

DIVERSIDAD BACTERIANA DEL SUELO: MÉTODOS DE ESTUDIO NO DEPENDIENTES DEL CULTIVO MICROBIANO E IMPLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

SOIL BACTERIAL DIVERSITY: MICROBIAL CULTURE-INDEPENDENT METHODS OF STUDY AND BIOTECHNOLOGICAL IMPLICATIONS

Adelfo Escalante-Lozada, Guillermo Gosset-Lagarda, Alfredo Martínez-Jiménez y Francisco Bolívar-Zapata

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología. UNAM. Avenida Universidad 2001. Colonia Chamilpa. Cuernavaca Morelos. 62210. México. (adelfo@ibt.unam.mx)

RESUMEN

Los suelos poseen una inmensa diversidad bacteriana, poco explorada debido principalmente al carácter no cultivable de una gran cantidad de microorganismos. Esta limitativa se ha reducido por el desarrollo de técnicas que permiten la extracción de material genético (ADN), directamente de los microorganismos en el suelo (metagenoma) sin necesidad de un cultivo previo. El objetivo de esta revisión fue presentar las metodologías más comunes para el análisis de las comunidades bacterianas en el suelo. Se discuten aquellas que permiten la clonación de moléculas de ADN provenientes de metagenomas y su análisis, con el propósito de identificar genes que codifican para enzimas con una potencial aplicación biotecnológica.

Palabras clave: Biotecnología, diversidad bacteriana, diversidad metabólica, metagenoma.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente los estudios para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes ambientes se basan en la suposición de que las técnicas de cultivo permiten recuperar la mayor parte de los microorganismos en una muestra. Sin embargo, únicamente entre 0.1 y 10% de las bacterias en el ambiente son ahora cultivables (Rondon *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 1999; Tiedje y Stein, 1999; Handelsman *et al.*, 2002; Torsvik y Øvreås, 2002; Torsvik *et al.*, 2002).

Para explicar este fenómeno se ha arguido que se desconocen los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de un gran número de grupos microbianos en su ambiente natural. Además, hay poca información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad microbiana (McDougald *et al.*, 1998; Tiedje y Stein, 1999; Zengler *et al.*, 2002; Keller y Zengler, 2004).

ABSTRACT

Soil sustains an immense bacterial diversity, which remains mostly unexplored due mainly to the large amount of microorganisms being uncultivable. This limitation has been reduced because of the development of techniques which allow the isolation of genetic material (DNA), directly from soil microorganisms (metagenome) without requiring a previous culture. The objective of this review was to summarize the most common methodologies for analyzing soil bacterial communities. A discussion is conducted about methodologies that permit cloning of DNA molecules from metagenome and their analysis, with the purpose of identifying genes which codify for enzymes with potential for biotechnological application.

Key words: Biotechnology, bacterial diversity, metabolic diversity, metagenome.

INTRODUCTION

Traditionally, the studies for characterizing bacterial diversity in different environments are based on the supposition that based culture techniques allow to recover most of the microorganisms in a sample. However, only between 0.1 and 10% of the bacteria in the environment are actually cultivable (Rondon *et al.*, 1999, Watts *et al.*, 1999; Tiedje and Stein, 1999; Handelsman *et al.*, 2002; Torsvik and Øvreås, 2002; Torsvik *et al.*, 2002).

To explain this phenomenon it has been assumed that the nutritional requirements and the physicochemical conditions necessary for the development of a large number of microbial groups in their natural environment are not known. Besides, there is little information about symbiotic, parasitic, and commensal relations sustained by the members of a microbial community (McDougald *et al.*, 1998; Tiedje and Stein, 1999; Zengler *et al.*, 2002; Keller and Zengler, 2004).

It has also been suggested that non-cultivable bacteria are microorganisms phylogenetically similar to the cultivable ones, but in a physiological state that

Recibido: Marzo, 2004. Aprobado: Octubre, 2004.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 38: 583-592. 2004.

También se ha propuesto que las bacterias no cultivables son microorganismos filogenéticamente similares a los cultivables, pero en un estado fisiológico que los hace recalcitrantes a ser cultivados. La base de esta explicación es que algunas bacterias cultivables pueden convertirse en viables, pero no cultivables en condiciones ambientales adversas, y revertirse a un estado cultivable al restaurarse las condiciones favorables (McDougald *et al.*, 1998). Por tanto, 90.0 a 99.9% de las bacterias no cultivables están representadas por su contraparte cultivable (Rondon *et al.*, 1999). No hay una explicación satisfactoria para entender la baja proporción de bacterias cultivables, y este fenómeno ha sido una seria limitación para estudiar la diversidad microbiana del suelo.

Ahora hay herramientas moleculares que permiten realizar la ingeniería genética molecular o tecnología del ADN recombinante (Bolívar, 2004). Con ella es posible el aislamiento, la modificación y la caracterización del ADN de cualquier organismo. Esta tecnología es fundamental para comprender un número importante de procesos biológicos, y para el estudio de la diversidad biológica (Torsvik *et al.*, 2002).

Para estudiar la diversidad bacteriana, las técnicas del ADN recombinante permiten superar la limitación de no poder cultivar la mayoría de las bacterias de un ambiente particular. La necesidad de cultivar las bacterias presentes en una muestra, ha sido substituida por la capacidad de aislar y caracterizar el material genético presente. Al conjunto de los genomas de microorganismos en una muestra de un nicho ecológico determinado, se le llama metagenoma (Handelsman *et al.*, 2002). Así, se puede hablar del metagenoma bacteriano correspondiente a muestras específicas de suelos o de otros ambientes.

El análisis del metagenoma bacteriano por técnicas moleculares ha permitido determinar que algunos grupos bacterianos no son fáciles de cultivar y que la diversidad de esta mayoría no cultivable es muy amplia (Keller y Zengler, 2004). En este ensayo se presentan diferentes metodologías moleculares no dependientes del cultivo, que se han utilizado para el estudio de las bacterias del suelo, incluyendo las consideradas como no cultivables. Se discute también las aplicaciones de algunas de estas técnicas en el estudio de la composición y variación de comunidades bacterianas en muestras de suelos, así como el potencial biotecnológico del estudio de la diversidad bacteriana y metabólica.

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA POR MÉTODOS NO DEPENDIENTES DEL CULTIVO MICROBIANO

La primera aproximación metodológica para determinar la diversidad bacteriana no cultivable en el suelo

makes them difficult to being cultivated. This explanation is based on the fact that some cultivable bacteria may become viable, but not cultivable in adverse environmental conditions, and revert to a cultivable state when favorable conditions are restored (McDougald *et al.*, 1998). Therefore, 90.0 to 99.9% of the uncultivable bacteria are represented by their cultivable counterpart (Rondon *et al.*, 1999). There is no satisfactory explanation to make the low proportion of cultivable bacteria understandable, and this phenomenon has been a serious limitation for the study of soil microbial diversity.

Nowadays, there are molecular tools allowing to perform molecular genetic engineering or recombinant DNA technology (Bolívar, 2004). This makes isolation, modification, and description of DNA of any organism possible. This technology is fundamental for the comprehension of an important number of biological processes and for the study of biological diversity (Torsvik *et al.*, 2002).

For studying bacterial diversity, the recombinant DNA techniques permit to overcome the limitation of not being able to cultivate most of the bacteria in a particular environment. The need of cultivating the bacteria present in a sample has been substituted by the capacity of isolating and describing the genetic material present. The mixture of microorganism genomes in a sample of a certain ecological niche is called metagenome (Handelsman *et al.*, 2002). Thus, it is feasible to speak of the bacterial metagenome corresponding to specific soil samples or other environments.

The analysis of the bacterial metagenome through molecular techniques has allowed to determine that some bacterial groups are not easy to cultivate and that the diversity of this uncultivable majority is very broad (Keller and Zengler, 2004). In this essay, different molecular culture-independent methodologies are presented, which have been utilized for the study of soil bacteria, including those considered uncultivable. Furthermore, applications of some of these techniques in the study of composition and variation of bacterial communities in soil samples are discussed, as well as the biotechnological potential of the study of bacterial and metabolic diversity.

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA POR MÉTODOS NO DEPENDIENTES DEL CULTIVO MICROBIANO

The first methodological approach to determining uncultivable bacterial diversity in soil was developed by Torsvik and Goksoyr at the end of the 1970's (quoted in Torsvik and Øvreås, 2002), comparing the bacterial metagenome reassociation rate of a sample of thermally

fue desarrollada por Torsvik y Goksoyr a finales de la década de 1970 (citado en Torsvik y Øvreås, 2002), comparando la tasa de reasociación del metagenoma bacteriano de una muestra de suelo desnaturalizada térmicamente con la del ADN genómico de una cantidad conocida de células de *Escherichia coli*. Los resultados de dicho estudio indicaron que la complejidad genética de la muestra es una función del número de genomas presentes en ella. Una muestra de metagenoma bacteriano extraída de un suelo sin perturbar posee una complejidad equivalente entre 6000 a 10 000 genomas de *E. coli* (el genoma de *E. coli* corresponde a 4.6×10^6 pares de bases); de 350 a 1500 genomas para una muestra de suelo agrícola contaminado por metales, donde la complejidad de los microorganismos cultivables muestra equivale sólo a 40 genomas de *E. coli* (Øvreås *et al.*, 1998; Torsvik y Øvreås, 2002).

Se han desarrollado técnicas cada vez más eficientes para extraer metagenomas bacterianos de diversos ambientes. Los métodos se dividen en dos grupos: microorganismos lisados directamente en una suspensión amortiguada de la muestra a analizar (Zhou *et al.*, 1996; Rondon *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2003); o microorganismos primero separados del substrato para luego ser lisados (Courtois *et al.*, 2001; Courtois *et al.*, 2003).

Los métodos directos permiten la extracción rápida de ADN de buena calidad (p.e. para arcilla, eficiencia de lisis bacteriana de 26 a 92% y rendimientos de 2.5 a 26.9 mg ADN g⁻¹ suelo; Zhou *et al.*, 1996). Sin embargo, en el metagenoma obtenido se ha detectado ADN no bacteriano (mitocondrial y de cloroplasto; Zhou, *et al.* 1996), que está contaminado con sustancias asociadas a la muestra ambiental que interfieren con la manipulación enzimática del ADN extraído (p.e. ácidos húmicos, que interfieren con la actividad de enzimas de restricción o ADN polimerasas) (Frostegård *et al.*, 1999; Rondon *et al.* 2000). El método basado en el aislamiento preliminar de células y su posterior lisis, permite obtener ADN con integridad y pureza mayores, aunque la eficiencia de lisis y los rendimientos son menores (7.3 a 23% y hasta 4 mg ADN g⁻¹ suelo) (Holben *et al.*, 1998; Krsek y Wellington, 1999).

Los estudios actuales pretenden caracterizar tanto a los microorganismos cultivables, como a los no cultivables, basándose en el análisis del metagenoma por medio de técnicas moleculares y comparaciones filogenéticas (Figura 1). Esto se complementa en algunos casos con el análisis de las propiedades metabólicas de la muestra, p.e. el uso de microplacas para determinar la capacidad de utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno por los microorganismos presentes (placa EcoPlate^{MR} de BIOLOG), o mediante la determinación de actividades enzimáticas específicas a partir de suspensiones de muestras de suelo (Rondon *et al.*,

denaturalized soil with that of the genomic DNA of a known amount of *Escherichia coli* cells. The results of that study indicated that the genetic complexity of the sample is a function of the number of genomes present in the sample. A bacterial metagenome sample extracted from an unperturbed soil has a complexity equivalent between 6000 and 10 000 *E. coli* genomes (the *E. coli* genome corresponds to 4.6×10^6 base pairs); 350-1500 genomes for a sample of metal-contaminated agricultural soil, where the complexity of cultivable sample microorganisms is equivalent only to 40 *E. coli* genomes (Øvreås *et al.*, 1998; Torsvik and Øvreås, 2002).

More and more efficient techniques have been developed to extract bacterial metagenomes from diverse environments. The methods are divided into two groups: microorganisms directly lysed in a buffered suspension of the sample to analyze (Zhou *et al.*, 1996; Rondon *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2003) or microorganisms firstly separated from the substratum to be lysed later on (Courtois *et al.*, 2001; Courtois *et al.*, 2003).

The direct methods permit rapid extraction of good-quality DNA (e.g. for clay, efficiency of bacterial lysis from 26 to 92%, and yields from 2.5 to 26.9 mg DNA g⁻¹ soil; Zhou *et al.*, 1996). Nevertheless, in the obtained metagenome nonbacterial DNA has been detected (mitochondrial and chloroplast DNA; Zhou *et al.*, 1996), contaminated with substances associated to the environmental sample interfering in enzymatic manipulation of extracted DNA (e.g. humic acids, that interfere in the activity of restriction enzymes or DNA polymerases) (Frostegård *et al.*, 1999; Rondon *et al.*, 2000). The method based on preliminary cell isolation and their subsequent lysis allows to obtain DNA with higher integrity and purity, though lysis efficiency and yields are lower (7.3 to 23% and up to 4 mg DNA g⁻¹ soil) (Holben *et al.*, 1998; Krsek and Wellington, 1999).

Recent studies try to characterize cultivable as well as uncultivable microorganisms, based on metagenome analysis through molecular techniques and phylogenetic comparisons (Figure 1). In some cases, this is complemented by analysis of metabolic sample properties, for example the use of micro plates to determine the capacity of utilizing different carbon and nitrogen sources by present microorganisms (BIOLOG EcoPlate^{MR}), or through the determination of specific enzymatic activities, starting from soil sample suspensions (Rondon *et al.*, 1999; Osborn *et al.*, 2000; Ranjard *et al.*, 2000; Theron and Cloete, 2000; McCaig *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2002; Torsvik and Øvreås, 2002; Liu and Sthal, 2002).

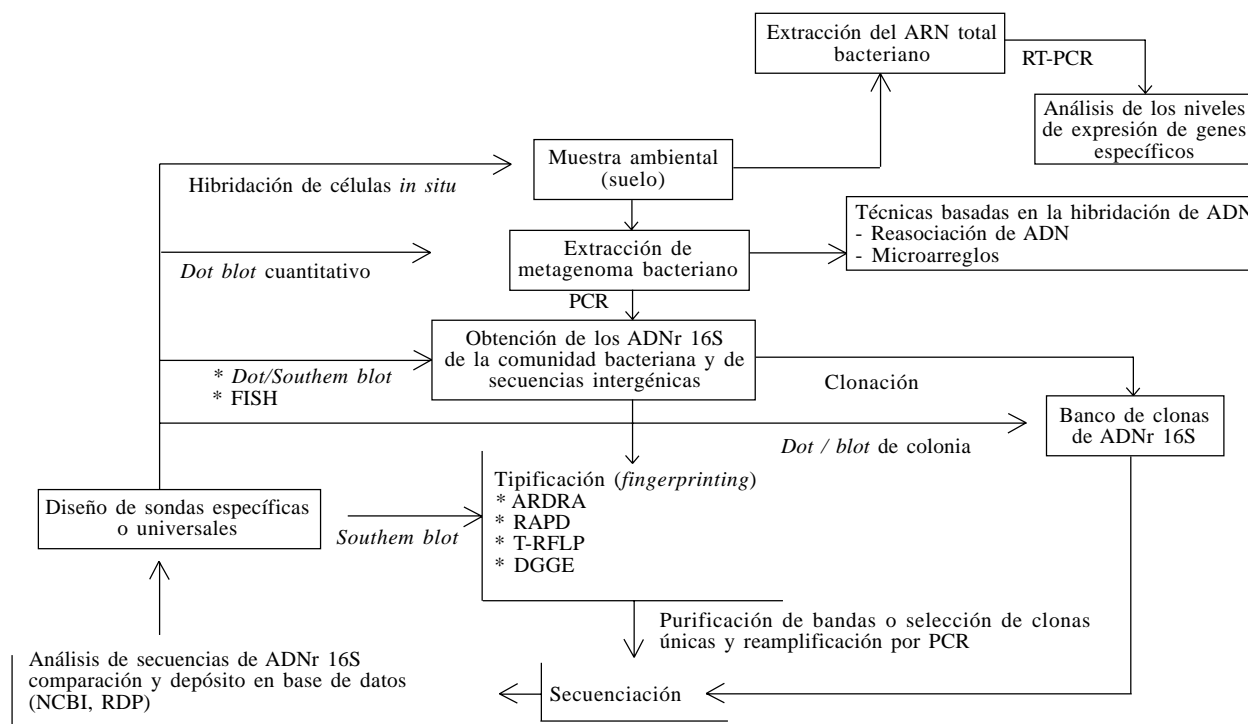


Figura 1. Técnicas moleculares no dependientes del cultivo microbiano utilizadas en el análisis de la diversidad bacteriana de suelos. Abreviaciones: NCBI, National Center for Biotechnology Information; RDP, Ribosomal Database Project; FISH, hibridación fluorescente *in situ*; PCR, reacción en cadena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

Figure 1. Microbial culture-independent molecular techniques utilized in the analysis of soil bacterial diversity. Abbreviations: NCBI, National Center for Biotechnology Information; RDP, Ribosomal Database Project; FISH, *in situ* fluorescent hybridization; PCR, polymerase chain reaction; ARDRA, amplified ribosomal DNA restriction analysis; RAPD, random amplification of DNA; T-RFLP, terminal-restriction fragment length polymorphism; DGGE, denaturalizing gel gradient electrophoresis; RT-PCR, real time PCR.

1999; Osborn *et al.*, 2000; Ranjard *et al.*, 2000; Theron y Cloete, 2000; McCaig *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2002; Torsvik y Øvreås, 2002; Liu y Sthal, 2002).

Implicaciones biológicas del análisis de la diversidad bacteriana del suelo por técnicas moleculares no dependientes del cultivo

El estudio de la diversidad bacteriana con estas técnicas permitió ha permitido obtener información sobre la composición y estructura de poblaciones y comunidades bacterianas, establecer el impacto de los factores ambientales sobre la diversidad bacteriana, y diseñar de marcadores con fines de diagnóstico e identificación tanto de bacterias cultivables como no cultivables (Wu *et al.*, 2001; Sebat *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2002; Torsvik y Øvreås, 2002).

El análisis de las secuencias de los genes que codifican los ARN ribosomales 16S (ADNr 16S) ha permitido

Biological implications of the analysis of soil bacterial diversity by culture-independent molecular techniques

The study of bacterial diversity with these techniques has allowed to obtain information about composition and structure of bacterial populations and communities, to establish the impact of environmental factors on bacterial diversity, and to design markers with the purpose of diagnosing and identifying cultivable as well as uncultivable bacteria (Wu *et al.*, 2001; Sebat *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2002; Torsvik and Øvreås, 2002).

The analysis of gene sequences codifying ribosomal RNA 16S (rRN 16S) has allowed the generation of molecular signatures at various taxonomic levels, that can be utilized as a base of bacterial identification by phylogenetic comparison (Theron and Cloete, 2000). This approach has been utilized to characterize bacterial diversity in different types of soils (Borneman *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 2001; Liles *et al.*, 2003) and sediments

establecer firmas moleculares a varios niveles taxonómicos, utilizadas como la base de una identificación bacteriana por comparación filogenética (Theron y Cloete, 2000). Esta aproximación se ha utilizado para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes tipos de suelos (Borneman *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 2001; Liles *et al.*, 2003) y sedimentos (Urakawa *et al.*, 1999; Yanagibayashi *et al.*, 1999; Bowman y McCuaig, 2003).

Los resultados de este análisis permitieron determinar que la diversidad bacteriana de muestras de suelos está conformada por bacterias conocidas y por nuevos grupos, tanto relacionados como no relacionados filogenéticamente a las ya conocidas. Por ejemplo, en el análisis del metagenoma de un suelo agrícola se determinó que 98.4% de las secuencias de ADNr 16S identificadas pertenecen al Dominio Bacteria; de ellas, 16.1% son Proteobacterias, 2.18% del grupo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, 21.8% del grupo de bacterias Gram + con bajo porcentaje de G+C, 39.4% están distribuidas en grupos desconocidos dentro del Dominio Bacteria (Borneman *et al.*, 1996). En otro tipo de suelo agrícola se determinó una baja proporción de Firmicutes, α -Proteobacterias en comparación con la representación de las Subdivisiones β - y γ -Proteobacteria; además hubo ausencia de Archaeas y presencia de secuencias relacionadas con subdivisiones que carecen de representantes cultivables (Liles *et al.*, 2003).

La aplicación de algunas técnicas moleculares para determinar el impacto del ambiente sobre la composición de la diversidad bacteriana, ha permitido demostrar que el tamaño de partícula de suelo tiene mayor impacto sobre la diversidad bacteriana que el pH y el tipo y cantidad de compuestos orgánicos (Sessitsch *et al.*, 2001). El análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP) (Osborn *et al.* 2000; Scala y Kerkhof, 2000) y de las secuencias de los ADNr 16S del metagenoma en suelos con un tamaño de partícula pequeño (arcilla y cieno/fango/aluvión), demostró una gran diversidad de bacterias de las divisiones *Halophaga/Acidobacterium* y *Prosthecoacter*; pero en suelos con tamaño de partícula mayores (arena) hubo una baja diversidad de bacterias de la división *Halophaga/Acidobacterium*, predominando las de la subdivisión γ -Proteobacteria (Sessitsch *et al.*, 2001).

El estudio de la diversidad y la dinámica bacterianas, en una muestra de suelo agrícola, por cuentas viables y por análisis de perfiles de ácidos grasos de membrana, permitió determinar bacterias Gram + (~80% del total cultivado) y pocos miembros del grupo de las proteobacterias y bacterias verde-sulfurosas (15% y 5%). De los géneros aislados, *Micrococcus*, *Arthobacter* y *Corynebacterium* están presentes todo el año, mientras que *Bacillus* sólo se encuentra en julio, cuando la

(Urakawa *et al.*, 1999; Yanagibayashi *et al.*, 1999; Bowman and McCuaig, 2003).

The results of this analysis made it possible to determine that the bacterial diversity of soil samples is made up of known bacteria and new groups, phylogenetically related as well as not related to the already known groups. For example, in the analysis of the agricultural soil metagenome, it was established that 98.4% of the identified rRNA 16S sequences belong to the Domain Bacteria; 16.1% of them are Proteobacteria, 2.18% are of the *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* group, 21.8% belong to the Gram+ bacteria with low percentage of G+C, 39.4% are divided up in groups unknown within the Domain Bacteria (Borneman *et al.*, 1996). In another type of agricultural soil, a low proportion of Firmicutes and α -Proteobacteria compared to the representation of the Subdivisions β - and γ -Proteobacteria, was discovered; besides, there were no Archaeas, but presence of sequences related to subdivisions lacking cultivable representatives (Liles *et al.*, 2003).

The application of some molecular techniques to estimate the effect of environment on the composition of bacterial diversity, has demonstrated that soil particle size has greater impact on bacterial diversity than pH and the type and amount of organic compounds (Sessitsch *et al.*, 2001). The analysis of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) (Osborn *et al.*, 2000; Scala and Kerkhof, 2000) and 16S rDNA sequences of the metagenome in soils with small particle size (clay and silt/mud/alluvium) showed a great bacterial diversity of *Halophaga/Acidobacterium* and *Prosthecoacter* divisions; but in soils with larger particle size (sand), there was a low bacterial diversity of the *Halophaga/Acidobacterium* division, predominating those of γ -Proteobacteria subdivision (Sessitsch *et al.*, 2001).

With the study of bacterial diversity and dynamics in an agricultural soil sample, by viable counts and profile analysis of membrane fatty acids, Gram+ bacteria (~80% of the cultured total) and few members of the proteobacteria and the sulfurous-green bacteria groups (15% and 5%) were determined. Of the isolated genera, *Micrococcus*, *Arthobacter*, and *Corynebacterium* are present all the year, whereas *Bacillus* is only found in July, when cultured diversity was lowest (Smit *et al.*, 2001). The molecular analysis of this soil sample showed that the diversity obtained from cloned 16S rDNA sequences was greater than the cultured diversities, detecting members of five bacterial divisions: *Acidobacterium*, *Proteobacteria*, *Nitrospora*, cyanobacteria and sulfurous-green bacteria. Gram + bacteria, the most abundant in the cultivated diversity, were not observed. Although both methodologies used for the

diversidad cultivada fue más baja (Smit *et al.*, 2001). El análisis molecular de esa muestra de suelo mostró que la diversidad obtenida a partir de las secuencias de los ADNr 16S clonados fue mayor que la diversidad cultivada, detectándose miembros de cinco divisiones bacterianas: *Acidobacterium*, *Proteobacteria*, *Nitrospora*, cianobacterias y bacterias verde-sulfurosas. No se detectaron bacterias Gram + que fueron las más abundante en la diversidad cultivada. Aunque las dos metodologías usadas para el análisis de la diversidad bacteriana mostraron variaciones importantes en los tipos bacterianos identificados, fue posible observar el mismo patrón de variación temporal: una baja diversidad y número de grupos bacterianos en enero debido probablemente a la baja temperatura en esa época del año; un incremento en número y diversidad en mayo y septiembre debido al aporte de nutrientes al suelo por fertilización (primavera) y por el aporte al suelo de material vegetal durante la cosecha (otoño). Los resultados del estudio de diversidad bacteriana permitieron establecer una relación entre la variación de la diversidad de las proteobacterias con los niveles tróficos del suelo (Borneman *et al.*, 1996; Fantroussi *et al.*, 1999; Smit *et al.*, 2001).

**CLONACIÓN MOLECULAR DEL ADN
METAGENÓMICO COMO UNA ESTRATEGIA PARA EL
ANÁLISIS Y EXTRACCIÓN DE LA DIVERSIDAD
METABÓLICA DEL SUELO: IMPLICACIONES
BIOTECNOLÓGICAS**

Otro enfoque metodológico para estudiar de la diversidad bacteriana de suelos es la utilización de sistemas de clonación, con lo cual es posible ligar fragmentos de ADN metagenómico para su propagación dentro de un hospedero bacteriano y su análisis.

Algunas bacterias poseen moléculas de ADN circular llamadas plásmidos, las cuales se replican independientemente del cromosoma. Estas moléculas (tamaños entre 3 y 10 kb), son significativamente menores que un cromosoma bacteriano. Desde la década de 1970 se han utilizado estas moléculas como receptoras de fragmentos de ADN provenientes del mismo o de otro organismo (Bolívar, 2004); por tanto, a los plásmidos también se les llama vehículos moleculares o vectores de clonación molecular.

El desarrollo de vectores especializados como algunos cósmidos y cromosomas bacterianos artificiales, que pueden ligar fragmentos de ADN de hasta 39 kb y 100 kb, permite clonar fragmentos de ADN metagenómico que contengan varias docenas de genes y, teóricamente, podrían codificar rutas biosintéticas completas (Rondon *et al.*, 1999; Handelsman *et al.*, 2002; Berry *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2002; Voget *et al.*, 2003). Una vez obtenido el ADN metagenómico de una muestra, se construye un

analysis of bacterial diversity showed important variations in the identified bacterial types, the same pattern of temporal variation could be observed: low diversity and number of bacterial groups in January, due probably to the low temperature at this time of the year; an increase in number and diversity in May and September, due to the nutrient supply to the soil by fertilization (spring), and because of the supply of vegetal material to the soil during the harvest (fall). The results of the study of bacterial diversity allowed for establishing a relation between the variation of proteobacteria and the trophic soil levels (Borneman *et al.*, 1996; Fantroussi *et al.* 1999; Smit *et al.*, 2001).

**MOLECULAR CLONING OF METAGENOMIC DNA AS
A STRATEGY FOR ANALYSIS AND EXTRACTION OF
METABOLIC SOIL DIVERSITY:
BIOTECHNOLOGICAL IMPLICATIONS**

Another methodological approach to study soil bacterial diversity is the utilization of cloning systems, which make it possible to ligate metagenomic DNA fragments for their propagation within a bacterial host and for their analysis.

Some bacteria possess circular DNA molecules called plasmids, which replicate independently of the chromosome. These molecules (sizes between 3 and 10 kb) are significantly smaller than a bacterial chromosome. Since the decade of the 70's this type of molecules have been utilized as DNA fragment recipients, originating from the same or another organism (Bolívar, 2004); therefore plasmids are also called molecular vehicles, or molecular cloning vectors.

The development of specialized vectors, such as artificial bacterial chromosomes and cosmids which may bind DNA fragments up to 39 kb and 100 kb, permits to clone metagenomic DNA fragments containing several dozens of genes and theoretically might codify complete biosynthetic paths (Rondon *et al.*, 1999; Handelsman *et al.*, 2002; Berry *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2003). Once metagenomic DNA obtained from a sample, a metagenomic bank is constructed and analyzed, based on two approaches: 1) Search of cloned genes function in the bank; 2) analysis of gene nucleotide sequence represented in the bank.

The analysis of the bacterial metagenome through these two approaches has been applied to different microbiological problems and has led to (Handelsman *et al.*, 2002; Schloss *et al.*, 2003; Keller and Zengler, 2004): 1) The phylogenetic characterization of microbial diversity; 2) the characterization of new genomes; 3) the elucidation of new metabolic pathways for the synthesis of primary and secondary metabolites; 4) the identification of biological systems of resistance to

banco metagenómico y se analiza con base en dos enfoques: 1) Búsqueda de la función de los genes clonados en el banco; 2) análisis de la secuencia nucleotídica de los genes representados en el banco.

El análisis del metagenoma bacteriano mediante esas dos aproximaciones se ha aplicado a diversos problemas microbiológicos y ha permitido (Handelsman *et al.*, 2002; Schloss *et al.*, 2003; Keller y Zengler, 2004): 1) La caracterización filogenética de la diversidad microbiana; 2) la caracterización de nuevos genomas; 3) la elucidación de nuevas vías metabólicas para la síntesis de metabolitos primarios y secundarios; 4) la identificación de sistemas biológicos de resistencia a compuestos contaminantes; 5) el descubrimiento de nuevas enzimas y biopolímeros.

Aislamiento de genes clonados en un banco de ADN metagenómico que codifiquen para proteínas con aplicaciones biotecnológicas

Esta estrategia se basa en la identificación de clonas conteniendo ADN metagenómico que expresan una característica de interés (p.e. una actividad enzimática o antimicrobiana), seguida de la secuenciación del inserto de ADN en las clonas positivas y del análisis del producto o actividad (Rondon *et al.*, 1999, 2000; Handelsman *et al.*, 2002; Voget *et al.*, 2003).

La principal limitación de este método es que se requiere la expresión de los genes presentes en el metagenoma por la maquinaria enzimática transcripcional de la célula hospedera, generalmente *E. coli*. Además, cuando el producto de interés resulta de una ruta metabólica, se requiere que todos los genes que la conforman se encuentren en el fragmento de ADN metagenómico clonado. Otro aspecto importante que determina la capacidad de identificar actividades o productos de interés, es la disponibilidad de ensayos de detección desarrollados *ad hoc*, y que permitan el análisis de bancos formados por varios miles de clonas. Se han desarrollado diferentes metodologías y está disponibles una gran variedad de cepas de *E. coli* (principal microorganismo utilizado como hospedero) con características específicas (auxotrofías, mutaciones específicas, etc), que permiten expandir el rango del análisis de la expresión del ADN metagenómico (Rondon *et al.*, 1999; Gillespie *et al.*, 2002; Handelsman *et al.*, 2002).

El análisis funcional de bancos de ADN metagenómico ha permitido identificar una gran diversidad de productos y actividades de interés biotecnológico: antibióticos nuevos (turbomicina B) y previamente descritos, lipasas y esterasas capaces de sintetizar precursores de importancia farmacéutica y agroquímica, quitinasas, proteínas de membrana, genes que codifican la síntesis de compuestos como el poli-hidroxitirato

polluting compounds; 5) the discovery of new enzymes and biopolymers.

Isolation of cloned genes in a metagenomic DNA bank which codify for proteins with biotechnological applications

This strategy is based on the identification of clones containing metagenomic DNA, that express a characteristic of interest (e.g. an enzymatic or antimicrobial activity), followed by the sequencing of DNA insert in positive clones and by the characterization of the product or activity (Rondon *et al.*, 1999, 2000; Handelsman *et al.*, 2002; Voget *et al.*, 2003).

The main limitation of this method is the requirement of the expression of the genes present in the metagenome by the transcriptional enzymatic machinery of the host cell, generally, *E. coli*. Furthermore, when the product of interest results from a metabolic route, it is required that all the genes forming this route be present in the cloned metagenomic DNA fragment. Another important aspect, that determines the capacity of identifying activities or products of interest, is the availability of detection assays developed *ad hoc*, and allowing the analysis of banks consisting of up to several thousands of clones. Different methodologies have been developed and a great variety of *E. coli* strains (principal microorganism utilized as host) are available with specific characteristics (auxotrophies, specific mutations, etc.), which allow to expand the range of analysis of metagenomic DNA expression (Rondon *et al.*, 1999; Gillespie *et al.*, 2002; Handelsman *et al.*, 2002).

With the functional analysis of metagenomic DNA banks it has become possible to identify a great variety of products and activities of biotechnological interest: new antibiotics (turbomycin B) and previously described ones, lipases and esterases able to synthesize precursors of pharmaceutical and agro-chemical importance, chitinases, membrane proteins, genes that codify the synthesis of compounds, such as poly-hydroxybutyrate (biodegradable polymer), genes codifying the biosynthetic route of vitamins, etc (Rondon *et al.*, 2000; Gillespie *et al.*, 2002; Courtois *et al.*, 2003; Schloss and Handelsman, 2003). Besides analysis and utilization of the soil metagenome, the analysis of the metagenome and the extraction of metabolic diversity of the oceans are of biotechnological relevance. A diversity of 1.3×10^{28} Archaeas and 3.1×10^{28} Eubacteria are estimated, coming from subterranean communities, geothermal zones, hydrothermal ventilation shafts, hypersaline environments, such with extreme pH content, and polar regions (Keller and Zengler, 2004); (in the bacterial metagenome analysis of the Sargasso Sea, 1.2 millions of genes codifying for enzymes with diverse functional

(polímero biodegradable), genes que codifican la ruta biosintética de vitaminas, etc (Rondon *et al.*, 2000; Gillespie *et al.*, 2002; Courtois *et al.*, 2003; Schloss y Handelsman, 2003). Además del análisis y aprovechamiento del metagenoma del suelo, tiene relevancia biotecnológica el análisis del metagenoma y la extracción de la diversidad metabólica de océanos. Se calcula una diversidad de 1.3×10^{28} Archaeas y 3.1×10^{28} Eubacterias (en el análisis del metagenoma bacteriano del Mar del Sargaso se identificaron 1.2 millones de genes que codifican para enzimas con diversas categorías funcionales, incluyendo 782 nuevos fotorreceptores tipo rodopsinas; Venter *et al.*, 2004), procedentes de comunidades subterráneas, zonas geotérmicas, ventilas hidrotermales, ambientes hipersalinos, ambientes con pH extremos y de regiones polares (Keller y Zengler, 2004).

Análisis de la secuencia de los genes clonados en un banco de ADN metagenómico

La finalidad de esta estrategia es determinar toda la secuencia nucleotídica de segmentos específicos del ADN metagenómico, para establecer relaciones filogenéticas y funcionales entre las proteínas codificadas por genes presentes en el metagenoma y secuencias de aminoácidos depositadas en bancos de datos (Venter *et al.*, 2004). GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) es el archivo de secuencias de ADN más importante y extenso. Esta base de datos contiene secuencias de ADN de diversos organismos en una cantidad equivalente a veinte mil millones de pares de bases. Esta cantidad de información equivale aproximadamente a 20 millones de genes o 4000 genomas bacterianos completos de tamaño similar al de *E. coli*. Mediante programas computacionales es posible determinar si el ADN clonado tiene similitud significativa con alguna secuencia en el banco de datos. Si se determina que existe dicha similitud y se conoce la función de la secuencia depositada en el banco, entonces la secuencia clonada podría tener una actividad biológica idéntica o similar. Este dato serviría para definir enfoques experimentales que establecerían las propiedades bioquímicas de la proteína codificada en el metagenoma estudiado.

CONCLUSIONES

Los microorganismos del suelo tienen una gran importancia para mantener de la vida en nuestro planeta. El estudio de su diversidad es importante, porque estos organismos forman parte de comunidades complejas y dinámicas conformadas por numerosas especies. Para comprender su función en sus nichos específicos, es esencial identificar y cuantificar cada uno de los miembros que conforman estas comunidades.

categories were identified, including 782 new rhodopsin-type photoreceptors among them; Venter *et al.*, 2004),

Analysis of the cloned genes sequence in a metagenomic DNA bank

This strategy has the purpose to determine the entire nucleotide sequence of specific segments of metagenomic DNA, in order to establish phylogenetic and functional relationships between the proteins encoded by genes present in the metagenome and amino acid sequences deposited in data banks (Venter *et al.*, 2004). GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) is the most important and extensive file of DNA sequences. This data base contains an amount of DNA sequences of different organisms equivalent to 20 000 million pairs of bases. This amount of information is equivalent to approximately 20 million genes or 4000 complete bacterial genomes of similar size as that of *E. coli*. By means of computer programs it is possible to determine if the cloned DNA has significant similarity to any sequence in the data bank. If it is confirmed that said similarity exists, and the function of the sequence deposited in the bank is known, then the cloned sequence might have an identical or similar biological activity. This piece of information would serve to define experimental approaches, aimed at establishing the biochemical properties of the protein encoded in the studied metagenome.

CONCLUSIONS

Soil microorganisms are of great importance for the conservation of life on our planet. Studying their diversity is important due to the fact that these organisms form part of complex and dynamic communities made up by numerous species. In order to comprehend their function in their specific niches it is essential to identify and quantify each and every one of the members constituting these communities.

It is possible to characterize the uncultivable diversity present in different environments through analysis of the bacterial metagenome. The information generated will permit to understand the function of the bacterial communities in the bio-geochemical cycles of the biosphere, and how local and global human activity can alter microbial diversity. Counting on a more complete description of diversity makes it possible to expand our knowledge of biochemical and physiological mechanisms developed by Eubacteria and Archaea which allow their propagation in the extreme environments of the planet.

The analysis of genetic and metabolic diversity of the bacterial metagenome of soil samples has allowed to

Es posible caracterizar la diversidad no cultivable presente en diferentes ambientes por medio del análisis del metagenoma bacteriano. La información generada permitirá comprender la función de las comunidades bacterianas en los ciclos biogeoquímicos que mantienen a la biosfera, y cómo la actividad humana local y global puede alterar la diversidad microbiana. Contar con una descripción más completa de la diversidad hace posible ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos bioquímicos y fisiológicos desarrollados por Eubacterias y Archaeas, que permiten su desarrollo en los ambientes extremos del planeta.

El análisis de la diversidad genética y metabólica del metagenoma bacteriano de muestras de suelo ha permitido extraer y explotar su diversidad metabólica, incluyendo la de aquellos microorganismos considerados cultivables, y de aquellos aún no descubiertos. Esta metodología permitirá identificar actividades bacterianas novedosas con aplicaciones biotecnológicas potenciales. Sin embargo, a pesar de los avances en el estudio de la diversidad bacteriana, persisten algunas preguntas fundamentales:

- ¿Qué factores determinan que numerosos microorganismos del suelo y de otros ambientes no sean cultivables?
- ¿Qué fracción de los microorganismos no cultivables representan nuevas especies y nuevos linajes?
- ¿Cuál es su función biológica en la biosfera?
- ¿Qué especies bacterianas aún no descubiertas podrían tener relevancia biotecnológica?

LITERATURA CITADA

- Berry, A., C. Cjicchini, T. Selby, M. Sosio, and E. Wellington. 2003. Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiology Letters* 223: 15-20.
- Bolívar, F. 2004. Ingeniería genética: las herramientas moleculares y los métodos para aislar, caracterizar y manipular el DNA. *In: Fundamentos y Casos Exitosos de la Biotecnología Moderna*. Bolívar, F. (ed). El Colegio Nacional, México. pp: 57-84.
- Borneman, J., P. Skroch, K. O'Sullivan, J. Palus, N. Rumjanek, J. Jansen, J. Nienhuis, and E. Triplett. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1935-1943.
- Bowman, J. P., and R. D. McCuaig. 2003. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2463-2483.
- Courtois, S., A. Frostegard, P. Goransson, G. Depret, P. Jeannin, and P. Simonet. 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cell as previously released by density gradient centrifugation. *Environ. Microbiol* 3: 431-439.
- Courtois, S., C. Capelliano, M. Ball, F. Francou, P. Normand, G. Helynck, A. Martinez, S. Kolvek, J. Hopke, M. Osburne, P. August, R. Nalin, M. Guérneau, P. Jeannin, P. Simonet, and J. Pernodet. 2003. Recombinant environmental libraries provide

extract and exploit its metabolic diversity, including that of those microorganisms considered cultivable and of those not having been discovered yet. This methodology will help to identify novel bacterial activities with potential biotechnological applications. Nevertheless, despite the advances in the study of bacterial diversity, there still are some fundamental questions:

- What factors determine that numerous organisms of soil and other environments are not cultivable?
- What fraction of the uncultivable microorganisms represent new species and new lineages?
- Which is their biological function in the biosphere?
- What bacterial species, undiscovered yet, might be of biotechnological importance?

—End of the English version—



- access to microbial diversity for drugs discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 49-55.
- Fantroussi, S., L. Verschuere, W. Versatrate, and E. M. Top. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial diversity communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprinting and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 982-988.
- Frostegård, Å., S. Courtois, V. Ramisse, S. Clerc, D. Bernillon, F. Le Gall, P. Jeannin, X. Nesme, and P. Simonet. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5409-5420.
- Gillespie, D., S. Brady, A. Bettermann, N. Cianciotto, M. Liles, M. Rondon, J. Clardy, R. Goodman, and J. Handelsman. 2002. Isolation of turbomycin A and B from metagenomic library soil microbial DNA. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4301-4306.
- Handelsman, J., M. Liles, D. Mann, C. Riesenfeld, and R. M. Goodman. 2002. Cloning the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world. *In: Methods in Microbiology*, vol. 33. Functional Genomics. Wren, B. and N. Dorrel, (eds). Academic Press. Amsterdam, The Netherlands. pp: 241-255.
- Holben, W. E., J. K. Jansso, B. K. Chelm, and J. Tiedje. 1998. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 703-711.
- Keller, M., and K. Zengler. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews* 2: 141-150.
- Krsek, M., and E. Wellington. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J. Microbiol. Methods* 39: 1-16.
- Liles, M. R., B. F. Manske, S. B. Bintrim, J. Handelsman, and R. M. Goodman. 2003. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2684-2691.
- Liu, W-T., and D. Sthal. 2002. Molecular approaches for the measurement of density, diversity and phylogeny. *In: Manual of Environmental Microbiology*. Hurst, C. J. and L. C. Ronald (eds). ASM Press. Washington, D.C. USA. pp: 114-134.
- Lorenz, P., K. Liebeton, F. Niehaus, and J. Erick. 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion Microbiol.* 13: 572-577.

- McCaig, A., L. Glover, and J. Prosser. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4554-4559.
- McDougald, D., S. Rice, D. Weichart, and S. Kjelleberg. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 1-9.
- Morris, C. E., M. Bardin, O. Berge, P. Frey-Klett, N. Fromin, H. Girardin, M. H. Guinibretière, P. Lebaron, J. M. Thiéry, and M. Troussellier. 2002. Microbial diversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 592-616.
- Osborn, A. M., E. R. B. Moore, and K. N. Timmis. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2: 39-50.
- Øvreås, L., S. Jensen, F. L. Daae, and V. Torsvik. 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2739-2742.
- Ranjard, L., F. Poly, and S. Nazaret. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* 151: 167-177.
- Rondon, M., M. Goodman, and J. Handelsman. 1999. The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends Biotechnol.* 17: 403-409.
- Rondon, M., P. Augist, A. Bettermann, S. Brady, T. Grossman, K. Loiacono, B. Lynch, I. MacNeil, C. Minor, C. Lai Tiong, M. Gilman, M. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541-2547.
- Scala, D. J., and L. J. Kerkhof. 2000. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1980-1986.
- Sebat, J. L., F. S. Colwell, and R. L. Crawford. 2003. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4927-4934.
- Sessitsch, A., A. Weilharter, M. H. Gerzabek, H. Kirchmann, and E. Kandeler. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4215-4224.
- Schloss, P. D., and J. Handelsman. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion Biotechnol.* 14: 303-310.
- Smit, E., P. Leeflang, S. Sommans, J. van den Broek, S. van Mil, and K. Wernars. 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: 2284-2291.
- Theron J., and T. E. Cloete. 2000. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Rev. Microbiol.* 26: 37-57.
- Tiedje, J. M., and J. L. Stein. 1999. Microbial diversity: strategies for its recovery. *In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Demain A. L. and J. E. Davies (eds). ASM Press. Washington, D.C. USA. pp: 682-692.
- Torsvik, V., and L. Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiol* 5:240-245.
- Torsvik, V., L. Øvreås, and T. F. Thingstad. 2002. Prokaryotic diversity- Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296: 1064-1066.
- Urakawa, H., K. Kita-Tusukaoto, and K. Ohwada. 1999. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology.* 145: 3305-3315.
- Venter J.C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H., Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, and H. O. Smith. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
- Voget, S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K. H. Jaeger, and W. R. Streit. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6235-6242.
- Watts, J. E. M., A. S. Huddleston-Anderson, and E. M. H. Wellington. 1999. Bioprospecting. *In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Demain, A. L., and J. E. Davies (eds). ASM Press. Washington, D.C. USA. pp: 631-641.
- Wu, L., D. K. Thompson, G. Li, R. A. Hurt, J. M. Tiedje, and J. Zhou. 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5780-5790.
- Yanagibayashi, M., Y. Nogi, L. Li, and Ch. Kato. 1999. Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292 m during cultivation without decompression. *FEMS Microbiol. Letters* 170: 271-279
- Zengler, K., G. Toledo, M. Rappé, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short, and M. Sëller. 2002. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 15681-15686.
- Zhou, J., M. Bruns, and J. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 316-322.