

Secuenciación de regiones hipervariables V3 y V6 de microorganismos presentes en un biodigestor de nopal*

Sequencing of V3 and V6 hypervariable regions of microorganisms in a digester of nopal

Luis Antonio Díaz García[§]

Campo Experimental Pabellón-INIFAP. Carretera Aguascalientes-Zacatecas, km. 32.5. 20660. Pabellón de Arteaga, Aguascalientes. ²University of Wisconsin-Madison-Department of Horticulture. 1575 Linden Dr. 53706. Madison, Wisconsin, USA. [§]Autor para correspondencia: diaz.antonio@inifap.gob.mx.

Resumen

El desarrollo de estrategias limpias, eficientes y de bajo costo para la generación de energía, es uno de los retos actuales más importantes para la sociedad. La metanogénesis, un conjunto de procesos metabólicos llevado a cabo por arqueas en la etapa final, es aprovechada en biodigestores para la generación de gas metano. El control de los microorganismos presentes en un biodigestor es determinante en la eficiencia de producción de metano; así mismo, sienta las bases para modificar, mediante ingeniería metabólica, los microorganismos metanogénicos y mejorar su eficiencia. En el presente trabajo se identificaron los microorganismos presentes en una muestra procedente de un biodigestor de nopal. Para identificar la mayor cantidad de microorganismos posible, se realizó un análisis metagenómico para determinar dos secuencias hipervariables de genes ribosomales 16 s. Los iniciadores utilizados permitieron identificar únicamente microorganismos del dominio de las procariontes; no se identificaron arqueas. El grupo de organismos con mayor representación fue el filum *Firmicutes*, un importante grupo de bacterias cuya función es la degradación de materia verde para la producción de dióxido de carbono.

Palabras clave: gen 16 s, metagenómica, metano.

Abstract

The development of clean, efficient and low cost power generation strategies is one of the most important current challenges for society. The methanogenesis, a set of metabolic processes carried out by archaea in the final stage, is used in biodigesters to generate methane gas. Control of microorganisms in a digester is decisive in the efficiency of methane production; it also lays the foundation for change, by metabolic engineering, methanogenic microorganisms and improve efficiency. In this paper we identified the microorganisms present in a sample from a digester of nopal. To identify as many microorganisms as possible a metagenomic analysis was performed to determine two hypervariable sequences of ribosomal genes 16 s. The primers used allowed only identify organisms domain of prokaryotes; archaea they not identified. The group of organisms was the most represented phylum *Firmicutes*, an important group of bacteria whose function is the degradation of green material for the production of carbon dioxide.

Keywords: gen 16 s, metagenomics, methane.

* Recibido: enero de 2016
Aceptado: abril de 2016

Introducción

En la actualidad, la mayor parte de la energía se obtiene mediante la combustión de combustibles fósiles (Mortimer, 1991). Los combustibles fósiles se han vuelto escasos, su explotación es más costosa, no son renovables y contaminan el ambiente. Debido a esto se ha optado por el desarrollo de alternativas para la generación de energía (Demirbas, 2005). La producción de biogás es un proceso natural que ocurre en forma espontánea en un entorno anaeróbico. Dicho proceso lo realizan microorganismos como parte del ciclo biológico de la materia orgánica, el cual involucra la fermentación o digestión de materiales orgánicos para obtener el biogás (Demirel *et al.*, 2008).

Los biodigestores son sistemas diseñados para optimizar la producción de biogás a partir de desechos agrícolas, estiércol o efluentes industriales, los cuales permiten así la obtención de energía limpia y de bajo costo a partir de una fuente renovable (Demirel *et al.*, 2008). El rendimiento de un biodigestor está ligado principalmente a la estructura de la comunidad microbiana presente en el mismo (Demirel y Scherer, 2008). Por lo anterior, es de gran interés analizar la estructura y dinámica poblacional de estas comunidades microbianas.

El proceso bioquímico para la producción anaeróbica de metano es muy complejo. La diversidad y abundancia de microorganismos involucrados en el proceso juegan el papel más importante del proceso. A su vez, estos factores están influenciados por el tipo de materiales fermentables, las variaciones climáticas, el diseño de los reactores, entre otros. Los pasos iniciales del proceso de producción anaeróbica de metano comienzan con la reducción, mediada por bacterias hidrolíticas *Firmicutes*, de macromoléculas como proteínas, grasas complejas y carbohidratos, a sus intermediarios básicos, como aminoácidos, cadenas de ácidos grasos y monoazúcares. Posteriormente, otras bacterias (como acidógenas y acetógenas) continúan el proceso de reducción a otros componentes más básicos como acetato, dióxido de carbono e hidrógeno. Después, los microorganismos metanógenos (del dominio de las Arqueas) convierten los componentes producidos por las bacterias en metano a través de las rutas metabólicas acetoclástica e hidrogenotrófica (Thauer *et al.*, 1993).

El entendimiento de la composición, la estructura y la dinámica de las comunidades microbianas presentes en reactores para la generación de biogás, es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias de fermentación y para el

Introduction

Currently, most of the energy is obtained by combustion of fossil fuels (Mortimer, 1991). Fossil fuels have become scarce, their exploitation is more expensive, and they are not renewable and pollute the environment. Because this has been chosen for the development of alternative energy generation (Demirbas, 2005). The Biogas production is a natural process that occurs spontaneously in an anaerobic environment. This process is carried out by microorganisms as part of the biological cycle of organic matter, which involves fermentation or digestion of organic materials for biogas (Demirel *et al.*, 2008).

The Biodigesters are systems designed to optimize the production of biogas from agricultural waste, manure or industrial effluents, which thus allow the production of clean energy and low-cost from a renewable source (Demirel *et al.*, 2008). The performance of a digester is mainly linked to the structure of the microbial community present in it (Demirel and Scherer, 2008). Therefore, it is of great interest to analyze the structure and population dynamics of these microbial communities.

The biochemical process for anaerobic methane production is very complex. The diversity and abundance of microorganisms involved in the process play the most important role in the process. In turn, these factors are influenced by the type of fermentable materials, climatic variations, and the reactor design, among others. The initial steps of the process of anaerobic methane production starts with the reduction, by hydrolytic bacteria *Firmicutes* mediated, macromolecules such as proteins, complex carbohydrates and fats, their basic intermediates such as amino acids, fatty chains monosugars acids. Subsequently, other bacteria (as acidogenas and acetogenas) continue the reduction process to more basic components as acetate, carbon dioxide and hydrogen. Then methanogens microorganisms (domain Archaea) convert components produced by bacteria in methane through metabolic pathways acetoclastic and hydrogenotrofica (Thauer *et al.*, 1993).

The understanding of the composition, structure and dynamics of microbial communities present in reactors for the generation of biogas, is crucial for the development of new strategies fermentation and for the design of bioreactors to increase the yield of methane production. A metagenomic

diseño de bioreactores que incrementen el rendimiento de la producción de metano. Un estudio metagenómico puede enfocarse en la secuenciación total (Hess *et al.*, 2001) o parcial (Logares *et al.*, 2013) de todos los genomas presentes, o sólo en conocer la diversidad, en cualquiera de los niveles taxonómicos, de una comunidad microbiana.

El conocimiento de la diversidad microbiana es un buen primer ensayo en el proceso de caracterizar una estructura microbiana. Para ello existen diversas estrategias, una de las más comunes utiliza genes con una alta tasa de aparición de mutaciones, lo que permite que dos especies genéticamente relacionadas difieran en dicho gen. Los genes más comunes en el dominio de las arqueas y bacterias son el gen que codifica la subunidad 16 s de la ARN polimerasa, y para el caso de los eucariontes, los espaciadores intergénicos tales como ITS1 y ITS2. El gen 16 s, posee nueve regiones internas que presentan mayor variación nucleotídica con respecto al resto de otras regiones. Dichas regiones hipervariables varían en longitud desde las 100 pb hasta las 1000pb (Whiteley *et al.*, 2012).

Con el desarrollo de la secuenciación masiva de ADN, ha sido posible identificar las comunidades microbianas presentes en bioreactores para la generación de metano. Aunque se conoce a detalle que los dos grupos básicos de microorganismos que se encuentran en las plantas fermentadoras son bacterias (que descomponen estructuras complejas) y arqueas (que producen metano), los estudios realizados hasta el momento señalan diferencias importantes en los órdenes, familias, géneros y especies específicos en función del material vegetal utilizado.

Schlüter *et al.* (2008) analizaron el metagenoma, mediante tecnología 454, de un bioreactor alimentado con ensilado de maíz, centeno y pollinaza. Una porción significativa de las secuencias obtenidas correspondió con la arquea *Methanoculleus marisnigri*; asimismo, se encontraron numerosas secuencias de genomas bacterianos de la clase Clostridia, los cuales se caracterizan por participar en el proceso de hidrólisis del sustrato. Por otro lado, Kröber *et al.* (2009) encontró una sobrerrepresentación de secuencias pertenecientes a la arquea *Methanoculleus bourgensis*, así como diversos órdenes del filum *Firmicutes* (en el que se encuentran los clostridiales).

Li *et al.* (2013) obtuvieron el metagenoma de una planta de generación de metano basada en gallinaza, estiércol de cerdo y diversos lodos. Similar a los estudios descritos anteriormente, Li *et al.* (2013) encontraron una

study may focus on the full sequencing (Hess *et al.*, 2001) or partial (Logares *et al.*, 2013) of all genomes present, or only know the diversity in any taxonomic levels, a community microbial.

Knowledge of microbial diversity is a good first test in the process of characterizing a microbial structure. For this there are several strategies, one of the most common uses genes with a high rate of appearance of mutations, which allows two genetically related species differ in that gene. The most common genes in the domain of archaea and bacteria are the gene encoding subunit 16 s RNA polymerase, and in the case of eukaryotes, the intergenic spacers ITS1 and ITS2 like. The gene 16 s, has nine internal regions with higher nucleotide variation relative to the rest from other regions. Said hypervariable regions vary in length from 100 bp to the 1 000 pb (Whiteley *et al.*, 2012).

With the development of DNA sequencing mass has been possible to identify microbial communities present in bioreactors for methane generation. Although it is known in detail the two basic groups of microorganisms found in the fermenting plants are bacteria (which break down complex structures) and archaea (producing methane), studies so far indicate significant differences in orders, families, genera and species specific depending on the plant material used.

Schlüter *et al.* (2008) analyzed the metagenome, by 454 technology, a bioreactor fed corn silage, rye and chicken manure. A significant portion of the sequences obtained corresponded with bows *Methanoculleus marisnigri*; also numerous bacterial genomes sequences of the Clostridia class, which are characterized by participating in the process of substrate hydrolysis was found. Furthermore, Kröber *et al.* (2009) found overrepresented sequences belonging to the bows *Methanoculleus bourgensis* and *Firmicutes* phylum various commands (which are clostridial).

Li *et al.* (2013) obtained the metagenome of methane generation plant based on manure, pig manure and various sludge. Similar to the studies described above, Li *et al.* (2013) found the clostridial overrepresented (*Firmicutes*), which as mentioned contribute to the degradation of cellulose and proteins. Other important species of bacteria for the decomposition of fats and carbohydrates were Bacilli, Gammaproteobacteria and Bacteroidetes (belonging to the *Firmicutes*, Proteobacteria and Bacteroidetes, respectively). The dominant bacterial species were six

sobrerrepresentación de los clostridiales (*Firmicutes*), que como se mencionó contribuyen a la degradación de celulosas y proteínas. Otras especies importantes de bacterias para la descomposición de grasas y carbohidratos fueron Bacilli, Gammaproteobacteria y Bacteroidetes (pertenecientes a los *Firmicutes*, Proteobacteria, y Bacteroidetes, respectivamente). Las especies bacterianas dominantes fueron de seis géneros: *Clostridium*, *Aminobacterium*, *Psychrobacter*, *Anaerococcus*, *Syntrophomonas*, y *Bacteroides*. Dentro de las arqueas se identificaron los géneros *Methanosarcina*, *Methanosaeta* y *Methanoculleus*. Las especies de arqueas dominantes fueron *Methanosarcina barkeri fusaro*, *Methanoculleus marisnigri* JR1, y *Methanosaeta theromphila*.

En el presente trabajo se identificó, mediante metagenómica, una gran cantidad de microorganismos presentes en una muestra procedente de un biodigestor de nopal.

Materiales y métodos

Características del biodigestor y recolección de muestras

El biodigestor del cual fueron obtenidas las muestras consistió en garrafón de 10 L. Inicialmente se mezclaron en 10 L de agua corriente, 5 kg de nopal verdura y 0.5 kg de estiércol de vaca. La mezcla fue depositada en un contenedor y éste fue sellado. En el contenedor, se instaló una válvula de escape y una bolsa de hule para detectar la generación de gas. El día en que se realizó la mezcla inicial se tomó la primera muestra (T1); se tomaron 50 ml de la mezcla y se colocaron en un frasco copro estéril, posteriormente se selló y se almacenó a -80 °C. Al tercer día (48 horas después), se tomó una segunda muestra (T2), al quinto día (96 horas después) se tomó una tercera (T3), y a los siete días (144 horas después) se tomó una última muestra (T4). En el séptimo día, se detectó la presencia de metano al observar una flama en la válvula del biodigestor al acercar un cerrillo a ésta.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de las cuatro muestras se realizó mediante dos estrategias, fenol-cloroformo, y con un kit comercial (EZ-10 SPIN column genomic DNA mini-preps kit for bacteria, marca Biobasic). La extracción con fenol-cloroformo se realizó de acuerdo a Wilson (1990) con algunas modificaciones. Brevemente, se descongeló la muestra y se colocó 1 ml en un tubo Eppendorf, se centrifugó a 12 000

genera: *Clostridium*, *Aminobacterium*, *Psychrobacter*, *Anaerococcus*, *Syntrophomonas*, and *Bacteroides*. Within archaea genera *Methanosarcina*, *Methanosaeta* and *Methanoculleus* were identified. The dominant archaea were *Methanosarcina barkeri fusaro*, *Methanoculleus marisnigri* JR1, and *Methanosaeta theromphila*.

In this paper identified by metagenomics, a large number of microorganisms present in a sample from a digester of nopal.

Materials and methods

Features digester and sample collection

The digester which were obtained samples consisted of 10 L. Initially carboy were mixed in 10 L of tap water, 5 kg of nopal and 0.5 kg of cow dung. The mixture was placed in a container and this was sealed. In the container, an exhaust valve and rubber bag was installed to detect gas generation. The day the initial mixture was made the first sample (T1) was taken; 50 ml of the mixture were taken and placed in a sterile bottle copro subsequently sealed and stored at -80 °C. On the third day (48 hours), a second sample (T2), the fifth day (96 hours) a third (T3) was taken, and seven days (144 hours) in a final sample was taken was taken (T4). On the seventh day, the presence of methane by observing a flame valve in the digester by bringing a hillock to it was detected.

DNA extraction

The DNA extraction of the four samples was performed by two strategies, phenol-chloroform, and with a commercial kit (EZ-10 genomic DNA SPIN column mini-preps kit for bacteria, Biobasic mark). Extraction with phenol-chloroform was performed according to Wilson (1990) with some modifications. Briefly, sample was thawed and 1 ml was placed in an Eppendorf tube, centrifuged at 12 000 rpm for 10 min and the supernatant precipitate separated. 175 µl de TE 50:20 were added to the sample and vortex. Subsequently, 5 µl of proteinase K (20 mg mL⁻¹) and 20 µl of sodium dodecyl sulfate (SDS) at 10% were added. The sample was mixed slightly and incubated at 56 °C for 2 h. Then 500 µl TE were added 10: 1 and 20 µl NaCl 5M and stirred by inversion. A 500 µl of cold phenol (balanced) were added and continuously stirred for 10 minutes to homogenize. The sample was centrifuged at 12 000 rpm at 4 °C for 5 min and the supernatant was recovered in a new tube.

rpm por 10 min y se separó el sobrenadante del precipitado. Se adicionaron 175 µl de TE 50:20 a la muestra y se agitó en un Vortex. Posteriormente, se agregaron 5 µl de proteinasa K (20 mg mL⁻¹) y 20 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%. La muestra se mezcló levemente y se incubó a 56 °C durante 2 h. Después, se agregaron 500 µl de TE 10:1 y 20 µl de NaCl 5M y se agitó por inversión. Se agregaron 500 µl de fenol frío (equilibrado), y se agitó continuamente por 10 minutos para homogeneizar. La muestra se centrifugó a 12 000 rpm a 4 °C por 5 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo.

Posteriormente, se agregaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó suavemente por inversión, se centrifugó a 1 2000 rpm por 2 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se repitió la extracción en cloroformo-alcohol isoamílico. Se agregaron 500 µl de isopropanol frío y se incubaron las muestras a -20 °C durante toda la noche. Después, se centrifugó la muestra a 1 2000 rpm por 1 minuto a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Finalmente, se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70% frío, se centrifugó a 1 2000 rpm por 1 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de ADN se dejó secar a 65 °C por dos horas y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril. La extracción de ADN mediante el kit se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1.2% y se optó por utilizar únicamente las muestras de ADN extraídas mediante fenol-cloroformo y provenientes del sobrenadante.

Amplificación de regiones hipervariables V3 y V6

La amplificación de las regiones hipervariables V3 y V6 se realizó con ocho pares de iniciadores. Los iniciadores se sintetizaron de acuerdo a los requerimientos del equipo IonTorrent en el que se secuenciaron las muestras. Cada uno de los iniciadores consistió inicialmente en: a) un adaptador con la secuencia CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG (que se une a la nanopera del secuenciador), una secuencia de reconocimiento para control del secuenciador con los nucleótidos GAT, un código de barras de 10 pb, y la región complementaria a la región hipervariable (20 pb para el iniciador forward y 17 para el reverse). Se utilizaron cuatro códigos de barra distintos, uno para cada tiempo muestreado, y dos pares de regiones complementarias, una para la región V3 y otra para la región V6. En el Cuadro 1 se muestran los iniciadores utilizados.

Subsequently, 500 µl of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) were added, stirred gently by inversion, centrifuged at 12 000 rpm for 2 min at 4 °C. The supernatant was recovered in a new tube and the extraction was repeated chloroform-isoamyl alcohol. 500 µl of cold isopropanol were added and samples were incubated at -20 °C overnight. The sample was centrifuged 12 000 rpm for 1 minute at 4 °C and the supernatant decanted. Finally the precipitate with 1 ml of cold 70% ethanol washed, centrifuged at 2 000 rpm for 1 1 min at 4 °C and the supernatant was removed. The DNA precipitate was allowed to dry at 65 °C for two hours and resuspended in 50 µl of sterile distilled water. The DNA extraction was performed using the kit according to the manufacturer's instructions. DNA quality was verified in an agarose gel 1.2% and chose to use only the DNA samples extracted by phenol-chloroform and from the supernatant.

Amplification hypervariable regions V3 and V6

The amplification of V3 and V6 hypervariable regions was performed with eight pairs of primers. The primers were synthesized according to the requirements of IonTorrent computer that samples sequenced. Each of the initiators initially consisted of: a) an adapter with CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG sequence (which binds to nanopera sequencer), a recognition sequence for control sequencer with GAT nucleotides, a bar code 10 bp, and the region complementary to the hypervariable region (20 bp for the forward primer and the reverse 17 for). Four different bar codes, one for each sampled time, and two pairs of complementary regions, one for the V3 region and one for the V6 region were used. Table 1 shows the primers used.

According to Whiteley *et al.* (2012), the PCR reaction was performed in a volume of 50 µl containing 200 µM dNTPs, 0.5 µM of each primer, 2 units of Phusion High-Fidelity DNA Polymerase and Phusion HF Buffer 1X (including 1.5 µM MgCl₂). The PCR program used for amplification of hypervariable regions was as follows: 94 °C for 5 min, followed by 25 cycles of 94 °C for 40 s, 42 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, with a final extension of 72 °C for 4 min. The PCR products were separated on agarose gel 1.2% (P/V), using a horizontal electrophoresis chamber at 90V for 50 min.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de regiones hipervariables V3 y V6 del gen ribosomal 16s.
Table 1. Primers used for amplification of V3 and V6 hypervariable regions of ribosomal gene 16 s.

Nombre	Secuencia
A-key-BC1- ForwardV3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATCCTAAGGTAACACTCCTACGGGAGGCAGCAG
A-key-BC1- ReverseV3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATCTAAGGTAACATTACCGCGGCTGCTGG
A-key-BC2- ForwardV3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATCTAAGGAGAACACTCCTACGGGAGGCAGCAG
A-key-BC2- ReverseV3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATTAAGGAGAACATTACCGCGGCTGCTGG
A-key-BC3- ForwardV3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATCAAGAGGATTCCTACGGGAGGCAGCAG
A-key-BC3- ReverseV3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATAAGAGGATTCATTACCGCGGCTGCTGG
A-key-BC4- ForwardV3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATCTACCAAGATCACTCCTACGGGAGGCAGCAG
A-key-BC4- ReverseV3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATTACCAAGATCATTACCGCGGCTGCTGG
A-key-BC1- ForwardV6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATCTAAGGTAACACGCGARGAACCTTACC
A-key-BC1- ReverseV6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATCTAAGGTAACACGAGCTGACGACARCCATG
A-key-BC2- ForwardV6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATTAAGGAGAACACGCGARGAACCTTACC
A-key-BC2- ReverseV6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATTAAGGAGAACACGAGCTGACGACARCCATG
A-key-BC3- ForwardV6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATAAGAGGATTCACGCGARGAACCTTACC
A-key-BC3- ReverseV6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATAAGAGGATTCACGAGCTGACGACARCCATG
A-key-BC4- ForwardV6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATTACCAAGATCACGCGARGAACCTTACC
A-key-BC4- ReverseV6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATTACCAAGATCACGAGCTGACGACARCCATG

De acuerdo a Whiteley y colaboradores (2012), la reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 µl conteniendo 200 µM de dNTPs, 0.5 µM de cada iniciador, 2 unidades de Phusion High-Fidelity DNA polimerasa y Phusion HF Buffer 1X (que incluye 1.5 mM de MgCl₂). El programa de PCR utilizado para la amplificación de regiones hipervariables fue el siguiente: 94 °C por 5 min, seguido por 25 ciclos de 94 °C por 40 s, 42 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, con una extensión final de 72 °C por 4 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.2% (P/V), utilizando una cámara horizontal de electroforesis a 90V por 50 min. Una vez corroborado el peso molecular esperado de las

Once confirmed the expected molecular weight of the hypervariable regions, samples were sent of each of the times and regions assessed the National Center for Genetic Resources (CE the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP), for sequencing.

Massive sequencing in IonTorrent

The output file IonTorrent sequencer (with extensión. bam) was loaded into a data structure of Matlab R2013a. The processing sequence was as follows. Sequences not containing the barcode is eliminated. By the structure of the

regiones hipervariables, se enviaron muestras de cada uno de los tiempos y regiones evaluadas al Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), para su secuenciación.

Secuenciación masiva en IonTorrent

El archivo de salida del secuenciador IonTorrent (con extensión.bam) se cargó en una estructura de datos de Matlab R2013a. El procesamiento de secuencias consistió en lo siguiente. Se eliminaron las secuencias que no contuvieran el código de barras. Por la estructura de los iniciadores utilizados, las secuencias obtenidas tenían inicialmente el código de barras (de 10 pares de bases) y posteriormente 20 pb correspondientes a la región complementaria de la región hipervariable (del iniciador forward). En este sentido, se seleccionaron únicamente secuencias de al menos 130 pb, para posterior al rasurado de secuencia para eliminar el código de barras y la región complementaria, se tuvieron secuencias útiles de al menos 100 pb. Después, se clasificaron las secuencias de acuerdo al código de barras, con el fin de clasificarlas por cada uno de los tiempos muestreados. Con las secuencias resultantes y separadamente para cada uno de los tiempos muestreados, se agruparon las secuencias repetidas, se ordenaron con base al número de repeticiones, y se seleccionaron las 200 secuencias más representadas. Las secuencias finales se compararon contra la base de datos SILVA (SILVA, <http://www.arb-silva.de/aligner>) para la obtención de la clasificación taxonómica.

Resultados y discusión

Extracción de ADN y amplificación de regiones hipervariables

La extracción de ADN de cada una de las muestras obtenidas del biodigestor de nopal se realizó mediante la estrategia fenol-cloroformo y con un kit comercial. La calidad del ADN extraído se evaluó en un gel de agarosa al 1.2%. Debido a que se detectó una banda de alto peso molecular más intensa y con poco barrido, se optó por utilizar las muestras de ADN obtenidos con fenol-cloroformo. En la Figura 1, los primeros ocho carriles (a-h) corresponden a los fragmentos amplificados a partir de ADN extraído mediante fenol-cloroformo, y los últimos (i-p) a los

primers used, the sequences obtained initially had the bar code (10 bp) and 20 bp corresponding to subsequently the complementary region of the hypervariable region (primer forward). Here, only sequences of at least 130 bp, for post-shaving selected sequence to remove the bar code and the complementary region, useful sequences of at least 100 bp were taken. Then the sequences according to the barcode were classified, in order to classify each of the sampled time. With the resulting sequences and separately for each of the sampled times, repeated sequences were pooled, they ordered based on the number of repetitions, and most represented 200 sequences were selected. End sequences were compared against the data base SILVA (SILVA, <http://www.arb-silva.de/aligner>) for obtaining taxonomic classification.

Results and discussion

DNA extraction and amplification hypervariable regions

The DNA extraction of each of the samples obtained from the digester of nopal was performed by phenol-chloroform strategy and with a commercial kit. Extracted DNA quality was evaluated in an agarose gel 1.2%. Because a higher intense band was detected molecular weight and little sweep, he chose to use DNA samples obtained phenol-chloroform. In Figure 1, the first eight lanes (a-h) corresponding to the amplified fragments from DNA extracted using phenol-chloroform, and the last (i-p) to the fragments corresponding to extraction with the commercial kit. For each method of extraction have eight lanes as each time ran for two hypervariable regions; in this regard, lanes a and b correspond to the time T1 regions V3 and V6, respectively; c and d correspond to T2 of V3 and V6, respectively; e and f to T3, and g and h to , all for DNA extracted by phenol-chloroform methodology. This arrangement was maintained in the rest of the tracks (i-p), corresponding to DNA extracted using the commercial kit.

Sequencing of V3 and V6 hypervariable regions

The concentration of PCR products amplifiers of V3 and V6 regions was adjusted to 20 piconMoles- μl^{-1} and were sent to the National Center for Genetic Resources of the INIFAP for sequencing. Sequencing was performed on a computer IonTorrent, from Life Technologies. Each of the

fragmentos correspondientes a la extracción mediante el kit comercial. Para cada método de extracción se tienen ocho carriles dado que cada tiempo se corrió para ambas regiones hipervariables; en este sentido, los carriles a y b corresponden al tiempo T1 de las regiones V3 y V6, respectivamente; c y d corresponden a T2 de V3 y V6, respectivamente; e y f al T3, y g y h al T4, todos para el ADN extraído mediante la metodología de fenol-cloroformo. Este arreglo se mantuvo en el resto de los carriles (i-p), correspondiente al ADN extraído mediante el kit comercial.

Secuenciación de regiones hipervariables V3 y V6

La concentración de los productos de PCR amplificadores de las regiones V3 y V6 fue ajustada a 20 piconMoles· μl^{-1} y fueron enviados al CNRG para su secuenciación. La secuenciación se realizó en un equipo IonTorrent, de Life Technologies. Cada uno de los cuatro tiempos evaluados se combinó y se obtuvieron dos muestras finales para las regiones V3 y V6. El llenado de nanopérlas de cada uno de los chips de IonTorrent se muestra en la Figura 2.

Para la región hipervariable V3 se obtuvieron 889 777 secuencias, y para la región V6 145 080. Las secuencias de mayor longitud fueron de 293 y 281 pb para las regiones V3 y V6 respectivamente. La mediana del tamaño de secuencia para V3 fue de 180 pb y 135 pb para la región V6.

Clasificación de secuencias y filtrado

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, se utilizó un código de barras distinto para cada uno de los tiempos muestreados. Dado que la secuenciación de muestras se realizó con una mezcla de todas las muestras obtenidas, el código de barras se utilizó para clasificar las secuencias. Para esto, se escribió un código en Matlab 2014b para clasificar las secuencias según su código de barras.

En el Cuadro 2, se muestra el número de secuencias finales utilizado para posteriores análisis obtenidos después de la clasificación y ordenamiento de secuencias.

El agrupamiento de secuencias similares redujo el total de secuencias a analizar como sigue: para la región hipervariable V3, en T1, una secuencia única con una repetición, en T2 25 207 secuencias únicas, en T3 37, 833 secuencias únicas y en T4, 9,150 secuencias únicas. Las

four times evaluated combined and two final samples for V3 and V6 regions were obtained. The Nanobeads filling each IonTorrent chips shown in Figure 2.

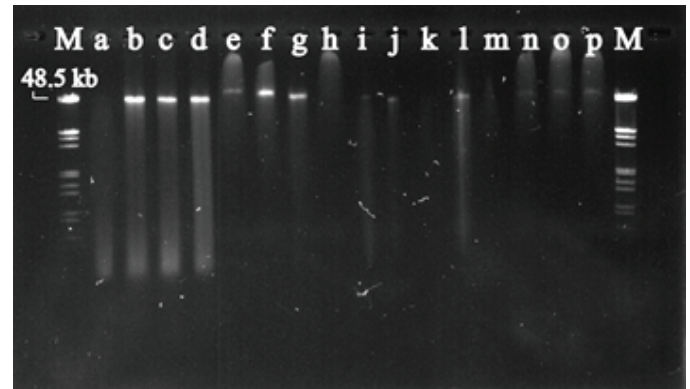


Figura 1. Gel de agarosa para medir la calidad del ADN extraído mediante fenol-cloroformo (carriles a-h) y un kit comercial (carriles i-p).

Figure 1. Agarose gel to measure the quality of DNA extracted by phenol-chloroform (lanes a-h) and a commercial kit (lanes i-p).

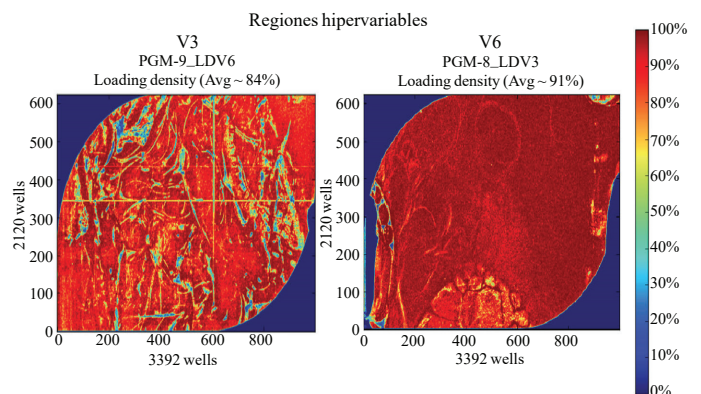


Figura 2. Llenado de chips de para secuenciación masiva en IonTorrent con nanopérlas.

Figure 2. Filling chips for mass sequencing IonTorrent with nanopérlas.

For the hypervariable region V3 sequences 889 777 were obtained, and the region V6, 145 080. The longest sequences were of 293 and 281 bp for the V3 and V6 regions respectively. The median size for V3 sequence was 180 bp and 135 bp for the V6 region.

Sequence classification and filtering

As mentioned in the section of materials and methods, a different bar code for each of the sampled times was used. Since sequencing samples was performed with a mixture of

secuencias más representadas tuvieron 717, 3 647 y 4 167 secuencias para T2, T3 y T4 respectivamente. Para la región hipervariable V6, en T1, 8 secuencias únicas, en T2 199 secuencias únicas, en T3 283 secuencias únicas y en T4 64 secuencias únicas. Las secuencias más representadas tuvieron 1, 3, 7 y 10 secuencias para T1, T2, T3 y T4 respectivamente.

all the samples obtained, the bar code was used to classify sequences. For this, a code in Matlab 2014b was written to classify sequences by bar code.

The number of end sequences used for further analysis obtained after classification and sorting sequences shown in Table 2.

Cuadro 2. Número de secuencias obtenidas (después del proceso de filtrado) para cada uno de los tiempos muestreados. Table 2. Number of sequences obtained (after filtering process) for each sampled time.

	T1	T2	T3	T4
Región hipervariable V3				
Secuencias totales	1	124 591	233 226	63 415
Secuencias mayores a 130 pb	1	68 657	133 310	52 368
Secuencias menores a 130 pb	0	55 934	99 916	11 047
Región hipervariable V6				
Secuencias totales	6 906	701	2 062	2 427
Secuencias mayores a 130 pb	8	207	331	79
Secuencias menores a 130 pb	6 898	494	1 731	2 348

Comparación de secuencias contra base de datos SILVA y análisis de biodiversidad.

La comparación con la base de datos de genes ribosomales 16s SILVA se realizó con las 200 secuencias únicas más repetidas para cada uno de los tiempos muestreados. Se utilizó la paquetería SILVA Incremental Aligner (SINA), en la cual se cargaron las 200 secuencias para cada uno de los tiempos muestreados. En los Cuadros 3 y 4, se muestran los grupos taxonómicos a los cuales se asignaron cada una de las 200 secuencias evaluadas. Únicamente se presentan los niveles taxonómicos de familia y género. No fue posible obtener la especie a la que pertenece cada una de las secuencias.

Del total de géneros mostrados en los Cuadros 3 y 4, algunos están presentes sólo en alguno de los tiempos muestreados, o solo en alguna de las regiones hipervariables. En el Cuadro 5, se muestra una lista general y resumida de los distintos géneros encontrados en este ensayo metagenómico, agrupados sólo por región hipervariable y en conjunto.

Pooling of similar sequences reduced the total sequence analyzed as follows: for the hypervariable region V3, at T1, a unique sequence with a repetition T2, 25,207 unique sequences, T3, 37, 833 unique sequences and T4, 9,150 unique sequences. The sequences most represented were 717, 3647 and 4167 sequences for T2, T3 and T4 respectively. For the hypervariable region V6, in T1, eight, unique sequences in T2, 199 unique sequences, in T3 unique sequences 283 and T4 64 unique sequences. The most represented sequences were 1, 3, 7 and 10 sequences for T1, T2, T3 and T4 respectively.

Sequence comparison against SILVA based data and analysis of biodiversity.

Comparison with the database SILVA 16s ribosomal gene was performed with the 200 unique sequences more repeated for each sampled time. Incremental SILVA parcel Aligner (SINA), in which 200 sequences for each of the sampled times used were loaded. Tables 3 and 4, the taxonomic group to which assigned each of the 200 sequences shown evaluated. Only taxonomic family and genus levels are presented. It was not possible to obtain the species to which each sequence belongs.

Cuadro 3. Identificación de familias y géneros de microorganismos basada en la comparación de las secuencias obtenidas de la región hipervariable V3 y la base de datos SILVA.

Table 3. Identification of families and genera based on comparison of the obtained sequences of the hypervariable region V3 microorganisms and SILVA data base.

Tiempo	Nivel familia Familias	Secuencias	Nivel género Géneros	Secuencias
V3-1*	Bacteroidales*	1		
V3-2	Porphyromonadaceae	49	Petrimonas	13
	Carnobacteriaceae	8	Atopostipes	8
	Acidaminococcaceae	12	Phascolarctobacterium	12
	Lactobacillaceae	5	Lactobacillus	5
	Rikenellaceae	22	Alistipes	22
	Bacteroidaceae	12	Bacteroides	12
	Halomonadaceae	4	Halomonas	4
	Prevotellaceae	3		
	Staphylococcaceae	2		
V3-3	Carnobacteriaceae	24	Atopostipes	19
	Porphyromonadaceae	47	Petrimonas	15
	Lactobacillaceae	11	Lactobacillus	11
	Moraxellaceae	11	Acinetobacter	11
	Acidaminococcaceae	10	Phascolarctobacterium	10
	Bacillaceae	1	Alkalibacterium	5
	Halomonadaceae	6	Amphibacillus	1
	Veillonellaceae	4	Halomonas	6
	Bacteroidaceae	14	Megasphaera	4
	Rikenellaceae	9	Bacteroides	14
	Enterobacteriaceae	4	Alistipes	9
	Pseudomonadaceae	6	Pseudomonas	3
	Planococcaceae	2	Enterobacter	1
	Aerococcaceae	1	Facklamia	1
	V3-4	Prevotellaceae	54	Prevotella
Veillonellaceae		47	Megasphaera	39
Lactobacillaceae		68	Lactobacillus	68
Bifidobacteriales		7	Bifidobacteriaceae	7
Moraxellaceae		5	Acinetobacter	5
Enterobacteriaceae		2	Escherichia/Shigella	2
Acidaminococcaceae		4	Mitsuokella	4
Halomonadaceae		1	Phascolarctobacterium	4
Rikenellaceae		1	Halomonas	1
Paenibacillaceae 1		1	Selenomonas	1
			Anaerovibrio	3
			Alistipes	1
			Cohnella	1

*No se encontró ningún género asociado.

Cuadro 4. Identificación de familias y géneros de microorganismos basada en la comparación de las secuencias obtenidas de la región hipervariable V6 y la base de datos SILVA.**Table 4. Identification of families and genera based on comparison of the obtained sequences of the hypervariable region V6 microorganisms and SILVA data base.**

Tiempo	Nivel familia		Nivel género	
	Familias	Secuencias	Géneros	Secuencias
V6-1	Halomonadaceae	1	Halomonas	1
V6-2			Prevotella	2
	Prevotellaceae	5	Alistipes	5
	Rikenellaceae	5	Lactobacillus	3
	Lactobacillaceae	3	Atopostipes	1
	Carnobacteriaceae	1	Paludibacter	1
	Staphylococcaceae	1	Paraprevotella	1
	Porphyromonadaceae	21	Petrimonas	5
	Bacteroidaceae	1	Parabacteroides	1
	Spirochaetaceae	1	Bacteroides	1
	Halomonadaceae	1	Treponema	1
	Enterobacteriaceae	1	Halomonas	1
	Acidaminococcaceae	4	Escherichia/Shigella	1
	Sutterellaceae	1	Phascolarctobacterium	4
	Veillonellaceae	1	Parasutterella	1
		Megasphaera	1	
V6-3	Porphyromonadaceae	36	Phascolarctobacterium	9
	Acidaminococcaceae	9	Atopostipes	17
	Carnobacteriaceae	19	Petrimonas	15
	Veillonellaceae	3	Megasphaera	3
	Rikenellaceae	3	Alistipes	3
	Moraxellaceae	7	Acinetobacter	7
	Lactobacillaceae	10	Lactobacillus	10
	Planococcaceae	1	Alkalibacterium	2
	Bacillaceae 2	2	Amphibacillus	2
	Prevotellaceae	3	Paludibacter	1
	Bacteroidaceae	11	Bacteroides	11
	Enterobacteriaceae	3	Paraprevotella	1
	Halomonadaceae	3	Prevotella	1
	Pseudomonadaceae	4	Barnesiella	1
	Ruminococcaceae	1	Escherichia/Shigella	3
			Halomonas	3
			Pseudomonas	2
		Saccharofermentans	1	
V6-4	Prevotellaceae	9	Prevotella	9
	Lactobacillaceae	11	Lactobacillus	11
	Veillonellaceae	9	Megasphaera	6
	Bifidobacteriales	4	Bifidobacteriaceae	4
			Selenomonas	1
			Mitsuokella	1
			Anaerovibrio	1

De acuerdo al Cuadro 5, la utilización de la región hipervariable V3 permitió la identificación de 24 géneros bacterianos, la utilización de la región hipervariable V6 permitió identificar 28 géneros bacterianos; en conjunto, en este ensayo se lograron identificar 31 distintos géneros del dominio procarionte.

Of all genres shown in Tables 3 and 4, some are present only in some of the sampled time, or only one of the hypervariable regions. A general summary and list of different genres found in this metagenomic test only hypervariable region grouped together and shown in Table 5.

Cuadro 5. Géneros de bacterias encontrados en cada una de las regiones hipervariables evaluadas.

Table 5. Gender of bacteria found in each of the hypervariable regions evaluated.

Regiones hipervariables V3	V6	En ambas regiones hipervariables
Acinetobacter	Acinetobacter	Acinetobacter
Alistipes	Alistipes	Alistipes
Alkalibacterium	Alkalibacterium	Alkalibacterium
Amphibacillus	Amphibacillus	Amphibacillus
Anaerovibrio	Anaerovibrio	Anaerovibrio
Atopostipes	Atopostipes	Atopostipes
Bacteroides	Bacteroides	Bacteroides
Bifidobacteriaceae	Barnesiella	Barnesiella
Cohnella	Bifidobacteriaceae	Bifidobacteriaceae
Enterobacter	Escherichia/Shigella	Cohnella
Escherichia/Shigella	Halomonas	Enterobacter
Facklamia	Lactobacillus	Escherichia/Shigella
Halomonas	Megasphaera	Facklamia
Lactobacillus	Mitsuokella	Halomonas
Megasphaera	Paludibacter	Lactobacillus
Mitsuokella	Parabacteroides	Megasphaera
Petrimonas	Paraprevotella	Mitsuokella
Phascolarctobacterium	Parasutterella	Paludibacter
Prevotella	Petrimonas	Parabacteroides
Pseudomonas	Phascolarctobacterium	Paraprevotella
Selenomonas	Prevotella	Parasutterella
Porphyromonadaceae	Pseudomonas	Petrimonas
	Saccharofermentans	Phascolarctobacterium
	Selenomonas	Prevotella
	Treponema	Pseudomonas
		Saccharofermentans
		Selenomonas
		Treponema

Como se mencionó anteriormente, el proceso de metanogénesis está compuesto por dos principales etapas, en la primera, se degradan los compuestos orgánicos y se produce el CO₂ necesario para el desarrollo de la segunda etapa de generación de metano. Se ha reportado que la

According to Table 5, the use of the hypervariable region V3 allowed the identification of 24 bacterial gender, using hypervariable region identified 28, V6 bacterial genera; together, in this trial they were able to identify 31 different genres of prokaryote domain.

primera etapa de la metanogénesis es mediada por bacterias, especialmente del filum *Firmicutes* (Li *et al.*, 2013). En el presente trabajo se identificaron 205 secuencias de la región V3 y 81 secuencias de la región V6 pertenecientes al grupo de los *Firmicutes*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, no fue posible encontrar ningún género del dominio de las arqueas, todas las secuencias obtenidas fueron asignadas a géneros bacterianos diversos. Aunque se ha reportado el uso de los iniciadores aquí probados para la amplificación de regiones hipervariables en arqueas, el hecho de que no se hayan asignado secuencias al dominio de las arqueas se explicaría por los parámetros de PCR empleados ya que estos pudieron no ser los más eficientes para la amplificación de las regiones V3 y V6 de arqueas. Otra posible razón pudiese ser que el muestreo se realizó cuando las condiciones internas del biodigestor eran predominantemente aeróbicas.

Conclusiones

En México, la producción de nopal ha sido destinada únicamente para el consumo humano. El cultivo de nopal requiere insumos mínimos y rinde grandes cantidades de material vegetal. Estas ventajas pueden ser muy apreciadas si se lograra diversificar el uso actual del nopal. En el presente trabajo se caracterizó el metagenoma presente en una planta experimental de generación de metano a partir de nopal. Las secuencias hipervariables V3 y V6 permitieron identificar las secuencias obtenidas hasta un nivel taxonómico de género. Los iniciadores utilizados permitieron identificar únicamente microorganismos del dominio de las procariontes; no se identificaron arqueas. De las secuencias utilizadas para el análisis final, 205 secuencias de ADN fueron asignadas al filum *Firmicutes*, un importante grupo de bacterias cuya función es la degradación de materia verde para la producción de dióxido de carbono. Los resultados obtenidos sugieren que es importante caracterizar la comunidad microbiana presente en las plantas para la generación de metano, así como establecer la dinámica poblacional a través del tiempo. Dicho conocimiento será importante para el diseño racional de mejores estrategias de generación de fuentes alternativas de energía.

As mentioned above, the methanogenesis process comprises two main stages, the first, degrade organic compounds and CO₂ necessary for development of the second generation stage methane. It has been reported that the first stage of methanogenesis is mediated by bacteria, especially of the phylum *Firmicutes* (Li *et al.*, 2013). In this work 205 were identified of V3 region and sequences 81 of V6 region sequences belonging to the group of the *Firmicutes*.

According to the results, it was not possible to find any kind of domain archaea, all the sequences obtained were assigned to various bacterial genera. Although it has been reported using the here tested for amplification of hypervariable regions in archaea initiators that have been allocated sequences to the domain of archaea be explained by PCR parameters used since these might not be the most efficient for amplification of V3 and V6 regions archaea. Another possible reason could be that the sampling was performed when internal conditions were dominantly aerobic digester.

Conclusions

In Mexico, nopal production was only intended for human consumption. The nopal cultivation requires minimal inputs and yields large quantities of plant material. These advantages can be greatly appreciated if lograse diversify the current use of nopal. In the present work this metagenome was characterized in an experimental plant for methane generation from nopal. The V3 and V6 hypervariable sequences allowed to identify the sequences obtained to a taxonomic genus level. The primers used allowed only identify organisms domain of prokaryotes; archaea they not identified. Of the sequences used for the final analysis, 205 sequences DNA were assigned to the phylum *Firmicutes*, an important group of bacteria whose function is the degradation of green material for the production of carbon dioxide. The results suggest that it is important to characterize the microbial community present in plants for the generation of methane and establish the population dynamics over time. This knowledge will be important for the rational design of better strategies for generating alternative energy sources.

End of the English version



Literatura citada

- Demirbas, A. 2005. Potential application of renewable energy sources, biomass combustion problems in boiler power systems and combustion related environmental issues. *Progress in Energy and Combustion Science*. 31(2):171-192.
- Demirel, B.; Neumann, L. and Scherer, P. 2008. Microbial community dynamics of a continuous mesophilic anaerobic biogas digester fed with sugar beet silage. *Eng. Life Sci.* 8(4):390-398.
- Demirel, B. and Scherer, P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7(2):173-190.
- Hess, M.; Sczyrba, A.; Egan, R.; Tae-Wan, Kim.; Chochawala, H.; Schroth, G.; Luo, S.; Douglas, S. C.; Chen, F.; Zhang, T.; Mackie, R. I.; Pennacchio, L. A.; Tringe, S. G.; Visel, A.; Woyke, T.; Wang, Z. and Rubin, E. M. 2011. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*. 331(6016):463-467.
- Krober, M.; Bekel, T.; Diaz, N. N.; Goesmann, A.; Jaenicke, S.; Krause, L.; Miller, D.; Runte, K. J.; Viehöver, P.; Puhler, A. and Schlüter, A. 2009. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J. Biotechnol.* 142(1):38-49.
- Li, A.; Chu, Y.; Wang, X.; Ren, L.; Yu, J.; Liu, X.; Yan, J.; Zhang, L.; Wu, S. and Li, S. 2013. A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnol. Bio.* 17 p.
- Logares, R.; Sunagawa, S.; Salazar, G.; Cornejo-Castillo, F. M.; Ferrera, I.; Sarmiento, H.; Hingamp, P. and Ogata, H. 2013. Metagenomic 16S rDNA illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environ. Microbiol.* 16(9):2659-2671.
- Mortimer, N. D. 1991. Energy analysis of renewable energy sources. *Energy Policy*. 19(4):374-385.
- Schlüter, A.; Bekel, T.; Diaz, N. N.; Dondrup, M.; Eichenlaub, R.; Gartemann, K. H.; Krahn, I.; Krause, L.; Krömeke, H.; Kruse, O.; Mussgnug, J. H.; Neuweger, H.; Niehaus, K.; Pühler, A.; Runte, K. J.; Szczepanowski, R.; Tauch, A.; Tilker, A.; Viehöver, P. and Goesmann, A. 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* 136(1-2):77-90.
- Thauer, R. K.; Hedderich, R. and Fischer, R. 1993. Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂. *Methanogenesis*. Ferry, J. (eds). Springer US. Boston, MA, USA. 209-252 pp.
- Whiteley, A. S.; Jenkins, S. and Waite L. 2012. Microbial 16S rRNA ion tag and community metagenome sequencing using ion torrent (PGM) platform. *J. Microbial Methods*. 91:80-88.
- Wilson, K. 1990. Preparation of genomic DNA from bacteria. *In: current protocols in molecular biology*. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. and Struhl, K. (Eds.). Assoc. and Wiley Interscience. NY, USA. 241-245 pp.