319(5'-GTACTGAGACACGGACCA)	EUB518	(Fierer et al. 2005)
Archaea	mcrA	5'-GGTGTMGDD TTCACHCARTAYGC-3'	5'-6-FAM-TTC ATNGCRTAGTTHG-GRTAGTT-3'	(Barret et al. 2013)
	mcrA	5'GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYGCWA CAGC-3'	5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3'	(Luton et al. 2002)
	ARNr 16S	Ar109f(5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3')	Ar912r(5'-CTCCCCCGCCAAATTCCTTTA-3')	(Großkopf et al. 1998; Lueders and Friedrich 2000)
	ARNr 16S	A349f(5'-GYGCASCAGKCGMGAAW-3')	A915r (5'-GTGCTCCCCCGCCAAATTCCT-3')	(Takai y Horikoshi 2000)
Eucarya	Hongos total	5.8s(5'-CGCTGCGTTCATCG)	ITS1f(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG)	(Vilgalys y Hester 1990; Gardes and Bruns 1993; Fierer et al. 2005)
	Basidiomycota	ITS4b(CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG)	5.8sr (5'-TCGATGAAGAAGCAGCGG)	(Vilgalys and Hester 1990; Fierer et al. 2005)
	Hongos anaerobios	18 S RNAR AF-SSU (5'-CTAGGGATC GACGACGT TT)	18 S RNAR AF-SSU (5'-GGACCTYCCGAT CAAGGATG)	(Dollhofer et al. 2016)
	Hongos celulolíticos (Anaeromyces, Caecomyces, Piromyces)	AF-Endo(CGTATCCAACYACTTGG WSYGG)	AF-Endo (CCRKRTRTTAAGGCAAAR TTRTAGGA)	
		28 S RNAR AF-LSU (5'-GCTCAAAYT TGAAATCTT MAAG)	28 S RNAR AF-LSU (5'-CTTGTTAAM YRAAAAGTG CATT)	

**Tabla 2.** Sondas de ADN diseñadas para detectar bacterias, archaeas y hongos con la técnica de FISH.**Table 2:** DNA probes designed to detect bacteria, archaea and fungi with the FISH technique.

Dominio	Especificidad	Sonda	Secuencia (5'- 3')	Referencia	
	Bacteria Totales	EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	(Amann <i>et al.</i> 1990b)	
	Bacteroides	BAC1080	GCACTTAAGCCGACACCT	(Doré <i>et al.</i> 1998)	
Bacteria	Alpha-proteobacteria	ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	(Manz <i>et al.</i> 1996)	
	Beta-proteobacteria	BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT		
	Gamma-proteobacteria	GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT		
	Bacterias Sulfato reductoras	SRB385	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	(Amann <i>et al.</i> 1990a)	
	Desulfosarcina, Desulfococcus	DSS658	TCCACTTCCCTCTCCCAT	(Manz <i>et al.</i> 1998)	
	Desulfovibrio	DSV698	GTTCTCCAGATATCTACGG		
	bajo GC Gram-positiva	LGC354A	TGGAAGATTCCCTACTGC	(Meier <i>et al.</i> 1999)	
	Alto GC Gram-positiva	HGC69A	TATAGTTACCACCGCGT	(Roller <i>et al.</i> 1994)	
Archaea	Methanobacteriales (excepto Methanothermaceae)	MEB859	GGACTTAACAGCTTCCCT	(Boetius <i>et al.</i> 2000)	
	Methanosarcinaceae	MSSH859	TCGCTTACGGGCTTCCCT		
	Metanococcales	MC1109	GCAACATAGGGCACGGGTCT	(Raskin <i>et al.</i> 1994)	
	Metanomicrobiales (excepto Methanosarcinaceae)	MG1200	CGGATAATTCGGGGCATGCTG		
	Methanosarcinaceae (excepto Methanosaeta)	MS1414	CTCACCCATACCTCACTCGGG		
	Methanosaeta	MX825	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC		
		PF2	CTCTGGCTTACCCTATTC		(Scupham <i>et al.</i> 2006)
		Ap665	TTCGTTTAGTTATTATGAATC		
Eucarya	Hongos	U519	GAA TTA CCG CGG CTG CTG	(Li <i>et al.</i> 1997; Spear <i>et al.</i> 1999)	
		Doh299	TCT CTC CGG TAT CGT ACC C	(Greuter <i>et al.</i> 2016)	
		Oil845	TCG TAC GGT GCC GAT GGA		
		Eur1108	TTT AAG GGC CGA GGT CTC		

En otro sentido, las técnicas basadas en el análisis de fragmentos de ADN difieren en términos de la separación de los fragmentos de ADN amplificados y su posterior visualización (Petersson *et al.*, 2007). Entre ellos, el T-RFLP se ha utilizado para examinar la composición y dinámica de las comunidades microbianas, así como la abundancia relativa de las poblaciones (Schütte *et al.*, 2008). La clonación y secuenciación del gen *ARNr 16S* (biblioteca de clones) ha permitido caracterizar la comunidad microbiana anaeróbica durante la digestión anaeróbica de diferentes sustratos (Sanz y Köchling, 2007; Klocke *et al.*, 2007; Talbot *et al.*, 2008; Nettmann *et al.*, 2008). También permite identificar especies que prevalecen en ciertas condiciones operativas (Nettmann *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011).

La combinación de T-RFLP con la clonación y secuenciación del gen 16S rRNA también demostró una mejor comprensión de la respuesta interna de la comunidad en condiciones de estrés (Rademacher *et al.*, 2012). La amplificación de estos genes (16S rRNA) también se puede llevar a cabo mediante el método de q-PCR, para cuantificar grupos específicos de la comunidad, especialmente grupos metanógenos arqueales predominantes en ciertas condiciones operativas o puesta en marcha de sistemas de reactores (Jiménez *et al.*, 2017). Además, q-PCR se ha utilizado con éxito para determinar la dinámica de los metanógenos durante la digestión anaeróbica de diferentes sustratos a escala industrial, pero siempre como una técnica complementaria (Jiménez *et al.*, 2016).

**Tabla 3.** Ejemplos de técnicas moleculares o la combinación de estas, aplicadas al estudio de comunidades microbianas de diferentes ecosistemas para la obtención de resultados concretos.

**Table 3:** Examples of molecular techniques or the combination of these, applied to the study of microbial communities of different ecosystems to obtain concrete results.

Proceso	Sustrato	Técnica (s) Molecular (es)	Resultado	Referencia
Cultivo aerobio	Agua dulce y marina	Análisis filogenético, librería de clones del gen ARNr 16S, PCR-DGGE	Se demostró que los métodos independientes de cultivo son más exactos en la caracterización de una comunidad microbiana que los métodos dependientes de cultivo más tradicionales.	(Chang <i>et al.</i> , 2000)
Digestión anaerobia	Aguas residuales municipales	TGGE, PCR-RFLP	El análisis molecular permitió determinar como se afecta la comunidad metanógenas del suelo con la aplicación de lodos de depuradoras	(Sheppard <i>et al.</i> , 2005)
Biorreactores de membrana	Aguas residuales municipales e industriales	PCR-TGGE	Se encontraron Archaeas metanógenas formando gránulos en biorreactores anaerobios, pero no se logró determinar su papel en la función o estabilidad del proceso, por ello investigaciones futuras deben incluir FISH o RTNA-RT basado en TGGE.	(Gómez-Silván <i>et al.</i> , 2010)
Digestión anaerobia	Estiércol porcino	PCR, librería de clones de los genes ARNr 16S y mcrA	Se determinó que <i>Methanoculleus</i> spp. constituye un ente clave en la degradación de estiércol porcino. Sin embargo, se requiere investigar la variabilidad filogenética de los metanógenos activos, teniendo en cuenta las variaciones espaciales y temporales y las condiciones ambientales.	(Barret <i>et al.</i> , 2013)
Co-digestión anaerobia	Estiércol porcino, paja residual agrícola con adición de arcillas	T-RFLP, Q-PCR librería de clones de los genes 16S ARNr	Se determinó la dinámica de bacterias y archaeas, se identificaron especies no informadas y se determinó la interacción entre bacterias y archaeas en diferentes condiciones nutricionales y operacionales.	(Jiménez <i>et al.</i> , 2016)

**Tabla 4.** Grupos microbianos identificados en ecosistemas anaerobios bajo diferentes condiciones, caracterizados mediante la aplicación combinada de diferentes técnicas moleculares.**Table 4:** Microbial groups identified in anaerobic ecosystems under different conditions, characterized by the combined application of different molecular techniques.

Sustrato	Tipo de Reactor	Temperatura	Ordenes, Familias, Géneros y Especies identificadas predominantes	Técnica molecular	Referencia
Aguas residuales cerveceras	UASB (escala de laboratorio)	Condiciones mesofílicas	<i>Oleomonas</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Arcobacter</i> sp., <i>Methanosaeta concilii</i>	FISH, DGGE, clonaje de las secuencias del gen ARNr 16S	Fernández <i>et al.</i> , 2008
Aguas residuales domésticas	UASB	Condiciones mesofílicas	<i>Methanoculleus</i> , <i>Methanosphaera</i> , <i>Methanobacterium</i>	Librería de clones de los genes ARNr 16S y mcrA	Cardinali-Rezende <i>et al.</i> , 2009
Lodo de depuradoras	Digestor Anaerobio de doble fase (escala de laboratorio)	Acidogénico-termo-fílico (55°C) Metanogénico-mesofílico (35°C)	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanothermobacter</i> , <i>Methanobrevibacter</i>	PCR, TGGE	Lueneberg, 2009
Aguas residuales lácteas (suero de queso)	Batch	Condiciones mesofílicas	<i>Methanosarcina</i> , <i>Methanofollis</i>	PCR, DGGE	Lee <i>et al.</i> , 2010
Sedimentos del subsuelo	Bioreactor de flujo continuo	Condiciones psicofílicas	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanococcoides</i> , <i>Methanosarcina</i>	Análisis Filogenético basados en el gen ARNr 16S, FISH,	Imachi <i>et al.</i> , 2011
Estiércol porcino, pulpa de mandioca y mezcla de ambos sustratos	CSTR	Condiciones mesofílicas	<i>Bacteroidetes Clostridia Methanosaeta</i> sp., <i>Methanosaeta concilii</i> <i>Methanospirillum hungatei</i>	Librería de clones del gen ARNr 16S, PCR-DGGE	Panichnumsin <i>et al.</i> , 2012
Mezcla de lodo porcino y aguas residuales de un mercado de frutas y vegetales	Cultivo continuo de dos reactores CSTR en serie	Condiciones termofílicas	<i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Synergistes</i> , <i>Clostridium</i> sp., <i>Methanosarcina</i> sp.	PCR-DGGE, T-PCR	Merlino <i>et al.</i> , 2013
Estiércol porcino, paja residual agrícola con adición de arcillas	Batch	Condiciones mesofílicas y termofílicas	Orden <i>Methanosarcinales</i> (géneros <i>Metanosarcinas</i> y <i>Metanosaetas</i> ) a 35 °C, órdenes <i>Methanomicrobiales</i> y <i>Methanobacteriales</i> a 55°C	T-RFLP	Jiménez <i>et al.</i> , 2014b
Estiércol porcino y silage de cultivos energéticos	Fed-Batch	Condiciones mesofílicas	<i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Extracción y secuenciación de ADN, qPCR	Kovács <i>et al.</i> , 2015

En general, diferentes técnicas moleculares o la combinación de estas, han sido aplicadas al estudio de comunidades microbianas de diferentes ecosistemas para la obtención de resultados concretos como se muestra en la Tabla 3, aunque en esos trabajos también se remarca la necesaria combinación de técnicas para lograr la caracterización desde diferentes puntos de vista. Así, el uso combinado de estas técnicas, bajo enfoque polifásico ha permitido la identificación de grupos específicos en ecosistemas anaerobios (Tabla 4), lo que a su vez es un paso de avance en la búsqueda de la relación entre la dinámica microbiana y su respuesta a los cambios ambientales, nutricionales y operacionales en sistemas construidos.

### Consideraciones finales

La diversidad presente en un ecosistema es una herramienta útil para descifrar las sucesiones microbiológicas dadas, las rutas de degradación de sustratos y las condiciones de operación que interfieren en los procesos de las comunidades microbianas implicadas y por tanto en el funcionamiento del ecosistema. La utilización de técnicas moleculares y dentro de estas aquellas más avanzadas y sensibles está ayudando a entender cómo los microorganismos no cultivables o desconocidos, se adaptan e interactúan con factores bióticos y abióticos en el suelo y ambientes construidos. Lo realmente importante para elegir una técnica u otra depende de si es más práctico y económico emplear una de ellas o la combinación de varias, también se tiene en cuenta la utilización de aquellas que proyecten los resultados en el menor tiempo posible. Estas han sido progresivamente aplicadas también para caracterizar el desarrollo y la diversidad de una comunidad microbiana en reactores anaerobios, dado al auge de estas tecnologías bioenergéticas en el contexto actual del impulso de las fuentes renovables de energía. Así, este conocimiento resulta crucial para prevenir fallas en los sistemas implantados, para predecir la producción de biogás o metano bajo determinadas condiciones o sustratos, o incluso para ejecutar procesos de optimización del proceso.

En este trabajo se describieron las principales técnicas moleculares utilizadas para determinar la estructura, diversidad, dinámica, o la identificación microbiana en una muestra ambiental, ya sea de un ambiente natural (suelo agrícola) o de un ambiente construido (digestor anaerobio). Además, se proponen estrategias de combinación de métodos moleculares bajo enfoque

polifásico basado en experiencias exitosas de estudios previos y de los autores. Teniendo en consideración las comunidades de diversas bacterias, archaeas y hongos que habitan los ambientes citados, se proponen desde los cebadores a utilizar para amplificar genes conservados, las secuencias de sondas de ADN marcadas, hasta las combinaciones de técnicas utilizables para caracterizar una comunidad microbiana bajo enfoque polifásico, según su dinámica, diversidad, cuantificación e identificación. Las técnicas moleculares avanzadas y las recientes técnicas metagenómicas, constituyen herramientas poderosas para monitorear muestras ambientales, con un costo beneficio aceptable para países en vías de desarrollo como Cuba, donde los análisis costo beneficio pueden acercarse a 1 a medida que se logren un mayor número de resultados relevantes en cortos períodos de tiempo.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la formación en técnicas moleculares recibida en el Instituto Agrario de Borning (ATB) Potsdam, Alemania, y a la beca otorgada por el Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) a favor de Janet Jiménez (*Grant No: 91663901*). Además, se agradece al Instituto Politécnico de Kwantlen (KPU) y la beca ELAP otorgada a favor de Annerys Carabeo Pérez por el Gobierno de Canadá.

### LITERATURA CITADA

- Alberti, A., C. Belsler, S. Engelen, L. Bertrand, *et al.* (2014). Comparison of library preparation methods reveals their impact on interpretation of metatranscriptomic data. *BMC Genomics* 15 (912): 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-912>
- Amann, R. y B. M. Fuchs (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(5): 339-348. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1888>
- Andrade Ochoa, S., G. Erosa de la Vega, N. Moorillón y G. Virginia (2015). Amonio-oxidasas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoam.* 33(3): 233-245
- Baker, G.C., J.J. Smith y D.A. Cowan (2003). Review and reanalysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55(3): 541-555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Borneman, J., P.W. Skroch, K.M. O'Sullivan, J.A. Palus, *et al.* (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *App. Environ. Microbiol.* 62(6): 1935-1943
- Callaghan, T.M., S.M. Podmirseg, D. Hohlweck, J.E. Edwards *et al.* (2015). *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycKeys.* 9, 11-28. <http://dx.doi.org/10.3897/mycokeys.9.9032>
- Contreras Medina, L D. (2011). Diversidad genética bacteriana en los sedimentos de la reserva de investigación estuarina de la Bahía de Jobos, Puerto Rico. Tesis de Maestría, Universidad del Turabo, Puerto Rico

- Cortés, G. T. (2010). Diversidad taxonómica y funcional de la comunidad procariótica de la rizosfera de plantas xerófitas del altiplano central de México: Una aproximación metagenómica. Tesis de Doctorado, Universidad de Granada, España
- Dagar, S.S., S. Kumar, G.W. Griffith, J.E. Edwards *et al.* (2015). A new anaerobic fungus (*Oontomyces anksri* gen. nov., sp. nov.) from the digestive tract of the Indian camel (*Camelus dromedarius*). *Fungal Biology*. 119(8): 731–737. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.04.005>
- Dollhofer, V., T. M. Callaghan, S. Dorn-In, J. Bauer *et al.* (2016). Development of three specific PCR-based tools to determine quantity, cellulolytic transcriptional activity and phylogeny of anaerobic fungi. *J. Microbiol. Methods* 127, 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.017>
- Eid J., A. Fehr, J. Gray, K. Luong *et al.* (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323 (5910):133-8. <https://doi.org/10.1126/science.1162986>
- Escalante-Lozada A., G. Gosset-Lagarda, A. Martínez-Jiménez y F. Bolívar-Zapata (2004). Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia* 38(6): 583-592. <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=30238602>
- Floudas, D., M. Binder, R. Riley, K. Barry *et al.* (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336(6089): 1715-1719. <https://doi.org/10.1126/science.1221748>
- Griffith, G.W., S. Baker, K. Fliegerová, A. Liggenstoffer *et al.* (2010). Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. *IMA Fungus*. 1(2): 181–185. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2010.01.02.11>
- Gruninger, R.J., A.K. Puniya, T.M. Callaghan, J.E. Edwards *et al.* (2014). Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90(1): 1–17. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12383>
- Haitjema, C.H., K.V. Solomon, J.K. Henske, M.K. Theodorou *et al.* (2014). Anaerobic gut fungi: Advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnol. Bioeng.* 111(8): 1471–1482. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.25264>
- Handelsman, J., M. Liles, D. Mann, C. Riesenfeld *et al.* (2002). Cloning the metagenome: Culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world. *En Methods in Microbiology* (Vol. 33, pp: 241-255). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(02\)33014-9](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(02)33014-9)
- Hernández-León, R., I. Velázquez-Sepúlveda, M.C. Orozco-Mosqueda y G. Santoyo (2010). Metagenómica de suelos: Grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (Buenos Aires)* 79(2): 133-139
- Jiménez, J. (2015). Adición de paja de arroz y arcillas residuales a la digestión anaerobia de estiércol porcino. Efecto sobre la comunidad procariota productora de metano. Tesis de Doctorado. Universidad de La Habana, Cuba.
- Jiménez, J., E. L. Barrera, J. D. Vriese, N. Boon *et al.* (2017). Microbial community dynamics reflect reactor stability during the anaerobic digestion of a very high strength and sulfate-rich vinasse. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93(4): 975-984. <https://doi.org/10.1002/jctb.5449>
- Jiménez, J., G. Guerra, J. M. Morgan, A. Noyola *et al.* (2014). Caracterización microbiológica y molecular de la comunidad anaerobia durante la co-fermentación de residuos agropecuarios con adición de arcillas para la obtención de metano. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 45(1):10-17. <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=181230079006>
- Jiménez, J, S. Theuerl, I. Bergmann, M. Klocke *et al.* (2016). Prokaryote community dynamics in anaerobic co-digestion of swine manure, rice straw and industrial clay residuals. *Water Sci Technol* 74(4): 824-835. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.170>
- Klocke, M., P. Mähnert, K. Mundt, K. Souidi *et al.* (2007). Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Syst Appl Microbiol* 30(2): 139-151. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.03.007>
- Lazarevic, V., K. Whiteson, S. Huse, D. Hernandez *et al.* (2009). Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods* 79(3): 266-271. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.012>
- Liles, M. R., B. F. Manske, S. B. Bintrim, J. Handelsman *et al.* (2003). A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5): 2684-2691. <https://doi.org/10.1128/aem.69.5.2684-2691.2003>
- Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng y L. J. Forney (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol* 63(11): 4516-4522. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4516-4522.1997>
- Maccaferri, S., E. Biagi y P. Brigidi (2011). Metagenomics: key to human gut microbiota. *Digestive Diseases* 29(6): 525-30. <https://doi.org/10.1159/000332966>
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. Stahl y D. P. Clark (2010). *Brock: Biology of microorganisms*. Benjamin Cummings, San Francisco. 1089 pp.
- Nazaries, L., Y. Pan, L. Bodrossy, E. M. Baggs *et al.* (2013). Evidence of microbial regulation of biogeochemical cycles from a study on methane flux and land use change. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(13): 4031-4040. <https://doi.org/10.1128/AEM.00095-13>
- Nettmann, E., I. Bergmann, K. Mundt, B. Linke *et al.* (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *J Appl Microbiol* 105(6): 1835-1850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03949.x>
- Padmasiri, S.I., J. Zhang, M. Fitch, B. Norddahl *et al.* (2007). Methanogenic population dynamics and performance of anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water research* 41(1): 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.021>
- Pennisi, E. (2010). Semiconductors inspire new sequencing technologies. *Science* 327(5970): 1190-1190. <https://doi.org/10.1126/science.327.5970.1190>
- Pernthaler A. y R. Amann (2004). Simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(9): 5426-5433. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5426-5433.2004>
- Pernthaler, A., J. Pernthaler y R. Amann (2002). Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6): 3094-3101. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.3094-3101.2002>
- Petersson, A., M. H. Thomsen, H. Hauggaard-Nielsen y A.-B. Thomsen (2007). Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. *Biomass Bioenergy* 31(11): 812-819. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.06.001>
- Posadas, A. (2014). Biotecas Genómicas. Disponible en: <http://biblioteca-adn-transferencia-genes.blogspot.com/>. Último acceso: 24 de octubre de 2016

- Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam *et al.* (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285): 59-65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Rademacher, A., C. Nolte, M. Schönberg y M. Klocke (2012). Temperature increases from 55 to 75 °C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96(2): 565-576. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4348-x>
- Raja, H. A., A. N. Miller, C. J. Pearce y N. H. Oberlies (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J. Nat. Prod.* 80(3): 756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rodríguez, R. (2011). Empleo de la técnica hibridación in situ fluorescente para visualizar microorganismos. *Revista Salud Uis* 43 (3): 307-316. <http://repvie.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/2572>
- Sanz, J. L. y T. Kochling (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42 (2): 119-133. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.003>
- Schramm, A. y R. Amann (2001). Nucleic acid-based techniques for analyzing the diversity, structure, and dynamics of microbial communities in wastewater treatment. En H.-J. Rehm y G. Reed (Eds.), *Biotechnology Set* (pp. 85-108). Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527620999.ch51>
- Schütte, U.M.E., Z. Abdo, S. J. Bent, C. Shyu *et al.* (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80(3): 365-380. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1565-4>
- Sessitsch, A., A. Weilharter, M. H. Gerzabek, H. Kirchmann *et al.* (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4215-4224. Doi:10.1128/AEM.67.9.4215-4224.2001
- Singh BK, S. Munro, E. Reid, B. Ord *et al.* (2006) Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *Eur J Soil Sci* 57 (1):72–82. doi:10.1111/j. 1365-2389.2005.00781.x
- Smit, E., P. Leeflang, S. Sommans, J. van den Broek *et al.* (2001). Seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular tools. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5): 2284-2291. doi: 10.1128/AEM.67.5.2284-2291.2001
- Torsvik, V., y L. Øvreås. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiol* 5 (3):240-245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Torsvik, V., L. Øvreås y T. F. Thingstad. (2002). Prokaryotic diversity- Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296 (5570): 1064-1066. DOI: 10.1126/science.1071698
- Wagner, M., A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold *et al.* (2002). Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 81(1-4): 665-680. <https://doi.org/10.1023/A:1020586312170>
- Wang, P., H. Wang, Y. Qiu, L. Ren *et al.* (2018) Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production-A review. *Bioresour Technol* 248 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152>
- Wang, T., G. Cai, Y. Qiu, N. Fei *et al.* (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 6(2): 320-329. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.109>
- Wilderer, P., H. Bungartz, H. Lemmer, M. Wagner *et al.* (2002). Modern scientific methods and their potential in wastewater science and technology. *Water Research* 36(2): 370-393. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00220-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00220-2)
- Zwirgmaier, K. (2010). Detection of Prokaryotic Cells with Fluorescence In Situ Hybridization. En *Fluorescence in situ Hybridization (FISH)* (pp. 349-362). Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-789-1\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-789-1_27)

