

La metagenómica y bioinformática; Descubriendo los secretos de la ecología microbiana

Metagenomics and bioinformatics; Discovering the secrets of microbial ecology

CASTILLO-ORTEGA, Laura Sofía¹, MOLINA-VEGA, Aracely¹, OLIVARES-GARCÍA Erika Dulce¹, SEGOVIA-CRUZ, Jesús Alberto¹, AGUIRRE-VAN-WOBESER, Eneas²

¹*Universidad Politécnica de Pachuca, Carretera Pachuca -Ciudad Sahagún Km. 20, Ex-Hacienda de Santa Bárbara, 43830 Zempoala, Hidalgo, México*

²*Cátedras CONACyT/Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México*

ID 1^{er} Autor: *Laura Sofía, Castillo-Ortega* / **ORC ID:** 0000-0003-0640-9248, **Researcher ID Thomson:** V-5596-2018, **CVU CONACYT ID:** 561356

ID 1^{er} Coautor: *Aracely, Molina-Vega* / **ORC ID:** 0000-0002-3450-4253, **Researcher ID Thomson:** V-5544-2018, **CVU CONACYT ID:** 858301

ID 2^{do} Coautor: *Erika Dulce, Olivares-García* / **ORC ID:** 0000-0003-3379-556X, **Researcher ID Thomson:** V-5674-2018, **CVU CONACYT ID:** 858686

ID 3^{er} Coautor: *Jesús Alberto, Segovia-Cruz* / **ORC ID:** 0000-0002-4266-453X, **Researcher ID Thomson:** V-5734-2018, **CVU CONACYT ID:** 735424

ID 4^{to} Coautor: *Eneas, Aguirre-Van-Wobeser* / **ORC ID:** 0000-0002-5604-0525, **CVU CONACYT ID:** 38634

S. Castillo, A. Molina, E. Olivares, J. Segovia y E. Aguirre

lsco_01@micorreo.upp.edu.mx

F. Trejo, (Dr.). Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2018.

Abstract

With the progress of the new generation sequencing (NGS), nowadays it is possible to study the structure of the microbial communities and estimate the diversity of microorganisms present in the ecosystem, as well as to propose the possible interactions that take place in this community. In this review we briefly explain the importance of metagenomics application, for the description of microbiomes, highlighting its importance for the study of the microbial community structure and the estimation of the bacterial diversity in diverse ecological environments, such as: the intestine of parasitic insects of *Agave* spp, rhizospheric soil of milpas and parasitized wood decay for the *Trametes* fungi, as well as sediments and hot spring in Geysers of Tecozautla in the State of Hidalgo.

Bacterial Diversity, Insect, Milpas, Thermophiles, Wood in Decomposition

Introducción

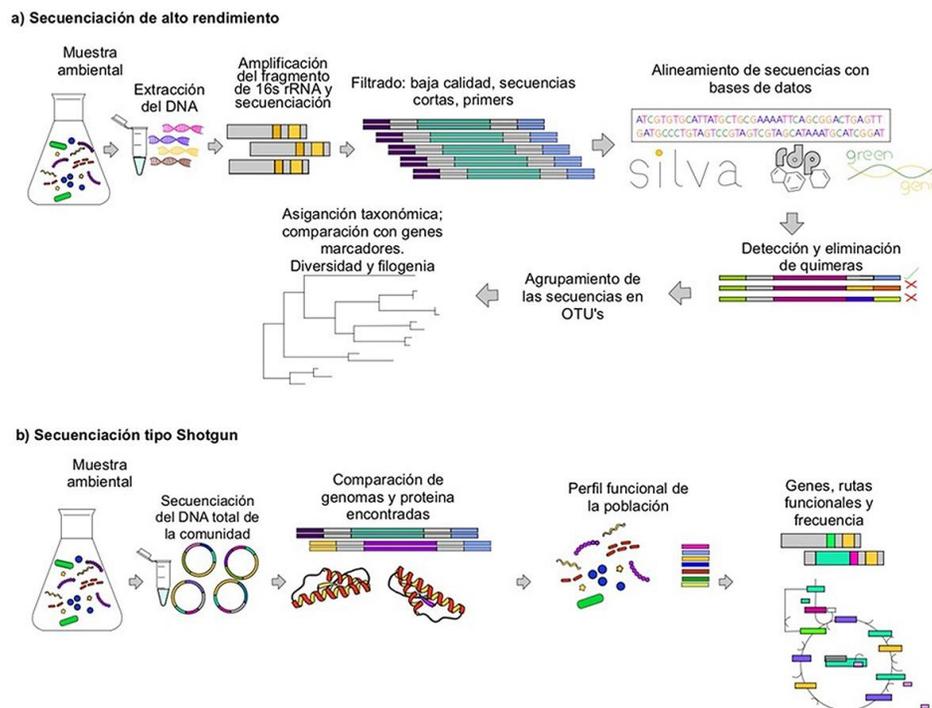
Uno de los grandes retos de la Biología ha sido estudiar la estructura poblacional y la diversidad de los microorganismos presentes en cualquier ambiente, esto con el fin de entender las relaciones biológicas y los procesos metabólicos que ahí se presentan. En un principio, la identificación de los microorganismos dependía del cultivo *in vitro* y su posterior identificación (microorganismos dependientes de cultivo). Con el auge de las técnicas de biología molecular y el desarrollo del método Sanger para la secuenciación de DNA (Sanger *et al.*, 1977), se logró primeramente la identificación de microorganismos utilizando genes marcadores y posteriormente genomas completos (Alcaraz *et al.*, 2008; Warren *et al.*, 2008).

Se estima que el porcentaje de microorganismos dependientes de cultivo estudiados radica entre el 1 y 3% del total de los microorganismos presentes en cualquier ambiente (Whitman *et al.*, 1998). El 97% restante de los microorganismos se consideran aún no cultivables, debido a que poseen exigencias nutricionales especiales difíciles de reproducir en el laboratorio, por lo tanto, su estudio depende únicamente del análisis de DNA (Handelsman, 2004). En años recientes, con la secuenciación masiva surge la metagenómica, definida como el análisis genómico del DNA colectivo de los microorganismos dentro de un ambiente, independientemente si pueden ser cultivados o no, enfocándose en la recopilación de información genética a través de las secuencias de DNA (Neethu *et al.*, 2010; Forbes *et al.*, 2017), dejando de lado al organismo en su forma individual, para centrarse en los genes de una comunidad y cómo su presencia influye en las actividades de los demás. Junto con la metagenómica, también se desarrollan métodos computacionales y bases de datos para la comprensión de la composición genética y de las actividades de las comunidades microbianas que, al ser tan complejas, no han sido completamente caracterizadas (Demain & Adrio, 2008).

Dentro de las técnicas de metagenómica se pueden describir dos vertientes. En la primera, se utiliza secuenciación de alto rendimiento que permite inferir la diversidad microbiana mediante análisis de marcadores genéticos, que nos sirven como indicadores de la presencia de microorganismos. Los más utilizados son: 16S rDNA para procariotas e ITS y/o 18S rDNA para hongos (Jansson & Hofmockel, 2018). Las secuencias obtenidas se analizan bioinformáticamente para conocer la diversidad en un ambiente (*alfa* diversidad), así como para hacer comparaciones entre ambientes o condiciones de muestreo diferentes (*beta* diversidad). La identificación taxonómica de las secuencias se logra mediante la comparación con bases de datos que contienen grandes números de secuencias del mismo marcador, muchas de las cuales se encuentran ya identificadas. Ejemplos de dichas bases de datos son SILVA, NCBI, *Greengenes* y *Ribosomal Database Project* (Quast *et al.*, 2013).

La segunda vertiente es la metagenómica funcional, donde se realiza la secuenciación masiva del DNA extraído de la muestra, con el fin de lograr la mayor cantidad de genomas completos de los microorganismos presentes, que posteriormente, con la ayuda de software y la comparación de las secuencias con bases de datos, se hace inferencia sobre las características metabólicas de los microorganismos, así como las funciones que realizan en el ambiente (Figura 3.1) (Hugenholtz, 2002; Rappe & Geovanni, 2003; Hernández-León *et al.*, 2010).

Figura 3.1 Flujo de trabajo para los análisis metagenómicos; a) secuenciación de alto rendimiento; b) secuenciación tipo shotgun



Con el impacto de la metagenómica, se han desarrollado técnicas novedosas para la obtención de miles de secuencias de fragmentos de DNA conocidas como secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés). Con la aplicación de estas técnicas es posible responder a preguntas fundamentales de ecología microbiana, que además en muchos casos involucran la relación ecológica microorganismo-huésped (Handelsman, 2004; Riesenfeld *et al.*, 2004, Taylor *et al.*, 2007; Brinkmann *et al.*, 2017; Choudhari *et al.*, 2017). Entonces, la metagenómica ofrece un camino para el estudio de comunidades microbianas enteras, que permite inferir en la composición filogenética, conocer la diversidad de especies y su capacidad metabólica (Neethu *et al.*, 2010; Choudhari *et al.*, 2017). A continuación, se describe el uso de la metagenómica para conocer la diversidad bacteriana en diferentes ecosistemas.

La metagenómica en el estudio del microbioma de los insectos

Los insectos representan uno de los grupos más diversos de organismos en el planeta, capaces de adaptarse a condiciones ambientales extremadamente diversas. En particular, los insectos herbívoros pueden habitar y alimentarse de una amplia gama de especies vegetales y así participar en una gran variedad de interacciones con microorganismos (Despres *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2013). Entre las principales relaciones insecto-microorganismo se pueden describir las relaciones benéficas como las nutricionales o de defensa, proporcionados por los simbioses a sus anfitriones. Además, al establecer relaciones mutualistas, los microorganismos facilitan al huésped la obtención de nutrientes como aminoácidos y vitaminas, secretan enzimas digestivas que ayudan a la degradación de los complejos dietéticos o la desintoxicación de metabolitos secundarios nocivos (Douglas, 2009; Berasategui *et al.*, 2016). En interacciones de defensa, los microorganismos protegen a su anfitrión contra patógenos, parásitos, parasitoides o depredadores, a menudo a través de la producción de compuestos antimicrobianos o toxinas (Flórez *et al.*, 2015; Berasategui *et al.*, 2016).

Shi *et al.*, en 2013 realizaron el análisis comparativo del metagenoma de los simbioses intestinales en saltamontes, gusanos cortadores y termitas, revelando diferencias entre las tres especies de insectos en la abundancia y la composición taxonómica de las poblaciones de bacterias simbioses presentes en el intestino. Sin embargo, a pesar de las diferencias estructurales de estas comunidades microbianas, comparten la característica de degradar y utilizar los diferentes tipos de alimentos o sustratos consumidos por sus huéspedes, principalmente los residuos vegetales (Shi *et al.*, 2013).

Las principales procariotas encontradas en el intestino de estos insectos están asociadas a grupos bacterianos de espiroquetas y *Fibrobacter* que a su vez se caracterizan por la producción de enzimas que hidrolizan celulosa y xilano (Warnecke *et al.*, 2007). Así mismo Russella *et al.*, (2009) encontró que algunos de los microorganismos simbióticos del intestino de las hormigas están relacionados con el consumo de plantas como alimento, de los cuales destaca la presencia de bacterias de tipo *Rhizobiales* (Russella *et al.*, 2009). Los lepidópteros constituyen el segundo orden de insectos más diverso. Algunos de ellos son considerados como plagas agrícolas, como *Acanthoscelides obtectus* (Gorgojo del frijol), *Acrobasis nuxvorella* Neunzig (Gusano barrenador de la nuez), *Aculops lycopersici* (Ácaro del bronceado del tomate), *Agrotis ipsilon* (Gusano cortador), *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Mosca negra de los cítricos), *Anastrepha ludens* (Mosca mexicana de la fruta), *Anthonomus eugenii* Cano (Picudo del chile).

De estos insectos, la mayoría de las investigaciones se centran en su efecto fitopatógeno, pero poco se sabe acerca de los géneros bacterianos asociados a diferentes partes anatómicas de ellos. Es un hecho, que las bacterias juegan un papel fundamental en la biología de ellos. Estudios indican que el hábitat, la planta sustrato y la edad del insecto huésped pueden tener un gran impacto en el microbioma intestinal (Paniagua *et al.*, 2018). El microbioma intestinal de los lepidópteros se ve afectado a lo largo del ciclo de vida del insecto, como es el caso de *Spodoptera littoralis*, en estadios tempranos en el intestino predominan géneros de bacterias como *Enterococcus*, *Pantoea* y *Citrobacter*, mientras que *Clostridia* aumenta su población en la última etapa de metamorfosis del insecto. Curiosamente, solo los *Enterococos* persistieron a través de la metamorfosis, algunas otras bacterias como *Proteobacterias* y *Firmicutes* se mantienen junto con el insecto durante toda su vida. Además, se hizo la comparación entre machos y hembras, resaltando que para el caso de las hembras adultas estas albergan altas proporciones de *Enterococcus*, *Klebsiella* y *Pantoea*, mientras que los machos albergan mayormente *Klebsiella* (Bosheng *et al.*, 2016).

En los últimos años el interés por los insectos como alimento humano se ha ampliado, debido a su alto valor nutricional (FAO, 2013). En el estado de Hidalgo se cuenta con una amplia variedad de insectos comestibles, incluyendo las plagas comestibles del *Agave*, el gusano rojo (*Comadia redtenbacheri*) y gusano blanco (*Acetrocneme hesperiaris*). Estas dos especies tienen características biológicas y gastronómicas diferentes, pero ambas son ampliamente apreciadas debido a su exquisito sabor. El consumo de estos gusanos es considerado una tradición ancestral (Ramos-Elorduy *et al.*, 2011). Por lo general, se consumen fritos o asados, condimentando una salsa picante y servido en una tortilla (FAO, 2013). El gusano blanco (Figura 3.2b) de *Agave* parasita las hojas carnosas grandes de *A. atrovirens* Karw., *A. salmiana*, *Otto ex Salm*, *A. mapisaga* Trel, *A. lehmanni*. Jacobi, *A. maximiliana*, Baker. *A. americana*. Debido al tamaño de las larvas, estas, se encuentran distribuidos en diferentes hojas del *Agave* (Ramos-Elorduy, 2006). El gusano rojo de *Agave* (Figura 3.2a), parásita el tallo de *A. atrovirens* K. ex SD, *A salmiana* O ex SD, *A mapisaga* T, creando una colonia de 40 a 60 gusanos ubicados en la unión con las hojas carnosas, por lo que el tallo y las hojas deben ser eliminados durante la recolección, causando la muerte del *Agave*. Las larvas se encuentran en la misma etapa y tienen aproximadamente el mismo tamaño, ya que provienen de la misma ovoposición. Estas larvas también se usan para darle una mejor presentación al mezcal, adicionando un gusano en la botella o como sal de gusano (Hernández *et al.*, 2005, Ramos-Elorduy, 2006).

Figura 3.2 Lepidópteros que habita *Agave* sp. **a)** *Comadia redtenbacheri*. **b)** *Acetrocneme hesperiaris*.



Debido a su importancia en la gastronomía mexicana, (Llenderal-Cázares *et al.*, 2017), estudios describen al gusano rojo como un barrenador de *Agaves* con un ciclo de vida largo. Los estudios del microbiota del gusano blanco se han limitado al aislamiento del microbiota cultivable externa e interna que compara diferentes modos de crianza (Hernández-Flores *et al.*, 2015).

De esta forma, se demostró una mayor diversidad de bacterias en las larvas obtenidas de productores que en las obtenidas directamente de plantas de maguey en la naturaleza. En el caso de gusano blanco, no se cuenta con estudios científicos que describan las comunidades bacterianas asociadas a este insecto. Considerando la importancia gastronómica y cultural, el creciente interés por el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales y tomando en cuenta la trascendencia de las bacterias simbiotas en insectos, es adecuado realizar un análisis metagenómico del microbioma intestinal de estos gusanos, utilizando técnicas independientes de cultivos para obtener resultados sobre la diversidad bacteriana intestinal.

La metagenómica en el análisis de diversidad bacteriana en milpas tradicionales

México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, su territorio alberga dos regiones biogeográficas (neártica y neotropical) y un elevado número de endemismos, por lo que posee gran variedad de ecosistemas y variación genética en las especies que los habitan (Plascencia *et al.*, 2011). Así mismo, México fue uno de los centros de desarrollo de la agricultura hace 10,000 años (Ranere *et al.*, 2009), de manera que muchas de las plantas domesticadas son originarias de este país (Plascencia *et al.*, 2011); como la calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber), el maíz (*Zea mays*) y varios cultivos arbóreos como jobo (*Spondias purpurea*), huaje (distintas especies del género *Leucaena*) y aguacate (*Persea* spp.), por mencionar algunos. Posiblemente, de los cultivos desarrollados en México, el maíz es el de mayor importancia, siendo la base de la alimentación de millones de personas a nivel mundial, particularmente en el continente americano (Ranere *et al.*, 2009).

El maíz fue domesticado a partir su ancestro silvestre *el teocintle*, hace aproximadamente 9,000 años, en la región suroeste del país desde donde se expandió hacia todo el continente (Matsuoka *et al.*, 2002; Ranere *et al.*, 2009). Las antiguas civilizaciones mayas, aztecas y olmecas de México, basaban su dieta en el maíz y era su cultivo más venerado. Hoy en día, el maíz forma parte en la vida, historia y tradición, por lo que representa parte de la identidad de los mexicanos (O'Leary, 2016).

Los antiguos agricultores influyeron en la evolución del maíz, dando lugar a una serie de sistemas agrícolas muy variados. Estas prácticas agrícolas tradicionales son resultado de procesos co-evolutivos entre sistemas sociales y ecológicos, donde las variedades locales están adaptadas a condiciones ecológicas, climáticas, y a las necesidades culturales de las comunidades que las realizan (Asturias, 2004).

La milpa es un sistema surgido en Mesoamérica (Lozada-Aranda *et al.*, 2017), que constituye un espacio dinámico de recursos genéticos, con interacción de la diversidad biológica y cultural. Se caracteriza por ser un cultivo donde coexisten diferentes tipos de maíz, y plantas como el frijol, calabaza, chile, tomate y otras plantas particulares de las diferentes zonas del país (Figura 3.3), que se usan según la temporada o tradiciones culturales específicas (Eguiarte *et al.*, 2017; Linares & Bye, 2011).

La diversidad de cultivos dentro de la milpa depende de cada región, no sólo por el clima, pendiente o tipo suelo, sino por el grupo humano asociado a ella que, de acuerdo con sus necesidades, conocimientos y tradiciones conforman milpas únicas (Lozada-Aranda *et al.*, 2017). Esta diversidad vegetal, con el resto de la comunidad biológica, incluyendo sus microorganismos asociados, forman el agroecosistema de milpa, el cual ha sido desarrollado y ha evolucionado durante miles de años gracias a las actividades de nuestros ancestros (Eguiarte *et al.*, 2017).

Figura 3.3 Milpa tradicional de maíz y frijol. Comunidad de Santo Domingo, Tepoztlán, Morelos, México



La interacción de una gran cantidad de especies convierte a la milpa en un ecosistema donde se aprovechan de manera complementaria sus diferentes recursos. En este ecosistema se favorecen interacciones ecológicas benéficas (control biológico de insectos, fertilidad del suelo y polinización), favoreciendo no solo a las especies que en ella conviven sino a las comunidades humanas que las manejan, dado que los productos que de ahí se obtienen, ya que forman parte de dieta diaria en algunas regiones del país siendo la base de su alimentación. La milpa alberga una increíble diversidad microbiana con miles de adaptaciones y genes novedosos que representan posibles aplicaciones médicas, agronómicas y biotecnológicas (Eguiarte *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta los valores de la milpa, es interesante investigar la microbiota asociada que puede ser la base de una agricultura libre de agroquímicos y sostenible. Sin embargo, la estructura y la diversidad de las comunidades bacterianas asociadas, ha sido poco estudiada (Rebollar *et al.*, 2017).

Los microorganismos del suelo tienen una participación importante en los procesos ecosistémicos como formación de suelo, crecimiento de las plantas, y los ciclos biogeoquímicos, y comprenden una gran parte de la diversidad genética en la Tierra (Van Der Heijden *et al.*, 2008). El microbioma que participa en la fisiología y desarrollo de las plantas se encuentra particularmente en la rizosfera. Entre estos microorganismos benéficos para las plantas podemos encontrar a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), fijadoras del nitrógeno, solubilizadoras de fosfato, y cepas con actividad de biocontrol de plagas, por mencionar algunas (Hernández *et al.*, 2003).

Los estudios de secuenciación de alto rendimiento permiten conocer la composición y diversidad microbiana del suelo en una variedad de hábitats sin la necesidad de cultivo (Jansson y Hofmockel, 2018). En este sentido, Vogel *et al.*, en el 2009 proponen que el suelo sea la próxima iniciativa global de secuenciación metagenómica, ya que representaría un gran valor económico y ambiental, debido a la diversidad de vías y genes que podrían participar en procesos de biodegradación de contaminantes, síntesis de biocombustibles y producción de nuevos fármacos, además de proporcionar información sobre la ecología de los microorganismos que son benéficos o perjudiciales en la producción de cultivos. De esta manera, actualmente la metagenómica del suelo se ha planteado como una herramienta para la agricultura sostenible (Goel *et al.*, 2017).

Se han realizado varias investigaciones en el área de la microbiología asociada a la agricultura. En los últimos años se determinó en cultivos de maíz, la presencia de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Lysobacter* formando parte de la comunidad microbiana de la rizosfera del cultivo, constituyendo *Pseudomonas* el género dominante. Se ha determinado que distintas cepas de *Pseudomonas*, *Lysobacter* y *Streptomyces* favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Hernández *et al.*, 2003; García-Salamanca *et al.*, 2013).

Otros estudios en leguminosas han determinado que algunas bacterias del orden *Rhizobiales*, así como algunos miembros de *Betaproteobacteria* (Burkholderiales) forman nódulos en las raíces, dentro de las cuales convierten el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_3) disponible, a cambio de compuestos de carbono liberados por la planta. Algunas plantas, como Alder (*Alnus* spp.) y Casuarina (*Casuarina* spp.), forman nódulos en asociación con actinobacterias fijadoras de N_2 del género *Frankia*, también varias bacterias de vida libre y endófitas (p. Ej., *Azotobacteraceae*, *Cyanobacterias*), pueden fijar cantidades significativas de N_2 (Tkacz y Poole, 2015).

En otros estudios en calabaza (*Cucurbita* sp.), se han determinado microbiomas dominantes de *Enterobacteriaceae*, donde *Lysobacter*, *Paenibacillus* y *Lactococcus* son importantes para el mantenimiento de la salud de la planta (Adam *et al.*, 2018). En estudios de cultivos como el maíz se ha encontrado, que la diversidad microbiana está asociada con el tipo de suelo y las prácticas de cultivo (Peiffer *et al.*, 2013). Los estudios de diversidad bacteriana para suelos agrícolas se han centrado principalmente en la caracterización de comunidades microbianas evaluadas en un solo punto de tiempo y principalmente en monocultivos. Sin embargo, los policultivos, como la milpa son muy importantes debido a su papel central en el desarrollo de la agricultura sostenible (Rebollar *et al.*, 2017).

Con lo antes mencionado, se destaca que la milpa es un sistema agrícola ancestral, en donde el cultivo del maíz se complementa con el de otras especies de valor alimenticio y/o medicinal. Esta diversidad vegetal, a su vez atrae una alta diversidad de otros organismos, por lo que las milpas son consideradas agroecosistemas, en los cuales las plantas influyen el suelo por afectar las concentraciones de nutrientes, exudar compuestos orgánicos, promover el crecimiento de microorganismos benéficos e inhibir el crecimiento de otros potencialmente dañinos.

Las interacciones entre los componentes de la milpa, incluyendo el suelo, la vegetación y las bacterias, podrían tener beneficios para la productividad agrícola de estos sistemas, por lo que es esencial entender la dinámica de las poblaciones microbianas del suelo de la milpa a lo largo del ciclo de producción agrícola. Para ello, se hace uso de herramientas bioinformáticas que permitan analizar el DNA metagenómico de muestras de rizosfera en milpas, para examinar los cambios en la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas a lo largo de ciclos agrícolas, mediante la secuenciación de alto rendimiento de los amplicones del gen 16S rDNA.

La metagenómica para el estudio de la biodiversidad termófila del géiser de Tecozautla e identificación de microorganismos con posible aplicación biotecnológica

Los microorganismos extremófilos son organismos adaptados para crecer bajo condiciones que, desde una perspectiva humana, son hostiles y donde otros organismos no sobreviven. La resistencia de los organismos a tales ambientes se debe principalmente a sus características estructurales y fisiológicas que les permiten resistir a estas condiciones extremadamente selectivas.

Estas propiedades se deben a biomoléculas específicas incluyendo lípidos, enzimas, osmolitos, polímeros y aminoácidos (de Champdoré *et al.*, 2007; Aerts *et al.*, 2014). Se consideran ambientes extremos: manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas termales abisales, suelos y mares polares fríos, así como glaciares alpinos, lagos salinos y ambientes con valores de pH extremos, sea ácido (zonas de solfataras, minas) o alcalino (fuentes carbónicas, tierras y lagos alcalinos); y con relativa frecuencia, en zonas que combinan dos o más factores extremos, como en los manantiales ácidos y calientes de zonas volcánicas, o baja temperatura y alta presión, en los fondos marinos.

Dependiendo del ambiente los organismos se clasifican como: acidófilos, alcalófilos, psicrófilos, halófilos, barófilos, xerófilos, osmófilos, oligotróficos y los termófilos, que se caracterizan por tener un crecimiento óptimo a temperaturas de entre 45 y 80 °C. Además de éstos se conocen a los hipertermófilos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a ≥ 80 °C con capacidad de crecer a ≥ 90 °C. Por último, se denominan extremotolerantes y extremoresistentes, a aquellos microorganismos que pueden tolerar valores extremos de uno o más parámetros fisicoquímicos, aunque crecen de manera óptima en condiciones "normales", por ejemplo, los metalotolerantes, radioresistentes y toxicotolerantes (Canganella y Wiegel, 2014; Rampelotto, 2016).

La importancia de los microorganismos extremófilos destaca en las diversas aplicaciones que podrían tener sus enzimas, las cuales se utilizarían en el desarrollo de bioprocesos industriales, enfocándose en la industria del papel, curtido de pieles, detergentes, textiles, productos farmacéuticos, químicos, alimentos, bebidas, biocombustibles, alimentación animal y cuidado personal, entre otros (Adrio y Demain, 2014).

Desde el descubrimiento pionero de Thomas Brock de microorganismos en las aguas termales del Parque Nacional de Yellowstone, Wyoming en la década de 1960, se han descubierto organismos termófilos, hipertermófilos y arqueas. Estas a su vez, se encontraron en formas planctónicas, como células dispersas en los fluidos geotérmicos, biofilms y biomats en las superficies y dentro de los depósitos minerales (Brock, 1967; Jahnke *et al.*, 2001).

Una de las aplicaciones más importantes de los organismos extremófilos ha sido la *Taq* polimerasa, aislada de *Thermus aquaticus*, que tiene su principal aplicación en la reacción en cadena de la polimerasa mejor conocida como PCR. Esta reacción permite la amplificación de fragmentos de DNA en pocas horas. Actualmente, esta enzima se obtiene por expresión heteróloga en la bacteria *Escherichia coli* (Lawyer *et al.*, 1993).

La diversidad microbiana y las técnicas moleculares modernas, como la metagenómica, ha permitido caracterizar la microbiota de ambientes termófilos. Por ejemplo, en estudios recientes en la fuente termal de Sungai Klah en Malasia (50-110 °C) se pudieron encontrar predominantemente los filos de *Aquificae*, *Thermotogae*, *Ignavibacteriae*, *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Nitrospirae*, *Spirochaetes*, *Thermodesulfobacteria*, *Acidobacteria*, *Euryarchaeota*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* y *Chloroflexi*.

Al hacer el análisis de la diversidad microbiana de la fuente termal de Siloam Sudáfrica (63°C) se encontró una similitud en filas, incluyendo *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* y *Chloroflexi*, con la presencia adicional de *Firmicutes*. En el caso de la identificación de genes que codifican para enzimas novedosas mediante NGS se han identificado enzimas tales como: lipasas, xilanasas, celulasas, endoxilanasas, β -galactosidasas, β -xilosidasas/ α -arabinofuranosidasas, β -pectinasas, α -fucosidasas, fitasas, nitrilasas y polimerasas, entre muchas otras que toleran o soportan condiciones extremas (Tekere *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2015; De Castro *et al.*, 2016).

Hoy en día existe la necesidad de nuevas enzimas, mejoradas o más versátiles para desarrollar procesos de producción más novedosos, sostenibles y económicamente competitivos. Las investigaciones que se han llevado a cabo en ambientes termófilos nos demuestran que están presentes los tres reinos de la vida y aunque se han hecho avances importantes, aún se siguen descubriendo nuevas especies que contribuyen a dilucidar la gran diversidad microbiana del planeta; (De Castro *et al.*, 2016).

Tomando en cuenta todo lo anterior, es importante realizar el análisis metagenómico de diversos ambientes extremos. En el estado de Hidalgo, México, existe un géiser en el municipio de Tecozautla (Figura 3.4) donde brota agua azufrada y alcalina a 95 °C. Por lo que estudios metagenómicos basados en la secuenciación 16S rDNA son necesarios para analizar, comprender y describir la diversidad y estructura poblacional, así como las vías metabólicas utilizadas en estos ambientes, lo que biotecnológicamente nos permitirá posiblemente descubrir nuevos productos con aplicación industrial (Lewin *et al.*, 2013).

Figura 3.4 Géiser de Tecozautla, Hgo



Metagenómica en el estudio de las comunidades bacterianas asociadas a la degradación de madera en descomposición

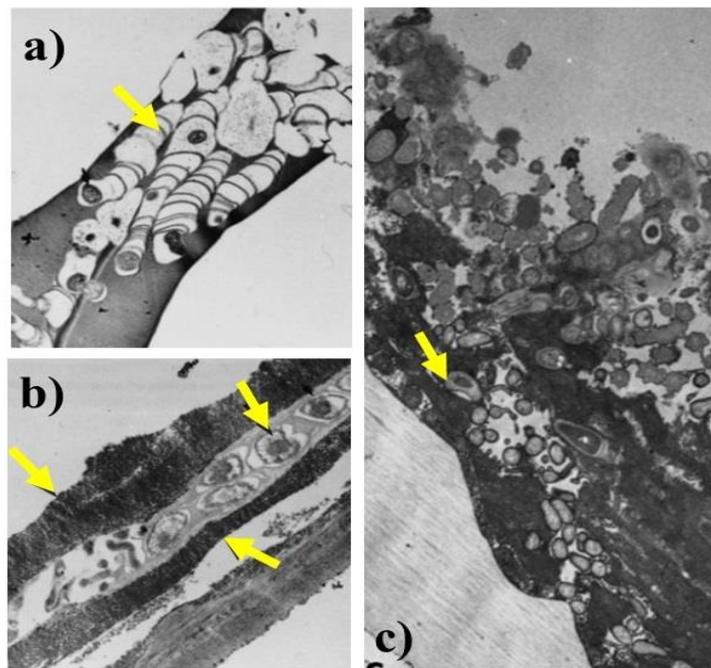
El 30 % de la superficie terrestre se encuentra cubierta por bosques (Keenan *et al.*, 2015), donde se albergan alrededor de 73 billones de toneladas de carbono, formando parte de la madera muerta (Pan *et al.*, 2011). El carbono se reincorpora a su ciclo biogeoquímico, gracias a la acción de organismos saprofiticos que se encargan de degradar los polímeros de lignina, celulosa y hemicelulosa (Clausen, 1996; Arantes *et al.*, 2011; Floudas *et al.*, 2012; Hervé *et al.*, 2013). La mayoría de las investigaciones sobre degradación de madera se centran en los hongos, clasificados de acuerdo con el tipo de pudrición que provocan, las cuales se han caracterizado como podredumbre blanca, blanda o marrón (Hattaka, 2001; Morgenstern *et al.*, 2008). Los hongos son considerados como los degradadores primarios de los componentes de la madera, gracias a la producción de enzimas que actúan sobre los polímeros de carbono (Arantes *et al.*, 2011; Hervé *et al.*, 2013). Sin embargo, durante los procesos de degradación, estos necesitan de la presencia de bacterias, con las cuales establecen relaciones simbióticas y mutualistas que le permitan desarrollarse, colonizar y degradar la madera en descomposición.

Dentro de las interacciones bacteria-hongo, se encuentra el cleptoparasitismo, fenómeno por el cual las bacterias remueven los compuestos aromáticos generados por la degradación fúngica de la madera (Seigle-Murandi *et al.*, 2000). Así mismo, las bacterias son capaces de producir vitaminas y realizar la fijación de nitrógeno para que el hongo pueda asimilarlo fácilmente (Hoppe *et al.*, 2014; Weißhaupt *et al.*, 2011). Algunas bacterias también son capaces de realizar micofagia, ya que se alimentan de los hongos, sin llegar a matarlo, es decir, se encuentran viviendo parásitamente de ellos (Leveau y Preston, 2008; Johnston *et al.*, 2016).

Trabajos de investigación han demostraron que, en ausencia de bacterias, los hongos desarrollan menor cantidad de biomasa, comparado con el crecimiento acompañado de bacterias (Blanchette y Shaw, 1978). De la misma manera, se ha evidenciado que algunas bacterias necesitan de los hongos para sobrevivir. *Burkholderia cepacia* es una bacteria que presenta mayor crecimiento cuando el micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* está presente (Yara *et al.*, 2006). Aunque se ha comprobado la importancia de las bacterias durante el proceso de degradación de la madera, el número de investigaciones enfocadas en estos microorganismos es menor en comparación con las investigaciones que se han realizado en hongos. Las bacterias son los primeros microorganismos en comenzar el proceso de degradación, acondicionan el medio para que los hongos lleguen y se establezcan (Greaves, 1971; Van der Wal *et al.*, 2007). El medio por el cual las bacterias colonizan a la madera no es de todo claro, por lo que se considera que éstas pueden proceder del aire, del agua, del suelo o de la madera misma (Green y Bohannan, 2006; Van der Wal *et al.*, 2007; Folman *et al.*, 2008; Hervé *et al.*, 2013; Johnston *et al.*, 2016), o son arrastradas por organismos que colonizan la madera como hifas de hongos o por los insectos (Greaves, 1971; Blanchette y Shaw, 1978).

Las bacterias también son capaces de degradar los polímeros que forman la madera. Se han caracterizado bacterias con la capacidad de descomposición de la lignina y celulosa (Bugg *et al.*, 2011; Brown y Chang, 2014; Johnston *et al.*, 2016; Lladó *et al.*, 2016). Las lesiones causadas a la madera por las bacterias se pueden observar como túneles, cavitaciones o como la erosión en la superficie de los troncos (Figura 3.5) (Kim y Singh, 2010). Las bacterias tienen menor capacidad para degradar la madera en descomposición en comparación con la actividad degradadora de los hongos que crecen en forma micelial sobre la madera (Greaves, 1971; Clausen, 1996). No obstante, se considera que las bacterias poseen medios no caracterizados de metabolizar los polímeros de madera, pues de manera particular, en las bacterias no se han encontrado enzimas habituales para la degradación de celulosa (López-Mondéjar *et al.*, 2016; Johnston *et al.*, 2016). Otra característica importante de algunas cepas bacterianas es la degradación de pectina, permitiendo el acceso a los polímeros de celulosa (Clausen, 1996; Lynd *et al.*, 2002).

Figura 3.5 Lesiones de la madera causada por bacterias a) túneles; b) cavitaciones; c) erosión



Fuente: (Modificado Kim y Singh, 2010)

La presencia de los hongos modifica notablemente las poblaciones bacterianas. Por ejemplo, en cultivo *in vitro* de madera inoculados con el hongo de la podredumbre blanca *Hypholoma fasciculare*, se observó que la presencia del hongo puede alterar la abundancia y la composición de las comunidades bacterianas (de Boer *et al.*, 2010; Folman *et al.*, 2008; Valásková *et al.*, 2009). Otros factores que afectan la estructura de la diversidad bacteriana es el tipo de árbol, el contenido de agua, el pH y la relación C-N (Folman *et al.*, 2008, Hoppe *et al.*, 2014). En un principio, el estudio de las relaciones bacteria-hongo consistían en la aplicación de técnicas de microbiología tradicional.

Actualmente, con el uso de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), se ha logrado un estudio más amplio de los *phylas* de bacterias presentes en la madera en descomposición. Estudios de metagenómica realizados en arboles de *Fagus sylvatica*, *Picea abies*, *Betula sp.*, *Pinus sylvestris*, *Keteleeria ecelynniana* a diferentes estados de pudrición se encontraron principalmente los clases de *Alpha*, *Beta*, *gamma* y *Delta proteobacteria*, así como en los *phyla Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Zhang *et al.*, 2008; Folman *et al.*, 2008; Hervé *et al.*, 2013; Hoppe *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Hoppe *et al.*, 2015; Kielak *et al.*, 2016; Rintha-Kanto *et al.*, 2016; Johnston *et al.*, 2016). Gracias a estas técnicas hoy en día se conocen un gran número de bacterias tanto cultivables y no cultivables que habitan la madera, lo que permite además hacer inferencias acerca de los procesos metabólicos que se llevan a cabo en el proceso de la podredumbre de la madera en descomposición. Sin embargo, aún falta enfocar las investigaciones en dilucidar las rutas metabólicas que involucren la relación hongo-bacteria para degradación de la madera en descomposición.

Para ello, se pueden emplear herramientas *omicas* como la transcriptómica, proteómica o metabolómica, sin mencionar que aún quedan muchos hongos de la podredumbre por estudiar (Johnston *et al.*, 2016). Por ejemplo, en México los bosques templados son el segundo bioma más extenso del país, particularmente en la madera muerta crecen hongos del género *Trametes*, organismo saprófito característico de especies de pudrición blanca, presentes prácticamente en cualquier tipo de ecosistema, el más representativo de este género es *Trametes versicolor*, el cual presenta en su cuerpo fructífero una variada gama de colores (Floudas *et al.*, 2012). Hasta el momento no hay trabajos que apliquen técnicas NGS para describir la relación *Trametes* y las comunidades microbianas asociadas en el proceso de degradación de la madera muerta (Figura 3.6), esta es una potencial razón para generar estudios de metagenómica que nos permita inferir la diversidad y estructura microbiana asociada a este hongo además de analizar comparativamente cambios en su microbioma en diferentes zonas geográficas de la república mexicana.

Figura 3.6 *Trametes* sp. creciendo en madera muerta



Conclusiones

La diversidad de las comunidades microbianas está estrechamente relacionada con el ambiente en el que se encuentran, hasta el momento las investigaciones realizadas en cada uno de los ecosistemas mencionados en este artículo no han permitido la caracterización de la estructura y funcional del microbiota que en ellos habitan. La aplicación de las técnicas de microbiología convencional hoy día no es suficiente para entender lo que ocurre en cada ambiente, es por ello que al utilizar la metagenómica para conocer la diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas se amplía el conocimiento de la estructura, riqueza y funcionalidad de cada ecosistema.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento económico a los becarios: Castillo Ortega Laura Sofía (No. Beca: 486519); Molina Vega Aracely (No. Beca: 489854) Olivares García Erika Dulce (No. Beca:489906); Segovia Cruz Jesús Alberto (No. Beca: 487838)

Referencias

- Adam, E., Bernhart, M., Müller, H., Winkler, J., y Berg G. (2018). The *Cucurbita pepo* seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant and Soil*, 422(1-2), 35-49.
- Adrio, J., y Demain, A. (2014). Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- Aerts, J., Röling, W., Elsaesser, A., y Ehrenfreund, P. (2014). Biota and Biomolecules in Extreme Environments on Earth: Implications for Life Detection on Mars. *Life (Basel)*, 4(4), 535-565.
- Alcaraz, L., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., y Herrera-Estrella, L. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5803–5808.
- Arantes, V., Milagres, A., Filley, R., y Goodell, B. (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of non enzymatic Fenton-based reactions. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 38(4), 541-55.
- Asturias, M. (2004). Maíz de alimento sagrado a negocio del hambre. Historia e importancia del maíz. (1° ed.) Quito: Red por una América latina libre de transgénicos.
- Bases de datos:
- Silva, Link: <https://www.arb-silva.de/>
 - GreenGene, Link: <https://greengenes.lbl.gov/>
- Berasategui, A., Shukla, S., Salem, H., y Kaltenpoth, M. (2016). Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1567-77.
- Blanchette, R., y Shaw C. (1978). Associations among bacteria, yeasts and *basidiomycetes* during wood decay. *Phytopathology*, 68(4), 631-637.
- Bosheng Chen, Beng-Soon Teh, Chao Sun, Sirui Hu, Xingmeng Lu, Wilhelm Boland, Yongqi Shao. (2016). Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports* 6, Article number: 29505
- Brinkmann, C., Marker, A., y Kurtböke, D. (2017). An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery. *Diversity*, 9(4), 1-31.
- Brock, T. (1967). Life at high temperatures. *Science*, 230, 132-138.
- Brown, M., y Chang M. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19, 1–7.
- Bugg, T., Ahmad, M., Hardiman E., y Singh R. (2011). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation 22(3), 394–400.
- Canganella, F., y Wiegel, J. (2014). Anaerobic Thermophiles. *Life (Basel)*, 4(1), 77-104.
- Chan, C., Chan, K., Tay, Y., Chua, Y., y Goh, K. (2015). Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 5(6), 177.
- Choudhari, S., y Grigoriev, A. (2017). Phylogenetic heatmaps highlight composition biases in sequenced reads. *Microorganisms*, 5(1), 4.
- Clausen, C. (1996) Bacterial associations with decayingwood: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37(1-2), 101–7.

- de Boer, W., Folman, L., Gunnewiek, P., Svensson, T., Bastviken, D., Öberg, G., del Rio, J. y Boddy, L. (2010). Mechanism of antibacterial activity of the white-rot fungus *Hypholoma fasciculare* colonizing wood. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(5), 380–8.
- de Champdoré, M., Staiano, M., Rossi, M. y D'Auria, S. (2007). Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *Journal of the Royal Society Interface*, 4(13), 183–191.
- De Castro, M., Rodríguez-Belmonte, E. y González-Siso, M. (2016). Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozymes. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1521.
- Demain, A., y Adrio, J. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*. 38(1), 41-55.
- Despres, L., David, J., y Gallet, C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(6), 298–307.
- Douglas, A. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23(1), 38–47.
- Eguiarte, L., Equihua, Z. y Espinoza A. (2017). La ciencia de la milpa: La milpa es un espejo de la diversidad biológica y cultural de México. *Oikos*, 17, 7-10.
- FAO. (2013). Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security. FAO, Rome, Italy. 12.
- Flórez, L., Biederman, P., Engl, T., y Kaltefleiter, M. (2015). Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Natural Product Reports*, 32 (7), 904-936.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R., Henrissat, B., Martínez, A., Otilar, R., Spatafora, J., Yadav, J., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P., de Vries, R., Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Go´recki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Ku´es, U., Kumar, T., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nolan, M., Ohm, R., Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Dueñas, F., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J., St. John, F., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro, A., Eastwood, D., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, IV., Hibbett, D., (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, 29(336), 1715–1719.
- Folman, L., Gunnewiek, P., Boddy, L., y de Boer, W. (2008). Impact of white-rot fungi on numbers and community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(2), 181–191.
- Forbes, J. D., Knox, N. C., Ronholm, J., Pagotto, F., y Reimer, A. (2017). Metagenomics: The Next Culture-Independent Game Changer. *Frontiers in Microbiology*, 8(4), 1069.
- García-Salamanca, A., Molina-Henares, M., van Dillewijn, P., Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., Duque, E. y Ramos, J.L. (2013). Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microbial Biotechnology*, 6 (1), 36-44.
- Goel, R., Suyal, D., Narayan, D., y Soni, R. (2017). Soil metagenomics: A tool for sustainable agriculture. *Mining of Microbial Wealth and MetaGenomics*, 217-225.
- Greaves, H. (1971). The bacterial factor in wood decay. *Wood Science and Technology*, 5(1), 6–16.
- Green, J., y Bohannan, B. (2006). Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(9), 501-507.

- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669–685.
- Hattaka, A. (2001). Biodegradation of lignin. In: Hofrichter, M. and Steinbuchel, A., Eds., *Biopolymers*, Vol. 1: Lignin, Humic Substances and Coal, Wiley-VCH, Weinheim, 129-180.
- Hernández, A., Caballero A., Mabel P., Ramírez R y Heydrich M. (2003). Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays L.*) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(5), 45-55.
- Hernández, L., Llanderal, C., Castillo, M., Valdez, C., y Nieto, H. (2005). Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (HAMM) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia*, 39(5), 539-544.
- Hernández-Flores, Llanderal-Cázares, Guzmán-Franco, y Aranda-Ocampo. (2015). Bacterias presentes en larvas de *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae). *Journal of Medical Entomology*, 52(5), 1150-1158.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M., y Santoyo, G. (2010). Soil Metagenomics: *new challenges and biotechnological opportunities*. *FYTON*. 79,133-139.
- Hervé, V., Le Roux, X., Uroz, S., Gelhaye, E., y Frey-Klett, P. (2013). Diversity and structure of bacterial communities associated with *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2238–52.
- Hoppe, B., Kahl, T., Karasch, P., Wubet, T., Bauhus, J., Buscot, F. y Krüger, D. (2014). Network analysis reveals ecological links between N-Fixing bacteria and wood-decaying fungi. *PLoS One*, 9(2), e91389.
- Hoppe, B., Krüger, K., Kahl, T., Arnstadt, T., Buscot, F., Bauhus, J. y Wubet, T. (2015). A pyrosequencing insight into sprawling bacterial diversity and community dynamics in decaying deadwood logs of *Fagus sylvatica* and *Picea abies*. *Scientific Reports*, 5(1), 9456.
- Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*, 3(2).
- Jahnke, L., Eder, W., Huber, R., Hope, J., Hinrichs, K., Hayes, J., Des Marais, J., Cady, S., y Summons, E. (2001). Signature lipids and stable carbon isotope analyses of *Octopus spring* hyperthermophilic communities compared with those of aquificales representatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5179-5189.
- Jansson, J., y Hofmockel, K., (2018). The soil microbiome from metagenomics to metaphenomics. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 162-168.
- Johnston, S., Boddy, L., y Weightman, A. (2016). Bacteria in decomposing wood and their interactions with wood-decay fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), 179.
- Keenan, R., Reams, G., Achard, F., de Freitas, J., Grainger, A., y Lindquist, E. (2015). Dynamics of global forest area: results from the FAO Global Forest Resources Assessment. *Forest Ecology and Management*, 352(52), 9–20.
- Kielak, A., Scheublin, T., Mendes, L., van Veen, J., y Kuramae, E. (2016). Bacterial community succession in pine-wood decomposition. *Frontiers in Microbiology*, 7(1), 231.
- Kim Y. S. y Singh A. P., Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: a review, *IAWA Journal*. 21(2), 135–155.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., 1 Saiki, S.R., Chang, S., Landre, P.A., Abrarnson, R.D., y Gelfand, D. H. (1993). High-level Expression, Purification, and Enzymatic Characterization of Full-length *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and a Truncated Form Deficient in 5' to 3' Exonuclease Activity. *PCR Methods and Applications*. 2(4), 275-287.

- Leveau, J., y Preston, G. (2008). Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial-fungal interaction. *New Phytol*, 177, 59–76.
- Lewin, A., Wentzel, A., y Valla, S. (2013). Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. *Current Opinion in Biotechnoly*. 24,516–525.
- Linares, E. y Bye, R. (2011). ¡La milpa no sólo es maíz! En *Haciendo milpa: la protección de las semillas y la agricultura campesina*. Edits. Carreón G. A., Cobo O. M. F., Y San Vicente T. A. Universidad Nacional Autónoma de México. 1, 1-91.
- Lladó, S., Zúifcáková, L., Větrovský, T., Eichlerová, I., y Baldrian, P. (2016). Functional screening of abundant bacteria from acidic forest soil indicates the metabolic potential of *Acidobacteria* subdivision 1 for polysaccharide decomposition. *Biology and Fertility of Soils*, 52(2), 251–260.
- Llenderal-Cázares, C., Castro-Torres, R., y Miranda-Perkins, K. (2017). Bionomics of *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt, 1847) (Lepidoptera: Cossidae). *SHILAP Revista de Lepidopterología*, 45(179), 373-383.
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K., y Baldrian, P. (2016). Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports*, 6, 25279.
- Lozada-Aranda, M., Rojas-Barrera, I., Mastretta-Yanes, A., Ponce-Mendoza, A., Burgeff, C. Orjuela, R., y Oliveros-Galindo, O. (2017). Las milpas de México. *Oikos*, 17,10-13.
- Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W., y Pretorius S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M., Sánchez, G., Buckler, E., y Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *National Academy of Sciences*, 7, 252.
- Morgenstern I., Klopman S. y Hibbett. (2008). Molecular Evolution and Diversity of Lignin Degrading Heme Peroxidases in the *Agaricomycetes*. *Journal of Molecular Evolution*. 66, 243–257.
- Neethu Shah, Haixu Tang, Thomas G. Doak, and Yuzhen Ye. (2010). Comparing bacterial communities inferred from 16s rna gene sequencing and shotgun metagenomics. *Biocomputing*, 165-176.
- O'Leary, M. (2016). Maíz: de México al mundo. El Batán, México: CIMMYT. Recuperado de <https://www.cimmyt.org/maize-from-mexico-to-the-world>.
- Pan, Y., Birdsey, R., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, E., Kurz, W., Phillips, O., Shvidenko, A., Lewis, L., Canadell, G., Ciais, P., Jackson, B., Pacala W., McGuire, D., Piao, S., Rautiainen, A., Sitch, S., y Hayes, D. (2011). A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Science*, 333, 988–93.
- Paniagua Voirol, L., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M., y Fatouros, N. (2018). Bacterial Symbionts in Lepidoptera: Their Diversity, Transmission, and Impact on the Host. *Frontiers in Microbiology*, 9(27), 556.
- Peiffer, J., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. y Dangl, J. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of science*. 110(16), 6548–6553.
- Plascencia, R., Castañón, B. y Raz-Guzmán, A. (2011). La biodiversidad en México su conservación y las colecciones biológicas. *Ciencias*, 101, 36-43.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P. Peplies, J. y Glöckener F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tolos. *Nucleic Acids Research*, 41,590-596.

- Ramos-Elorduy, J., Moreno M., Vázquez I., Landero I., Oliva-Rivera, H. y Camacho H. (2011). Edible *Lepidoptera* in Mexico: Geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7, 2.
- Ramos-Elorduy, J. (2006). Threatened edible insects in Hidalgo, Mexico and some measures to preserve them. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, Volumen 2, 51.
- Rampelotto, P. (2016). *Biotechnology of extremophiles: Advances a challenges*. Springer, 1-7.
- Ranere, A., Piperno, D., Holst, I., Dickau, R., e Iriarte J. (2009). The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5014-5018.
- Rappe, M., y Giovannoni J., (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57,369-394.
- Rebollar, A., Sandoval-Castellanos, E., Roessler, K., Gaut, B.S., Alcaraz, L. Benítez, M. y Escalante, A. (2017). Seasonal Changes in a Maize-Based Polyculture of Central Mexico Reshape the Co-occurrence Networks of Soil Bacterial Communities. *Frontiers in microbiology*, 8, 2478.
- Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M., y Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology*, 6 (9), 981-9.
- Rintha-Kanto, J., Sinkko, H., Rajala, T., Al-Soud, W., Sørensen, S., Tamminen, V., y Timonen, S. (2016). Natural decay process affects the abundance and community structure of bacteria and Archaea in *Picea abies* logs. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 403–10.
- Russella Jacob A., Moreaua Corrie S., Goldman-Huertasa Benjamin, Fujiwara Mikiko, Lohmana David J. y Piercea Naomi E. (2009). Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21236-21241.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Seigle-Murandi, F., Guiraud, P., Croize, J., Falsen, E. y Eriksson, L. K-E. (2000). Bacterial are omnipresent on *Phanerochaete chrysosporium* Burdssall. *Applied and enviromental Microbiology*, 62, 2477-2481.
- Shi, W, Xie, S, Chen, X, Sun, S, y Zhou, X. (2013). Comparative genomic analysis of the endosymbionts of herbivorous insects reveals eco-environmental adaptations: biotechnology applications. *PLoS Genet* 9(1), e1003131.
- Sun, H., Terhonen, E., Kasanen, R., y Asiegbu, O. (2014). Diversity and community structure of primary wood-inhabiting bacteria in boreal forest. *Geomicrobiology Journal*, 31, 315–24.
- Taylor, M., Radax, R., Steger, D., y Wagner, M. (2007). Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological. *Microbiology and molecular biology review*, 71(2), 295-347.
- Tekere, M., Lötter, A., Olivier, J., Jonker, N. y Venter., S. (2011). Paper Metagenomic analysis of bacterial diversity of Siloam hot water spring, Limpopo, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 10(78), 18005-18012.
- Tkacz, A., y Poole, P. (2015). Role of root microbiota in plant productivity. *Journal of Experimental Botany*, 8(66), 2167–2175.
- Valásková, V, de Boer, W, Klein Gunnewiek, P., Pospisšek, M., y Baldrian, P. (2009). Phylogenetic composition and properties of bacteria coexisting with the fungus *Hypholoma fasciculare* in decaying wood. *ISME Journal*, 3,1218–21.

- Van der Heijden, M.G., Bardgett, R.D. y Van Straalen, N.M. (2008), The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems, *Ecology Letters*, 11, 296-310.
- Van der Wal, A., de Boer, W., Smant, W., y van Veen, A. (2007). Initial decay of woody fragments in soil is influenced by size, vertical position, nitrogen availability and soil origin. *Plant Soil*, 301, 189–201.
- Vogel, T., Simonet, P., Jansson, J., Hirsch, P., Tiedje, J., van Elsas, J., Bailey, M., Nalin, R., y Philippot, L. (2009). TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome, *Nature Reviews Microbiology*, 7, 252.
- Warnecke, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., y Richardson, T. (2007). Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* 450, 560–565.
- Warren, W., Hillier, W., Marshall Graves, J., Birney, E., Ponting, C., Grützner, F., y Wilson, R. (2008). Genome analysis of the *platypus* reveals unique signatures of evolution. *Nature*, 453(7192), 175–183.
- Weißhaupt, P., Pritzkow, W., y Noll, M. (2011). Nitrogen metabolism of wood decomposing *basidiomycetes* and their interaction with diazotrophs as revealed by IRMS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307, 225–31.
- Whitman, B., Coleman, C., y Wiebe J. (1989) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Yara, R., Maccheroni, W., Horii, J. y Azevedo, J. (2006). A bacterium belonging to the *Burkholderia cepacia* complex associated with *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Microbiology*, 44, 263–8.
- Zhang H-B, Yang M-X, Tu R. (2008). Unexpectedly high bacterial diversity in decaying wood of a conifer as revealed by a molecular method. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 471–474.