

HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA ESTUDIOS AMBIENTALES DE ACTIVIDADES AGROINDUSTRIALES

MOLECULAR TOOLS FOR ENVIRONMENTAL STUDIES OF AGROINDUSTRIAL ACTIVITIES

Gómez-Merino, F.C.^{1*}; Trejo-Téllez, L.I.²; Velasco-Velasco, J.¹; Lara-Capistrán, L.³

¹Colegio de Postgraduados *Campus* Córdoba. Carretera Córdoba-Veracruz km 348, Congregación Manuel León, municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94946. ²Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, municipio de Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56230. ³Facultad de Ciencias Agrícolas-Xalapa. Universidad Veracruzana. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, Xalapa, Veracruz, México. C.P. 91090.

***Autor responsable:** fernandg@colpos.mx

RESUMEN

La actividad agroindustrial aporta importantes bienes primarios que contribuyen a dinamizar la economía del campo y, a su vez, a partir de ésta se genera diversidad de productos secundarios, como subproductos, coproductos, derivados y residuos que cuando no son aprovechados debidamente, ocasionan contaminación ambiental. En esta revisión se abordan algunas de las herramientas moleculares y el potencial de las ciencias ómicas para contribuir al aprovechamiento sustentable de estos bienes, en parte a través de su transformación por medio de la biorremediación, proceso biológico por medio del cual se remueven o transforman compuestos contaminantes del ambiente.

Palabras clave: Metagenómica, contaminación ambiental, biorremediación.

ABSTRACT

Agroindustrial activities provide important primary goods that contribute to make the economy of the countryside more dynamic and, in turn, a diversity of secondary products are generated from them, such as derivatives, coproducts, byproducts, and residues, which cause environmental contamination when they are not exploited adequately. In this revision, some of the molecular tools and the potential of omics sciences to contribute to the sustainable exploitation of these goods are addressed, in part by their transformation through bioremediation, biological process by which contaminant compounds are removed or transformed from the environment.

Keywords: Metagenomics, environmental contamination, bioremediation.

INTRODUCCIÓN

Diversas actividades agroindustriales generan contaminación ambiental y en años recientes los microorganismos han cobrado importancia como agentes útiles en la biorremediación (Cheung y Gu, 2007). Se trate de microorganismos, plantas o animales, cada ser vivo puede participar en procesos de biodegradación a través de la síntesis y activación de enzimas catabólicas (Kumar *et al.*, 2011). De éstos, sobresalen los microorganismos como mejores candidatos debido a su capacidad para resistir y degradar altos niveles de contaminantes en tiempos cortos. Los recientes avances en las ciencias genómicas están permitiendo mayor comprensión de los procesos de adaptación de los microorganismos a ambientes contaminados (Adetutu *et al.*, 2015; Bosse *et al.*, 2015). En parte, la disponibilidad de bases de datos de las secuencias de genomas completos facilita esta tarea. Además, la revolución de la tecnología de secuenciación continúa creciendo y está influyendo en todos los aspectos de las ciencias de la vida. Los adelantos en análisis metagenómicos independientes de medios de cultivo artificiales han hecho posible la construcción de modelos ambientales relacionados con la biodegradación, con lo que se han caracterizado nuevos procesos de biorremediación y diseñado biosensores para detectar la presencia de contaminantes en el ambiente (Bouchet-Spinelli *et al.*, 2013). Los enfoques genómicos resultan cruciales para proveer información que permita identificar moléculas clave que controlan las interacciones entre especies, sus patrones metabólicos y la función de enzimas específicas involucradas en procesos de degradación particulares en el ambiente contaminados por la actividad agroindustrial.

Biodiversidad microbiana y ciencias genómicas

El análisis de la diversidad microbiana y el estudio de su dinámica en diversas condiciones ambientales facilita la identificación de organismos clave que dominan un ambiente agroindustrial específico. Las técnicas clásicas para estudiar la diversidad microbiana y las dinámicas poblacionales incluyen la medición de biomarcadores lipídicos, en específico los ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA). Desde hace algunos años es posible determinar la huella genética microbiana a través del análisis de la amplificación de los genes ribosomales que codifican para la subunidad 16S (*DNAr 16S*), en combinación con marcadores lipídicos. Los análisis en electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) y con gradiente térmico temporal (TTGE) y polimorfismo de conformación de hebra sencilla (SSCP) resultan ser más sensibles y menos costosos en comparación con los análisis de PLFA y *DNAr 16S*. A través de estos métodos es posible determinar índices de selección (Murayama *et al.*, 2003). El uso de la técnica SSCP acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-SSCP) se usa también para analizar las dinámicas poblacionales de microbios involucrados en procesos de biodegradación en respuesta a oscilaciones del pH, disponibilidad de oxígeno y agua, entre otros factores (Dabert *et al.*, 2001; Parks y Beiko, 2012; Su *et al.*, 2012). Para lograr mayor profundidad en los estudios de este tipo, se usan actualmente microarreglos con pruebas microbianas *in situ*, los cuales incluyen análisis de genes funcionales, RNAm para medir expresión génica y detección directa de genes *DNAr 16S* a partir de pruebas ambientales (Stenuit *et al.*, 2008). Además, la Universidad Estatal de

Michigan (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) genera arreglos específicos útiles en el análisis de comunidades microbianas involucradas en la reducción y re-oxidación de desechos aromáticos (Brodie *et al.*, 2006), aunque todavía presentan algunas desventajas como su alto costo, baja reproducibilidad y necesidad de validación (Midgley *et al.*, 2012). Actualmente, a través de técnicas que omiten el uso de medios artificiales para estudios microbiológicos, es posible analizar la composición microbiana de ciertos ambientes, en especial cuando se trata de microorganismos que no se pueden cultivar *ex situ*. Una revisión reciente publicada por Rincón-Florez *et al.* (2013) describe tres grupos de técnicas para el análisis de biomasa, diversidad y actividad catabólica de comunidades microbianas que no usan medios de cultivo: las basadas en PCR (ocho técnicas: DDGE/TGGE, T-RFLP, SSCP, ARISA/RISA, LH-PCR, RAPD, ARDRA y Q-PCR), las no basadas en PCR (seis técnicas: CFE, PLFA, PDA, SIP, Arreglos de DNA y FISH) y las de secuenciación de alto rendimiento (seis tecnologías: 454, Illumina, SOLiD, PGM, HeliScope y SMRT). En el análisis de muestras ambientales y con el surgimiento de metagenómica, se han desarrollado otras ciencias ómicas a la par, como la metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica (Figura 1), que apoyan los estudios sobre diversidad de microorganismos, funciones y potencialidades en los procesos de biorremediación.

Genómica funcional para bioremediación e Ingeniería de proteínas

La biorremediación se refiere al proceso biológico por medio del

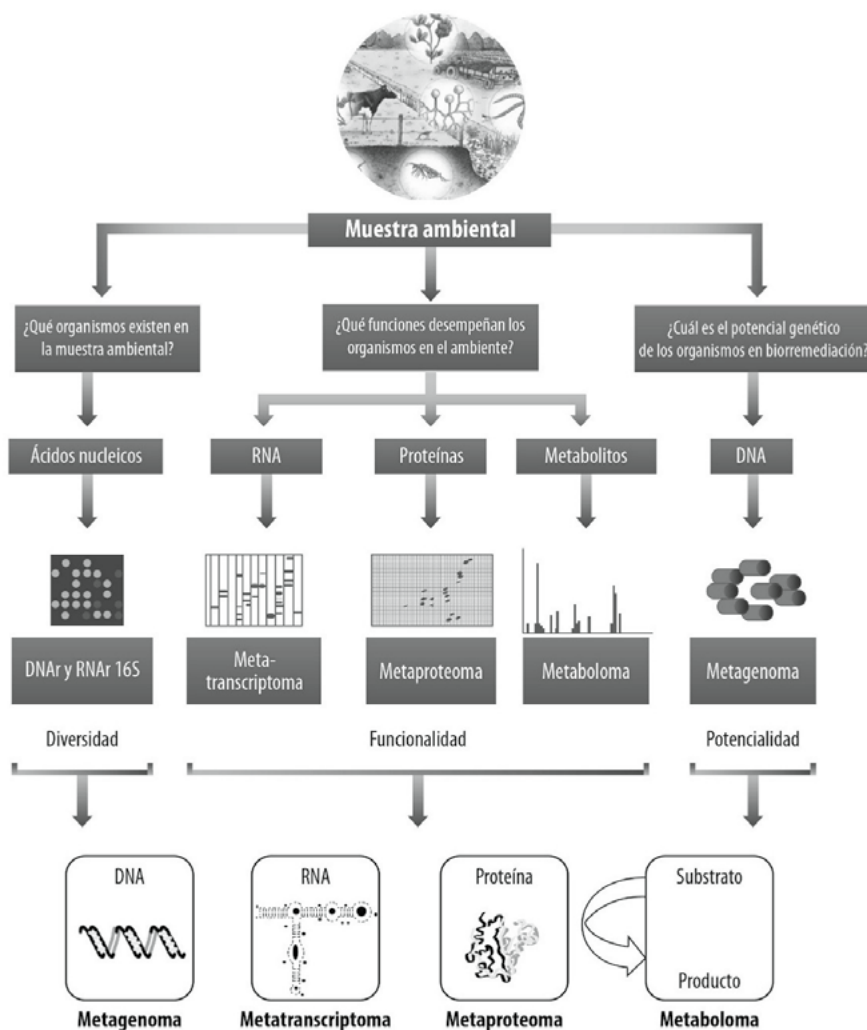


Figura 1. Importancia de las ciencias ómicas en el estudio de muestras derivadas de la actividad agroindustrial para identificar microorganismos de importancia ambiental.

cual se remueven o transforman compuestos contaminantes del ambiente. Esta aplicación puede ser facilitada por enfoques de genómica funcional, y que ofrece una visión interdisciplinaria que permite analizar la complejidad, e involucra ingeniería de proteínas, transcriptómica, ingeniería metabólica, proteómica y metagenómica (Rajesh *et al.*, 2012). La ingeniería de proteínas contempla la alteración del orden o el número de aminoácidos, así como cambios estructurales en funciones primarias y en mecanismos de reacción. Enzimas como tolueno orto-monooxigenasa, organofósforo hidrolasa, diversas dio-

xigenasas y monooxigenasas, bifenil dioxigenasa, citocromo P450 y haloalcano dehalogenasa han sido modificadas para cumplir funciones en biorremediación (Rajesh *et al.*, 2012).

Transcriptómica e Ingeniería metabólica

El análisis de la expresión génica de genomas completos implica medir y sistematizar los perfiles de expresión de genes involucrados en la regulación de respuestas fisiológicas en relación con ciertas condiciones de estrés, como la presencia de contaminantes ambientales (Gomas y Tagore, 2008). Un número cre-

ciente de estudios reporta nuevos mecanismos de regulación de la expresión génica en microorganismos presentes en ambientes contaminados (Gunasekera *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014), lo que está impulsando el desarrollo de innovaciones en biorremediación de ambientes agroindustriales contaminados. La ingeniería metabólica permite modificar rutas biosintéticas en células o cepas microbianas para incluir caracteres deseables relacionados con una función determinada. Con propósitos de biorremediación, las células microbianas son manipuladas para resistir condiciones de estrés y, en ciertos casos, para degradar compuestos introducidos (Villas-Bôas y Bruheim, 2007). En *Clostridium acetobutylicum* la sobre expresión de una proteína de choque térmico (HSP) incrementó la tolerancia a solventes orgánicos (Tomas *et al.*, 2003). Bosma *et al.* (2002) modificaron una cepa de *Agrobacterium radiobacter* con una haloalcano dehalogenasa capaz de utilizar el 1,2,3-tricloro-propano (TCP), que permitió que las cepas modificadas genéticamente estén siendo usadas en procesos de biorremediación a escala industrial. Singh *et al.* (2005) sobre expresaron las enzimas isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en *Pseudomonas fluorescens* y demostraron que esta modificación permitió a la bacteria sobrevivir en medios que contenían altos niveles de aluminio.

Microarreglos y Proteómica

Los microarreglos constituyen una potente herramienta para estudios taxonómicos y funcionales de comunidades microbianas. A nivel comercial o semicomercial para propósitos de biorremediación se dispone de PhyloChip, GeoChip,

PhychoChip, CatabolicChip y una combinación de GeoChip y PhyloChip. Los PhyloChips se emplean para la detección de bacterias y arqueas, y ofrecen ventajas sobre técnicas convencionales, como DGGE, SSCP, RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) y RADP (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) (Park *et al.*, 2010; Pathak y Gärtner, 2010; Yergeau *et al.*, 2009). Los estudios proteómicos se enfocan en la caracterización de la expresión global de las proteínas de un organismo. Dos de las metodologías más usadas son los geles de doble dimensión (2-D) de alta resolución y electronebulización acoplada a espectrofotometría de masas (ES-MS). En *Acinetobacter* sp., Kim *et al.* (2003) probaron que las enzimas catecol 1,2-dioxigenasa y ceto adipato succinil-CoA transferasa participan en la degradación de benzoato. En *Delftia acidovorans* MC1 tratada con ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico y sus derivados 2,4-diclorofenol y 3,5-diclorocatecol, Tomas-Gallardo *et al.* (2006) mostraron la activación de dos enzimas clorocatecol 1,2-dioxigenasa y se identificaron nuevas rutas de degradación de hidrocarburos. En diferentes especies de *Pseudomonas* Migula, se encontraron enzimas que responden al estrés oxidativo, metabolismo energético, biosíntesis de ácidos grasos, regulación transcripcional y transporte de pequeñas moléculas (Zhao *et al.*, 2004). Feng *et al.* (2006) identificaron varias proteínas involucradas en la asimilación de gentisato y 3-hidroxibenzoato en cepas de *Corynebacterium glutamicum*, vía una nueva ruta del gentisato independiente de glutatión (GHS); y Kim *et al.* (2004) identificaron 27 enzimas involucradas en la degradación del pireno en *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Otros autores como Chourey *et al.* (2013) identificaron grupos de Betaproteobacteria (*i.e.* *Dechloromonas*, *Ralstonia*, *Rhodofera*, *Polaromonas*, *Delftia*, *Chromobacterium*) y Firmicutes en ambientes contaminados con uranio y nitrato, así como enzimas que participan en la asimilación de amonio y formación de polihidroxibutirato, pero no en la reducción de uranio, por lo menos en fases tempranas. Recientemente, Becher *et al.* (2013) analizan los retos y perspectivas de las investigaciones en metaproteómica del suelo.

Herramientas genómicas de alto rendimiento y Metagenómica

Las herramientas genómicas de alto rendimiento arrojan información valiosa a partir de muestras tomadas directamente del ambiente, sin pasar por el cultivo en medios artificiales en laboratorios. Aunque actualmente enfrentan algunas limitantes, como la necesidad de

contar con equipos sofisticados y personal capacitado, su utilidad práctica está creciendo (Stenuit *et al.*, 2008). El término metagenómica literalmente significa "más allá del genoma" y, en términos técnicos, el metagenoma se refiere al total de DNA de una muestra ambiental. Se calcula que entre 80% y 90% de los microorganismos que habitan el suelo son desconocidos por la comunidad científica, debido a que no se les puede cultivar (Hernández-León *et al.*, 2010). En ambientes orgánicos, como suelos y océanos, la cantidad de grupos taxonómicos es miles de veces mayor que en los no orgánicos, debido a la abundancia de fuentes de carbono (Venter *et al.*, 2004). Tyson *et al.* (2004) estudiaron el metagenoma de un ambiente extremo (agua con poco oxígeno y temperatura de 42 °C, pH entre 0 y 1, y altos niveles de Fe, Zn, Cu y As) y secuenciaron los genomas completos de organismos quimiolitótrofos de los géneros *Leptospirillum* y *Ferroplasma*. Parales y Ditty (2005) y Zylstra y Kukor (2005) desarrollaron biosensores para detectar la presencia de contaminantes. Por medio de herramientas de metagenómica funcional se han podido identificar genes, como *nirS*, *nirK*, *dsrAB*, *amoA*, y *pmoA*, involucrados en procesos de desnitrificación, reducción del azufre, nitrificación y oxidación de metano (Rajesh *et al.*, 2012). Sunagawa *et al.* (2013) usaron datos obtenidos de un proyecto de secuenciación masiva para cuantificar organismos conocidos y desconocidos a nivel de especie.

Limitantes de las ciencias genómicas en el estudio de la biorremediación

En su mayoría, las técnicas disponibles actualmente para el estudio del potencial microbiano en procesos de biorremediación y manejo de residuos agroindustriales requieren ser optimizadas y enfrentan algunas limitantes (Rajendhran y Gunasekaran, 2008). Una primera restricción de estas metodologías es la complejidad de la muestra y las propias sustancias contaminantes presentes (Rajesh *et al.*, 2012; Dua *et al.*, 2002). Otra restricción es el desconocimiento de la diversidad local y global de las comunidades y poblaciones microbianas con capacidad biodegradativa. Los análisis funcionales de bibliotecas de genomas ambientales se abocan a identificar genes de resistencia a contaminantes, en lugar de hacerlo hacia aquellos involucrados en los procesos catabólicos biodegradativos (Mirete *et al.*, 2007; Guazzaroni *et al.*, 2013). El análisis basado en microarreglos es solo cualitativo, pues únicamente detecta la presencia o ausencia de un grupo microbiano en particular, y no es capaz de proveer información cuantitativa de la población que

interviene en procesos de biorremediación de manera eficiente. Otras metodologías, como las nanopartículas de oro, puntos cuánticos y partículas magnéticas, se están introduciendo al mercado y ofrecen estrategias prometedoras para el análisis *in situ* de las comunidades microbianas, aunque a la fecha ninguna de ellas se ha optimizado para hacer mediciones específicas directas en el ambiente. Estos aspectos representan desafíos mayores para las ciencias genómicas que tendrán que ser abordados bajo enfoques interdisciplinarios en un futuro.

CONCLUSIONES

Los microorganismos constituyen elementos cruciales que impulsan el tratamiento biológico de ambientes contaminados por la actividad agroindustrial, dada su capacidad de inmovilizar o transformar contaminantes. Para asegurar la efectividad de estos enfoques se requiere llevar a cabo mediciones periódicas de indicadores físicoquímicos, así como entender a profundidad las funciones de las comunidades microbianas con capacidades de remediación, incluyendo las relaciones entre su estructura (composición de especies) y su función (propiedades catabólicas). Las herramientas genómicas tienen un enorme potencial de expandir las aplicaciones de las propiedades degradativas y catalíticas de los microorganismos en estrategias de biorremediación ambiental. Con los adelantos científicos actuales es posible diseñar estrategias para obtener tecnologías combinadas que permitan abatir los niveles de diversos contaminantes de un sitio en particular. A pesar de que en su mayoría son de alto costo, las herramientas genómicas actuales representan elementos determinantes

que pueden impulsar el desarrollo de tecnologías innovadoras para la biorremediación. Uno de los grandes desafíos que se ve venir es la cantidad de datos generados a través de los proyectos metagenómicos. Los depósitos de secuencias de microorganismos crecen año con año y la plataforma Integrated Microbial Genomes (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/edu/main.cgi>) reportó más de 22 millones de genes y 10,165 genomas secuenciados hacia mediados de 2014. Esta tendencia irá creciendo de manera exponencial, a medida que se mejoren las tecnologías de secuenciación. En paralelo, hay un creciente interés en realizar análisis a mayor profundidad y, recientemente, Edwards *et al.* (2013) demostraron que las nuevas generaciones de científicos de la vida pueden ser capaces de desarrollar estrategias para generar y aprovechar la información en la nueva era de la secuenciación y las ciencias genómicas. El éxito de los proyectos de biorremediación incluye comunidades microbianas que mantienen complejas interacciones, por lo que será necesario acoplar las técnicas genómicas a otras herramientas meta-ómicas, como la metatranscriptómica, metaproteómica, metabolómica y metaionómica, entre otras. Si bien algunas de estas nuevas disciplinas se encuentran en desarrollo, todas ellas tienen el potencial de generar información sin precedentes sobre la naturaleza, la regulación y evolución de rutas catabólicas en comunidades microbianas que prosperan en ambientes contaminados. Esta información constituye el primer paso para implementar estrategias efectivas de biorremediación en sitios contaminados y, por tanto, se perfilan como pilares sólidos en años venideros y se vislumbra una creciente necesidad por científicos con capacidad de analizar, interpretar y aplicar estos conocimientos bajo enfoques de innovación biotecnológica.

AGRADECIMIENTOS

A la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento 1: Eficiencia y Sustentabilidad en la Producción Primaria de Sistemas Agroalimentarios del programa de postgrado en Innovación Agroalimentaria Sustentable del Colegio de Postgraduados.

LITERATURA CITADA

- Adetutu E.M., Gundry T.D., Patil S.S., Golneshin A., Adigun J., Bhaskarla V., Aleer S., Shahsavari E., Ross E., Ball A.S. 2015. Exploiting the intrinsic microbial degradative potential for field-based *in situ* dechlorination of trichloroethene contaminated groundwater. *Journal of Hazard Materials* 300: 48-57.
- Becher D., Bernhardt J., Fuchs S., Riede K. 2013. Metaproteomics to unravel major microbial players in leaf litter and soil environments: Challenges and perspectives. *Proteomics* 18-19: 2895-2909.
- Bosma T., Damborsky J., Stucki G., Janssen D.B. 2002. Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3582-3587.
- Bosse M., Heuwieser A., Heinzel A., Nancucheo I., Melo Barbosa Dall'Agnol H., Lukas A., Tzotzos G., Mayer B. 2015. Interaction networks for identifying coupled molecular processes in microbial communities. *BioData Mining* 8: 21.
- Bouchet-Spinelli A., Reuillard B., Coche-Guérente L., Armand S., Labbé P., Fort S. 2013. Oligosaccharide biosensor for direct monitoring of enzymatic activities using QCM-D. *Biosensors and Bioelectronics* 49: 290-296.
- Brodie E.L., DeSantis T.Z., Joyner D.C., Baek S.M.J., Larsen T., Andersen G.L., Hazen T.C., Richardson P.M., Herman D.J., Tokunaga T.K., Wan J.M., Firestone M.K. 2006. Bacterial population dynamics during uranium reduction and re-oxidation: Application of a novel high density oligonucleotide microarray approach. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6288-6298.

- Cheung K.H., Gu J.D. 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59: 8-15.
- Chourey K., Nissen S., Vishnivetskaya T., Shah M., Pfiffner S., Hettich R. L., Löffler F.E. 2013. Environmental proteomics reveals early microbial community responses to biostimulation at a uranium- and nitrate-contaminated site. *Proteomics* 13: 2921-2930.
- Dabert P., Sialve B., Delgenes J.P., Moletta R., Godon J.J. 2001. Characterization of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of the transition to nitrate respiration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 500-509.
- Dua M., Singh A., Sethunathan N., Johri A.K. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 143-152.
- Edwards R.A., Haggerty J.M., Cassman N., Busch J.C., Aguinaldo K., Chinta S., Vaughn M.H., Morey R., Harkins T.T., Teiling C., Fredrikson K., Dinsdale E.A. 2013. Microbes, metagenomes and marine mammals: enabling the next generation of scientist to enter the genomic era. *BMC Genomics* 14: 600.
- Feng J., Che Y., Milse J., Yin Y. J., Liu L., Rückert C., Shen X.H., Qi S.W., Kalinowski J., Liu S.J. 2006. The gene *ncgl2918* encodes a novel maleylpyruvate isomerase that needs mycothiol as cofactor and links mycothiol biosynthesis and gentisate assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 10778-10785.
- Gomase V.S., Tagore S. 2008. Transcriptomics. *Current Drug Metabolism* 9: 245-249.
- Guazzaroni M.E., Morgante V., Mirete S., González-Pastor J.E. 2013. Novel acid resistance genes from the metagenome of the Tinto River, an extremely acidic environment. *Environmental Microbiology* 15: 1088-1102.
- Gunasekera T.S., Striebich R.C., Mueller S.S., Strobel E.M., Ruiz O.N. 2013. Transcriptional profiling suggests that multiple metabolic adaptations are required for effective proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* in jet fuel. *Environmental Science and Technology* 47: 13449-13458.
- Hernández-León R., Velázquez-Sepúlveda I., Orozco-Mosqueda M.C., Santoyo G. 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *φYTON*, 79: 133-139.
- Kim S.I., Song S.Y., Kim K.W., Ho E.M., Oh K.H. 2003. Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter* sp. KS-1. *Research in Microbiology* 154: 697-703.
- Kim S.J., Jones R.C., Cha C.J., Kweon O., Edmondson R.D., Cerniglia C.E. 2004. Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and de novo sequencing methods. *Proteomics* 4: 3899-3908.
- Kumar A., Bisht B.S., Joshi V.D., Dhewa T. 2011. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. *International Journal of Environmental Sciences* 6: 1079-1093.
- Murayama H., Takase Y., Mitobe H., Mukai H., Ohzeki T., Shimizu K., Kitayama Y. 2003. Seasonal change of persistent organic pollutant concentrations in air at Niigata area, Japan. *Chemosphere* 52: 683-694.
- Midgley D.J., Greenfield P., Shaw J.M., Oytam Y., Li D., Kerr C.A., Hendry P. 2012. Reanalysis and simulation suggest a phylogenetic microarray does not accurately profile microbial communities. *PLoS One* 7(3): e33875.
- Mirete S., Figueras C.G., González-Pastor J.E. 2007. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6001-6011.
- Parales R.E., Ditty J.L. 2005. Laboratory evolution of catabolic enzymes and pathways. *Current Opinion in Biotechnology* 16(3): 315-325.
- Park S.J., Chae J.C., Rhee S.K. 2010. Applications of DNA microarray for screening metagenome library clones. *In: Streit W. R., Daniel R. (eds.), Metagenomics, Methods and protocols, Methods in Molecular Biology* vol. 668, Springer pp. 313-324.
- Parks D.H., Beiko R.G. 2012. Measuring community similarity with phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution* 29: 3947-3958.
- Pathak G.P., Gärtner W. 2010. Detection and Isolation of Selected Genes of Interest from Metagenomic Libraries by a DNA Microarray Approach. *In: Streit W. R., Daniel R. (eds.), Metagenomics, Methods and protocols, Methods in Molecular Biology* vol. 668, Springer, pp. 299-312.
- Rajendhran J., Gunasekaran P. 2008. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnology Advances* 26: 576-590.
- Rajesh T., Rajendhran J., Gunasekaran P. 2012. Genomic technologies in environmental bioremediation. *In: T. Satyanarayana, B. N. Johri, A. Prakash (eds), Microorganisms in environmental management: Microbes and Environment*, Springer, Heidelberg Germany, 819 p.
- Rincón-Florez V.A., Carvalhais L.C., Schenk P.M. 2013. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. *Diversity* 5: 581-612.
- Silva C.C., Hayden H., Sawbridge T., Mele P., De Paula S.O., Silva L.C., Vidigal P.M., Vicentini R., Sousa M.P., Torres A.P., Santiago V.M., Oliveira V.M. 2013. Identification of genes and pathways related to phenol degradation in metagenomic libraries from petroleum refinery wastewater. *PLoS One* 18: 8(4): e61811.
- Singh R., Beriault R., Middaugh J., Hamel R., Chenier D., Appanna V. D., Kalyuzhnyi S. 2005. Aluminum-tolerant *Pseudomonas fluorescens*: ROS toxicity and enhanced NADPH production. *Extremophiles* 9: 367-373.
- Stenuit B., Evers L., Schuler L., Agathos S.N., George I. 2008. Emerging high-throughput approaches to analyze bioremediation of sites contaminated with hazardous and/or recalcitrant wastes. *Biotechnology Advances* 26: 561-575.
- Su X., Xu J., Ning K. 2012. Meta-Storms: efficient search for similar microbial communities based on a novel indexing scheme and similarity score for metagenomic data. *Bioinformatics* 28: 2493-2501.
- Sunagawa S., Mende D.R., Zeller G., Izquierdo-Carrasco F., Berger S.A., Kultima J.R., Coelho L.P., Arumugam M., Tap J., Nielsen H.B., Rasmussen S., Brunak S., Pedersen O., Guarner F., de Vos W. M., Wang J., Li J., Doré J., Ehrlich S.D., Stamatakis A., Bork P. 2013. Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nature Methods* 10: 1196-1199.
- Tomas C.A., Welker N.E., Papoutsakis E.T. 2003. Overexpression of *groES1* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased

- solvent production and tolerance, prolonged metabolism and changes in the cell's transcriptional program. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4951-4965.
- Tomas-Gallardo L., Canosa I., Santero E., Camafeita E., Calvo E., López J.A., Floriano B. 2006. Proteomic and transcriptional characterization of aromatic degradation pathways in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Proteomics* 6: S119-S132.
- Tyson G.W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E.E., Ram R.J., Richardson P.M., Solovyev V.V., Rubin E.M., Rokhsar D.S., Banfield J.F. 2004. Community structure. *Nature* 428: 37-43.
- Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., Fouts D.E., Levy S., Knap A.H., Lomas M.W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y.H., Smith H.O. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
- Villas-Bóas S.G., Bruheim P. 2007. The potential of metabolomics tools for bioremediation studies. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 11: 305-313.
- Wu G., Chen D., Tang H., Ren Y., Chen Q., Lv Y., Zhang Z., Zhao Y. L., Yao Y., Xu P. 2014. Structural insights into the specific recognition of N-heterocycle biodegradation-derived substrates by microbial amide hydrolases. *Molecular Microbiology* 91(5): 1009-1021.
- Yergeau E., Arbour M., Brousseau R., Juck D., Lawrence J. R., Masson L., Whyte L. G., Greer C. G. 2009. Microarray and real-time PCR analyses of the responses of high-arctic soil bacteria to hydrocarbon pollution and bioremediation treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6258-6267.
- Zhao B., Yeo C.C., Lee C.C., Geng A.L., Chew F.T., Poh C.L. 2004. Proteome analysis of gentisate-induced response in *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867. *Proteomics* 4: 2028-2036.
- Zylstra G.J., Kukor J.J. 2005. What is environmental biotechnology? *Current Opinion in Biotechnology* 16: 243-245.

