



Review [Revisión]

MÉTODOS PARA ANÁLISIS DE MICROORGANISMOS EN SUELOS: UNA REVISIÓN †

[METHODS FOR ANALYSIS OF MICROORGANISMS IN SOILS: A REVIEW]

Judi Judith Esquivel-Marín¹, Francisco Guadalupe Echavarría-Cháirez^{2,1} *,
Rómulo Bañuelos-Valenzuela¹, Nancy Harlet Esquivel-Marín³
and Luis Roberto Reveles-Torres²

¹ Universidad Autónoma de Zacatecas. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Kilómetro 31.5 Carretera Panamericana, Zacatecas - Fresnillo, General Enrique Estrada, Zacatecas, C. P. 98500. E-mail: marin.judi@gmail.com,

*echavarria.francisco@inifap.gob.mx, romulob@uaz.edu.mx

² Campo Experimental Zacatecas, INIFAP, CIRNOC, Campo Experimental Zacatecas Kilómetro 24.5, Zacatecas - Fresnillo, México. C. P. 98500. E-mail: reveles.roberto@inifap.gob.mx, echavarria.francisco@inifap.gob.mx

³ Universidad Autónoma Chapingo. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM), Apdo. Post. Núm. 90, Carretera Federal México-Texcoco km. 38.5, Universidad Autónoma de Chapingo, El Cooperativo, México, C. P. 56235. E-mail:

harletesquivel@gmail.com

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Bibliometric analysis and the study of the state of the art are two essential tools to understand the research in the field of analysis of microorganisms in soils. **Objective.** To analyze, through a literature review, the different methods that exist to study soil microbial diversity. **Methodology.** The review was carried out in two phases. The first phase consisted in carrying out a state of the art on the main biological and molecular-based methods that have been used to analyze soil microbial diversity, the second phase consisted in a bibliometric analysis, carried out with the help of two software, where revealed the main trends and contributions of the publications, as well as the most influential authors in the field. **Results.** The main lines of research where techniques are used to analyze edaphic communities are: bioremediation, phylogenetic relationships, agricultural productivity, phytoremediation, nitrification, actinobacteria, molecular ecology and sustainable agriculture. It was found that 358 articles on biological methods and 1468 articles on molecular basis have been published and the latter are the most cited. **Implications.** Molecular techniques stand out as the most frequently used due to their greater precision and great diversity of microorganism identified in soils. **Conclusions.** China is the most innovative country in this field and is focusing on molecular-based methods.

Key words: edaphic communities; traditional techniques; molecular techniques.

RESUMEN

Antecedentes. El análisis bibliométrico y el estudio del estado del arte son dos herramientas esenciales para comprender la investigación en el campo de análisis de microorganismos en suelos. **Objetivo.** Analizar mediante una revisión de literatura los diferentes métodos que existen para estudiar la diversidad microbiana del suelo. **Metodología.** La revisión se llevó a cabo en dos fases. La primera fase consistió en un análisis bibliométrico que se realizó con ayuda de dos softwares, VOSviewer y Biblioshiny, donde se revelaron las principales tendencias y contribuciones de las publicaciones, así como los autores más influyentes en esta área y en la segunda fase se elaboró el estado del arte sobre los principales métodos biológicos y de base molecular que se han utilizado para analizar la diversidad microbiana del

† Submitted May 24, 2024 – Accepted March 17, 2025. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5654>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = J.J. Esquivel-Marín: <http://orcid.org/0000-0002-8645-4219>; F.G. Echavarría-Cháirez: <http://orcid.org/0000-0002-4910-5677>; R. Bañuelos-Valenzuela: <http://orcid.org/0000-0001-9298-0840>; N.H. Esquivel-Marín: <http://orcid.org/0000-0001-5500-5421>; L.R. Reveles-Torres: <http://orcid.org/0000-0002-4508-8697>

suelo. **Resultados.** Las principales líneas de investigación donde se usan técnicas para analizar a las comunidades edáficas son: biorremediación, relaciones filogenéticas, productividad agrícola, fitorremediación, nitrificación, actinobacterias, ecología molecular y agricultura sostenible. Se contabilizaron 320 artículos de métodos biológicos y 1095 artículos de base molecular y éstos últimos son los más citados. **Implicaciones.** Destacan las técnicas moleculares como las más frecuentemente usadas por su mayor precisión y por la gran diversidad de microorganismos identificados en suelos. **Conclusiones.** China es el país con más innovación en este campo y se está centrando en los métodos de base molecular.

Palabras clave: comunidades edáficas; técnicas tradicionales; técnicas moleculares.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos que habitan los suelos desempeñan funciones de fertilidad y salud que se ve reflejado en los ecosistemas. Son vitales para el crecimiento de toda expresión viva que se presenta sobre él, ya que intervienen en múltiples procesos biogeoquímicos que se dan simultáneamente en la tierra como, por ejemplo, los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo o azufre entre otros. Dentro de los microorganismos se encuentran las bacterias, virus y hongos, que forman comunidades especializadas que cumplen múltiples funciones o servicios ambientales como es el mantenimiento de la fertilidad a partir de la descomposición de la materia orgánica y contribuir en la disponibilidad de nutrientes que se encuentran en el suelo. Su presencia y participación es esencial en el mantenimiento de la sustentabilidad como respuesta a la intensidad en el uso del suelo, lo que ha llevado a la degradación y disminución de la biodiversidad de microorganismos. (Bender *et al.*, 2016). Esto se ha intentado contrarrestar con el uso de los llamados biofertilizantes, que son microorganismos formulados que ayudan a mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo y son una alternativa para la agricultura cuando el suelo tiene una baja población de microorganismos benéficos (Afanador, 2017; Yafetto, 2022).

Es de suma importancia conocer cómo se encuentran constituidas las comunidades de los microorganismos que están en el suelo, esto debido a que su presencia es crítica para el buen funcionamiento de los procesos ecológicos y agrícolas (Bender *et al.*, 2016). En el marco de la Agenda 2030 donde la sostenibilidad es el eje principal para el manejo adecuado de recursos naturales, el estudio de los microorganismos es un tema de prioridad para abordar desafíos como la degradación del suelo, la seguridad alimentaria y la remediación del cambio climático, temas cruciales para tener un futuro viable para las próximas generaciones (Dong *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023). Los suelos poseen una inmensa diversidad bacteriana, que había sido poco explorada con las técnicas

tradicionales o también llamadas de base biológica, que debido principalmente al carácter no cultivable de una gran cantidad de microorganismos diversas comunidades quedaban sin poder ser identificadas (Jansson *et al.*, 2023). Esta limitativa entre otras se han ido compensado por el desarrollo de técnicas de base molecular que permiten la extracción de material genético (Lozada *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue describir el panorama general de la producción de literatura sobre las principales técnicas tradicionales y de base molecular a nivel mundial. Esta revisión implicó la integración de métodos bibliométricos y cualitativos para medir y analizar la literatura. Se encontraron las principales líneas de investigación, países, investigadores y centros de investigación que se enfocan en torno a la identificación de microorganismos.

METODOLOGÍA

El presente estudio representa una investigación cuantitativa-descriptiva de producción de documentos referentes a los distintos métodos para el análisis de microorganismos edáficos. Se realizó en dos etapas: 1) estudio bibliométrico; 2) estado del arte sobre los principales métodos biológicos y de base molecular.

Se utilizó un diagrama de flujo PRISMA para presentar las diferentes fases de la revisión sistemática. Esta metodología brinda información a través de las diferentes fases de una revisión sistemática y traza el número de artículos identificados, incluidos o excluidos, y las razones por estas exclusiones (Koutsos *et al.*, 2019). Para recopilar los metadatos de ambas fases se utilizaron dos cadenas de búsqueda dentro del título, resumen o palabras clave (Figura 1). Se adoptaron los operadores booleanos (OR) y (AND). La búsqueda se llevó a cabo en Scopus de Elsevier en diciembre del 2023 e incluyó todos los documentos publicados antes de esa fecha. Se utilizó este repositorio digital ya que de acuerdo con Forliano *et al.* (2021) es una de las bases de datos más importantes.

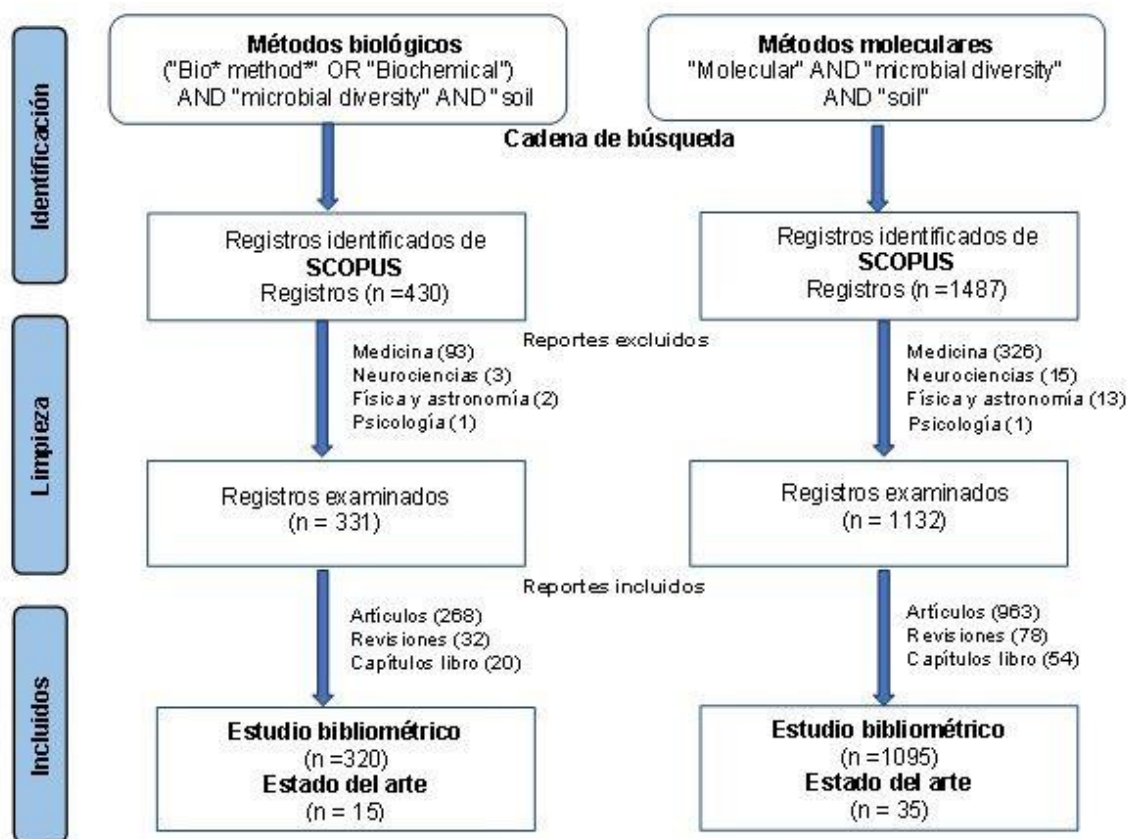


Figura 1. Diagrama de flujo esquemático de los pasos clave de la revisión sistemática. Basado en Moher *et al.* (2009).

Estudio bibliométrico (fase 1)

Para la realización del análisis bibliométrico se utilizaron principalmente dos técnicas: análisis de desempeño de los principales autores y mapeo científico (Esquivel-Marín *et al.*, 2023). El análisis de desempeño tomó como indicador el número de publicaciones y citas de los documentos dentro del conjunto de datos y se clasificó por autor y se utilizó Biblioshiny, que es una aplicación basada en R para generar mapas y gráficos bibliométricos basado en archivos bibtex o excel (Aria y Cuccurullo, 2017).

El mapeo otorga al investigador los vínculos o patrones ocultos en las estructuras conceptuales proporcionando una visión general sobre las investigaciones más importantes (Malanski *et al.*, 2021). Para realizar este mapeo se utilizó el software con relevancia en la cienciometría VOSviewer (van Eck y Waltman, 2010). VOSviewer permitió ejecutar el análisis de co-ocurrencias que es una técnica que se basa en agrupar el número de artículos en los que aparecen juntas dos palabras clave. El tamaño del nodo de la palabra clave, indica el peso; es decir, en cuántos documentos aparece una palabra clave. Las palabras clave que se encuentran en un mismo color del nodo significan que pertenecen al mismo clúster, lo

que permite la descripción de líneas de investigación (Martinho, 2018). Las palabras clave fueron “Bio method” or “biochemical” and “microbial diversity” and “soil”, en la búsqueda de “métodos biológicos” y en “métodos moleculares” fueron las palabras clave “molecular” and “microbial diversity” and “soil”, todas fueron ingresadas en idioma inglés (Figura 1), por lo que los diagramas resultantes se presentan en ese idioma.

Estado del arte (fase 2)

La segunda fase consistió en realizar un estudio del estado del arte sobre los principales métodos biológicos y de base molecular que se han utilizado para analizar la diversidad microbiana del suelo. Los artículos de base biológica incluyen investigaciones experimentales centradas en organismos vivos, procesos fisiológicos y estudios genéricos. En contraste, los artículos de base molecular se enfocan en mecanismos bioquímicos, genéricos y procesos a nivel molecular. Se tomaron en cuenta los trabajos que se realizaron en los últimos años. Se identificaron y revisaron a mayor detalle 15 documentos respecto a los métodos biológicos tradicionales y 35 documentos referentes a investigaciones de base molecular. Esto con la finalidad de identificar las metodologías

utilizadas en los documentos analizados en el análisis bibliométrico.

RESULTADOS

Bibliometría

Análisis de estudios que utilizan métodos biológicos

Se encontraron 320 documentos relacionados con este tema (Figura 2), con una línea de tiempo de 1989 al 2023, con una tasa de crecimiento anual del 10.63%. Los documentos se distribuyen en 177 fuentes. En total se encontraron 1718 autores que han colaborado en este tema. En promedio cada artículo tiene 26.58 citas.

En cuanto a los autores más prolíferos son Wang Jianing y Wang Ying (Figura 3). Ambos autores colaboran y realizan trabajos sobre el desempeño del material biológico múltiple, la biorremediación, microbiología de suelo y el uso de macro hongos como mejoradores de suelos contaminados con cadmio. Wang J. se encuentra en el laboratorio clave de recursos biológicos y medio ambiente ecológico del ministerio de educación, facultad de ciencias de la vida, universidad de Sichuan, China, mientras que Wang Y se encuentra en el laboratorio provincial clave de microbiología aplicada de Shandong, instituto de ecología, universidad tecnológica de Qilu Jinan, China. De los 10 principales autores ocho son de China. Dos de Polonia Wyszowska y Kucharski del departamento de microbiología, universidad de Warmia, Polonia.

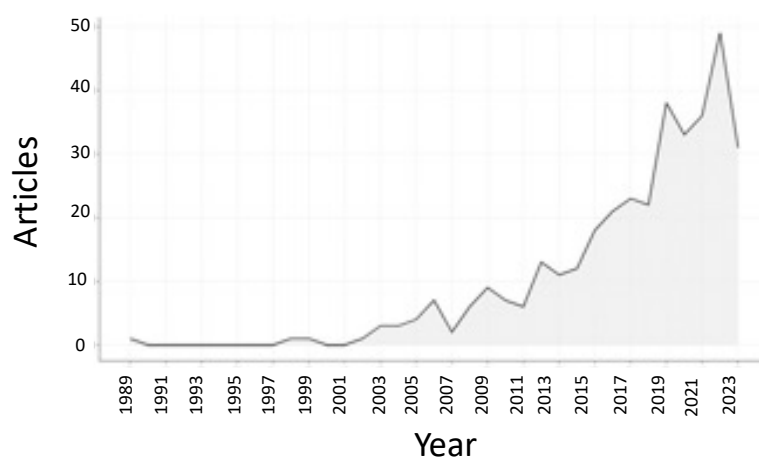


Figura 2. Cronología de los artículos publicados sobre métodos químicos. Fuente: Biblioshiny, basado en el conjunto de datos de Scopus 2023.

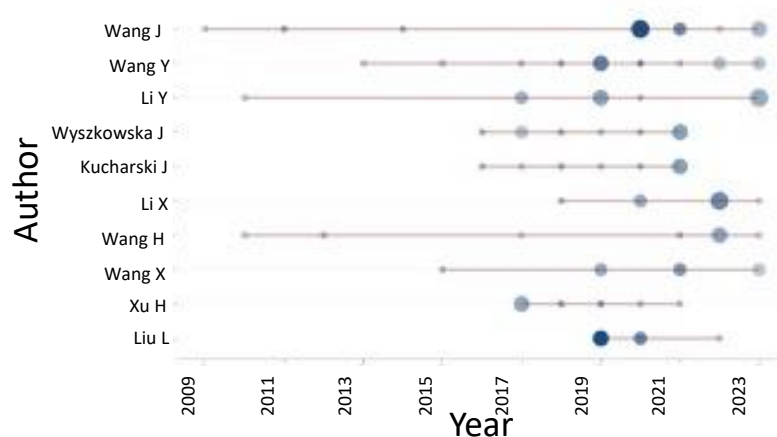


Figura 3. Producción de los autores con mayor impacto en a lo largo del tiempo. Nota: cuanto mayor sea el círculo, más artículos ha publicado el autor en ese año. Cuanto más oscuro es el círculo, más citas se han recibido por año. Fuente: Biblioshiny, basado en el conjunto de datos de Scopus 2023.

Se encontraron siete grupos principales (Figura 4) que corresponden a líneas de investigación: 1) relaciones filogenéticas (amarillo), 2) hongos microscópicos (rojo), 3) fertilidad (azul), 4) biomasa (celeste), 5) productividad agrícola (verde), 6) fitorremediación (naranja) y 7) biorremediación (morado).

Análisis de estudios que utilizan métodos de base molecular

Se encontraron 1095 documentos relacionados con este tema (Figura 5), con una línea de tiempo de 1994 al 2023. Los documentos se distribuyen en 417 fuentes. En total se encontraron 6278 autores que han colaborado en este tema. En promedio cada artículo tiene 54.01 citas.

En cuanto a los autores más prolíferos son Zhang Xiaoyan y Wang Yutao (Figura 6). Provenientes del

instituto de ecología aplicada, academia China de ciencias, Shenyang y universidad normal del sur de China, Guangzhou, China. Estos autores versan sus estudios principalmente en la respuesta de la diversidad microbiana a factores abióticos y bióticos. Realizan pruebas de análisis de ácidos grasos fosfolípidos, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y múltiples análisis ecológicos. Así como los efectos de los fertilizantes nitrogenados y fertilizantes orgánicos sobre la calidad del suelo y el rendimiento de los cultivos. Los diez principales autores son de China. Aunado a esto, en la figura 2 se pudo observar el dominio de los autores provenientes de China, por lo que se puede concluir que los métodos tanto de bases químicas como de bases moleculares son empleadas y dominadas por las investigaciones que se llevan cabo en China.

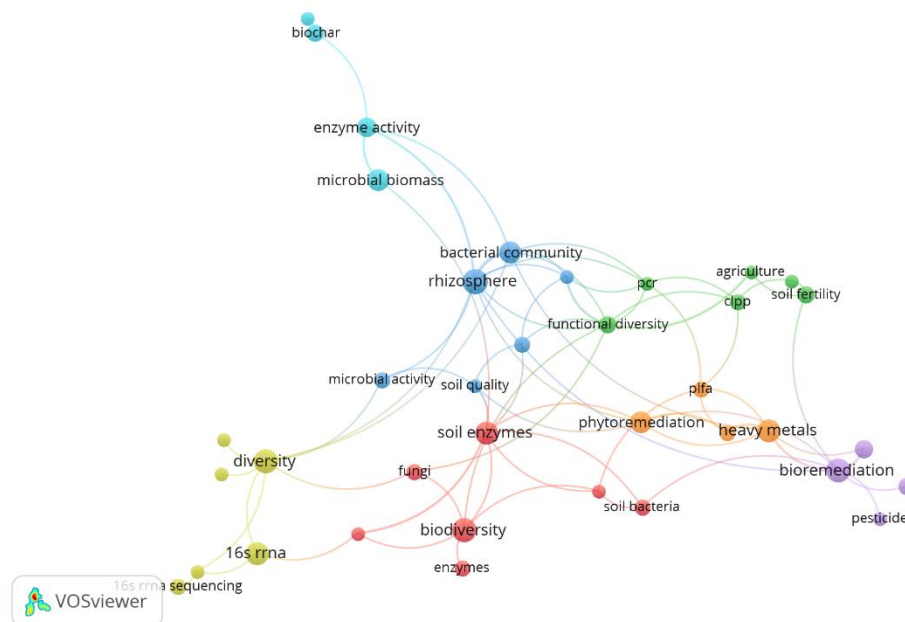


Figura 4. Enlaces de co-ocurrencia con todas las palabras clave (en inglés), considerando 5 palabras como el número mínimo de ocurrencias de una palabra. Fuente: VOSviewer, basado en el conjunto de datos de Scopus.

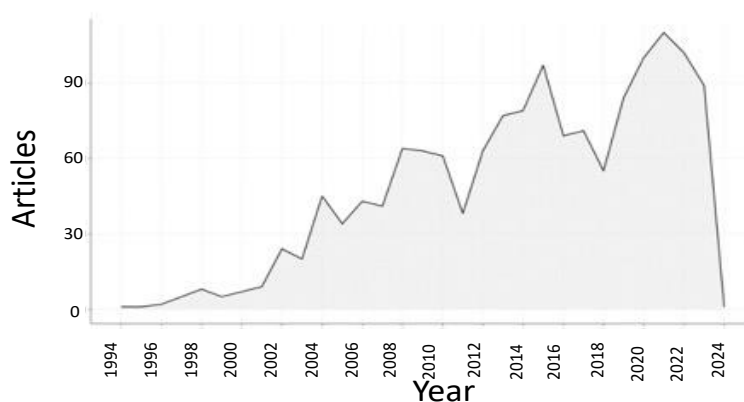


Figura 5. Cronología de los artículos publicados sobre métodos de bases moleculares. Fuente: Biblioshiny, basado en el conjunto de datos de Scopus 2023.

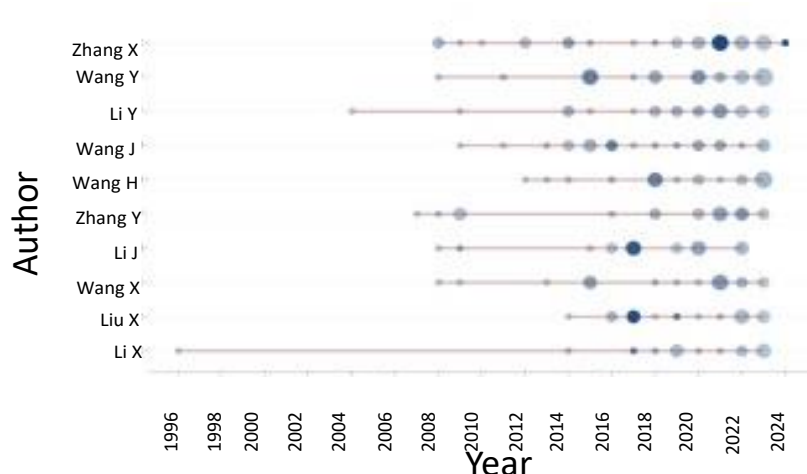


Figura 6. Producción de los autores con mayor impacto en a lo largo del tiempo. Nota: cuanto mayor sea el círculo, más artículos ha publicado el autor en ese año. Cuanto más oscuro es el círculo, más citas se han recibido por año. Fuente: Biblioshiny, basado en el conjunto de datos de Scopus 2023

Las principales líneas de investigación. Se dividen en cinco principales grupos: nitrificación, actinobacterias, ecología molecular, agricultura y biorremediación (Figura 7).

Grupo verde o nitrificación. Está línea de investigación parte de la teoría microbiana que indica que, en función de la disponibilidad de C y N, las poblaciones microbianas transforman el N en el suelo. No obstante, como mencionan Montaña y Sánchez-Yañez (2014) se sabe que otros factores químicos y físicos regulan la interacción entre las poblaciones microbianas heterótrofas y nitrificantes por lo que las investigaciones en este grupo se centran en analizar dichas interacciones. Grupo amarillo o actinobacterias, se basa en estudios que se enfocan en aislar

actinobacterias del suelo, ya que éste es el principal reservorio de la diversidad de especies de estas bacterias. De acuerdo con Evangelista-Martínez y Enríquez (2017) las actinobacterias son fuente de nuevos antimicrobianos o de bioactivos con diversos potenciales biotecnológicos. Grupo morado o ecología molecular, esta línea de investigación se utiliza para investigar problemas ecológicos con ayuda de técnicas moleculares que recién se han desarrollado. Estas nuevas metodologías abren la puerta a la exploración de nuevas aproximaciones al estudio de las comunidades microbianas, pues permiten el análisis simultáneo de la caracterización taxonómica de las especies contenidas en la comunidad y las funciones que pueden desempeñar (Bonilla-Rosso *et al.*, 2008).

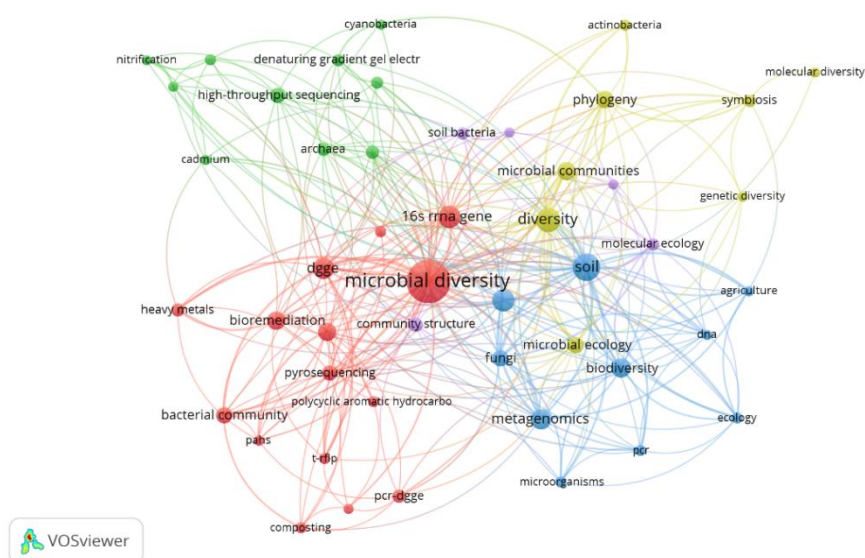


Figura 7. Enlaces de co-ocurrencia con todas las palabras clave, considerando 7 palabras como el número mínimo de ocurrencias de una palabra. Fuente: VOSviewer, basado en el conjunto de datos de Scopus.

Grupo azul o agricultura estas investigaciones se centran en analizar la diversidad microbiana que tiene repercusiones en la agricultura. Es una línea primordial ya que como indican Higa y Parr (2013) los microorganismos benéficos son un elemento clave para una agricultura y medio ambiente sostenibles. Grupo rojo o biorremediación se basan en estudios que estudian el potencial metabólico de microorganismos como bacterias y hongos para la descontaminación. Por ejemplo, como indican Covarrubias *et al.* (2015) son necesarios estudios sobre la diversidad microbiana en sitios contaminados con metales pesados para encontrar cepas mejor adaptadas y con mayor capacidad de biorremediación de estos contaminantes.

Métodos para análisis de microorganismos

Métodos biológicos para estudiar la diversidad microbiana del suelo

Método de recuento en placa

Esta técnica tradicional se utilizó por primera vez a finales del siglo XIX, por Robert Koch. La metodología es ampliamente utilizada y también se le conoce como recuento de unidades formadoras de colonias (Olsen y Bakken, 1987). La técnica, como primer paso consiste en la toma de la muestra que se desea analizar, posteriormente de la toma de muestra se hace una serie de diluciones a fin de obtener diferentes concentraciones de esta. El objetivo de realizar las diluciones es para favorecer el análisis, dado que las poblaciones contenidas en la muestra pueden ser numerosas y puede haber una superposición lo que ocasiona inconvenientes para realizar el análisis. De tal forma, una vez que se inocula la muestra para diluirla, se sigue con la incubación y así después el conteo de las colonias que hayan crecido sobre el agar dentro de las cajas de cultivo (Amy y Morita, 1983; Torrella y Morita, 1981). Una desventaja de esta técnica biológica es que existe una amplia posibilidad de que se superpongan entre si las colonias (a pesar de la dilución de la muestra), aunado a que se debe tener especial cuidado en las condiciones de incubación ya que son determinantes para el crecimiento de las colonias. Es importante mencionar que los microorganismos que se pueden aislar y cultivar en placas con agar nutritivo son apenas una parte ínfima, ya que solo el 1% de la flora bacteriana natural pueden ser cultivados (Mink *et al.*, 1982; Li *et al.*, 2008).

Perfil fisiológico a nivel comunitario (CLPP)

Garland y Mills en 1991 fueron los primeros en utilizar la metodología de perfil fisiológico de nivel comunitario, la cual se basa en la capacidad de los microorganismos para metabolizar diferentes sustratos

de carbono (Garland y Mills, 1991). Cada microorganismo que compone una comunidad posee diferentes destrezas de catabolizar sustratos, de tal modo que suministrando diferentes sustratos se consigue una huella catabólica de la comunidad analizada, llamada como la técnica de CLPP, por sus siglas en inglés (Degens y Harris, 1997). Para esta técnica se toma la muestra que se desea analizar, se hacen diluciones las cuales son inoculadas en unos tubos que poseen diferentes fuentes de carbono, y después de ello se incuban, para así finalmente hacer su análisis. Por mencionar una desventaja de la técnica es que pueden existir sesgos en la caracterización de la diversidad metabólica, además de que los resultados están sujetos al adecuado muestreo, así como al estado fisiológico de las células que son inoculadas y al crecimiento de ellas (Konopka *et al.*, 1998; Ramsey *et al.*, 2006).

Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

Esta técnica de análisis se fundamenta en que los microorganismos poseen una gran variedad de ácidos grasos en los lípidos que los constituyen, y a su vez estos ácidos presentan diferentes formas de combinarse, debido a que los ácidos se volatilizan con gran facilidad después del proceso de esterificación, lo que resulta factible para el análisis de la técnica de cromatografía de gases (Vestal y White, 1989). Así pues, la técnica consiste en extraer los lípidos de la muestra mediante la ayuda de solventes orgánicos, por ejemplo, cloroformo o metanol (Miura *et al.*, 2017). Una vez que se realiza la extracción de los lípidos estos se someten a transesterificación usando un catalizador. Esto significa químicamente que ocurre una reacción donde los lípidos presentes son transformados en ésteres metílicos de ácidos grasos (Mrozik *et al.*, 2008). Los ésteres metílicos de ácidos grasos que se generan se separan y cuantifican por cromatografía de gases o bien, por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Los ésteres metílicos de ácidos grasos se separan de acuerdo con la longitud de la cadena de carbonos y el grado de insaturación (Nazih *et al.*, 2001). Una vez realizado el análisis por cromatografía se procede con la etapa de identificación y de cuantificación, en este punto los picos se identifican por comparación mediante el uso de bibliotecas de referencia (Lerch *et al.*, 2009). Los análisis de los perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos permiten el análisis de la composición de la comunidad de microorganismos en suelos y la comparación de comunidades microbianas entre otras muestras. Una limitación de esta técnica es que no se identifican directamente a los microorganismos, solo a sus ácidos grasos y debido a que muchos ácidos grasos son comunes a varios microorganismos esta técnica

resulta poco precisa (Viljoen *et al.*, 1986; Zelles *et al.*, 1992).

Métodos de base molecular para estudiar la diversidad microbiana del suelo

Los métodos moleculares en esencia son técnicas para realizar estudios a partir de moléculas que forman parte del material genético, por ejemplo, el ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) y las proteínas. Estas técnicas hacen uso de varias ramas de estudio, como lo son la biología molecular, bioquímica y la genética. Sus ventajas respecto de las técnicas tradicionales es que son altamente sensibles, precisas y rápidas. Dentro de las limitaciones son que ocupan equipo especializado, son complejas y costosas. A continuación, se describen éstas.

Guanina más citosina (G+C)

Esta técnica molecular se fundamenta en saber en qué proporción están distribuidas la guanina y la citosina en el contenido de material genético de los microorganismos de la muestra de interés. El porcentaje de las bases nitrogenadas, guanina y el porcentaje de la base de la citosina (% G+ %C) resultan ser rasgos distintivos que poseen los microorganismos, debido a que estos pueden presentar una variación amplia entre especies. Este método molecular es usado principalmente para tener información en cuanto a la composición taxonómica de las comunidades de los microorganismos de las muestras que se están analizando, además de que nos brinda información de la diversidad genética contenida en el material que se está estudiando (Griffiths *et al.*, 1997).

Esta técnica extrae el DNA, posteriormente se amplifica y se secuenciar, con lo que se obtiene un índice de las bases guanina más citosina que están presentes en la muestra que se desea obtener información y nos sirve para formar un perfil de % G+C y asociarlo a grupos de microorganismos. Los microorganismos presentan variaciones en los perfiles de % G+C, lo que nos conduce a conocer la estructura de la comunidad de los microorganismos de la muestra que se está estudiando. De este modo, se tiene que los perfiles de fusión individuales se normalizan en una escala porcentual del 0-100%, es así como los perfiles obtenidos son parametrizados, ajustando una ecuación general logística con respecto a los datos y transformando las curvas resultantes a perfiles de estas bases nitrogenadas, el índice de guanina más citosina se puede obtener de modo directo, esto mediante la secuenciación y con ayuda de programas bioinformáticos se obtiene el cociente de la suma de las bases guanina más citosina dividido entre el total de las bases. Los parámetros de la curva están relacionados con los datos genéticos de grupos de

microorganismos. Una limitante de esta técnica molecular es que no es posible identificar como tal a los microorganismos de manera directa, únicamente el contenido de guanina y citosina. Además de que los resultados pueden verse afectados por la calidad del ADN extraído de la muestra (Clegg *et al.*, 2000).

Reasociación de ácidos nucleicos

Esta técnica molecular fundamentalmente consiste en que separa las dos hebras complementarias que forman al DNA mediante desnaturalización, una vez que se separa se procede con la reasociación específica de las dos hebras y se analizan los productos de la reasociación. La técnica es conveniente para obtener información en cuanto a las relaciones filogenéticas entre diferentes microorganismos. El análisis se efectúa extrayendo el DNA de la muestra, luego se procede a la desnaturalización, con lo que la doble hélice es separada en sus cadenas individuales. Una vez que se ha desnaturalizado el DNA, éste se reasocia, es decir, se une mediante condiciones específicas (Özay y McCalla, 2021). Cuando se reasocian se forman nuevas moléculas, las cuales dependen del nivel de homología entre las secuencias de ADN (Johnson, 1985). Una vez que se ha llevado a cabo de reasociación de los ácidos nucleicos se procede con la detección de ésta, utilizando diferentes métodos, como la hibridación con sondas, absorbancia con UV, electroforesis en gel. Esta técnica sirve para establecer la abundancia de las secuencias que se están estudiando, con lo que se obtiene información acerca de la diversidad de los microorganismos (Miller *et al.*, 1994; Ritz *et al.*, 1997). Dentro de las limitantes de esta técnica es su elevado costo, así como que se debe tener especial cuidado durante el proceso para que no vaya a surgir algún tipo de contaminación del DNA (Moore, 1974; Smith *et al.*, 1975).

Hibridación del DNA total extraído en micro arreglos

Esta técnica molecular fue usada por primera vez a finales de 1990, y fue desarrollada por varios grupos de investigación que simultáneamente dieron a conocer publicaciones utilizando esta técnica molecular (Weisburg *et al.*, 1991; Stokke *et al.*, 1995). La técnica consiste en fragmentar al azar el DNA de la muestra y colocar estos fragmentos en un portaobjetos, para luego ser hibridado (Cho y Tiedje, 2001). Para realizar esta técnica, se extrae DNA contenido en la muestra de interés y éste es colocado en microarreglos, éstos son superficies sólidas, por mencionar algunos ejemplos, puede ser un portaobjetos de vidrio tradicional o bien, un chip de silicio (Haosagul *et al.*, 2021). A cada molécula de DNA monocatenario utilizado para detectar una secuencia específica de DNA de la muestra de interés (también conocida como

sonda) que se encuentra dispuesta en microarreglo le corresponde una región del genoma de un microorganismo. Una vez que se tienen a los microarreglos, se continua a realizar la hibridación, esta etapa del proceso, el DNA se marca, por ejemplo, con una tintura fluorescente, y para ser hibridado con sondas en el microarreglo (Jae-Chang, 2000). Los perfiles que se obtienen después de la hibridación se utilizan en procedimientos estadísticos para identificar cepas. Para realizar el análisis se usan programas especializados con la finalidad de obtener interpretación de los resultados. Cabe mencionar, que, en la mayoría de los microarreglos de DNA se basan en la detección de marcadores taxonómicos tales como 16S rDNA. Si bien la interpretación resulta algo compleja, su mayor limitación es que utiliza equipos especializados y costosos (Lander, 1999; Avarre *et al.*, 2007).

Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) y electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)

Estos métodos moleculares en esencia son separaciones electroforéticas, la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante y electroforesis en gel con gradiente de temperatura (DGGE y TGGE por sus siglas en inglés) son métodos con los que se obtiene una huella genética, es decir, un perfil de la comunidad de microorganismos (Nkongolo y Narendrula-Kotha, 2020).

La técnica DGGE fue usada por primera vez por el investigador Fischer y Lerman en (1983), con una publicación en la revista *Nature*. La técnica consiste en separar fragmentos de DNA en función a la secuencia de los nucleótidos que conforman la muestra, la técnica hace uso de un gel de gradiente desnaturizante (Muyzer y Smalla, 1998). En primera instancia se extrae el DNA de la muestra que se desea analizar, posteriormente mediante la reacción de PCR se lleva a cabo la amplificación, en este punto se usan primers concretos, posteriormente se utiliza el gel con gradiente de desnaturización, con el propósito de desestabilizar las uniones entre el hidrógeno y las bases nitrogenadas, originando un gradiente para llevar a cabo la separación electroforética, de modo que al aplicar corriente eléctrica las moléculas de DNA migran, con lo que se logra la separación (Myers *et al.*, 1985). Las moléculas que se desnaturizan con más facilidad migran más rápido respecto a las que lo hacen con mayor dificultad. Para interpretar los resultados el gel es teñido, lo que conduce a la formación de bandas una vez que se realiza espectroscopia UV, aquí las diferentes bandas de cada región del UV corresponderán a diferentes secuencias y por ende a diferentes comunidades microbianas. Dentro de las desventajas o limitaciones de esta técnica molecular es

que la preparación del gel desnaturizante y la interpretación de las bandas resulta compleja.

Por otra parte, la técnica molecular TGGE al igual que la técnica anterior también hace una separación de las moléculas de DNA en función de las secuencias de los nucleótidos que la componen, sin embargo, difiere en el modo de la separación, puesto que aquí en lugar de usar un gradiente desnaturizante lo que se usará es un gradiente de temperatura, en esencia, también se extrae el DNA de la muestra de interés el cual es purificado y amplificado con la reacción de PCR, para posteriormente llevar a cabo la separación con un gel de gradiente de temperatura, el cual aumenta de un extremo al otro (Muyzer, 1999; Chadalavada y Bevilacqua, 2009). En cuanto a la interpretación de los resultados es el mismo que la metodología DGGE. Por último, cabe mencionar que ambas técnicas permiten el análisis de las comunidades de microorganismos, sin embargo, la técnica TGGE al ser más sensible la hace una técnica más precisa respecto a la técnica de DGGE (Grammatico *et al.*, 1992).

Polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP)

Este método también se le conoce como polimorfismo de cadena de una sola hebra, es una técnica molecular que se basa en el principio de la movilidad electroforética de una molécula de DNA monocatenario sobre un gel que no se va a desnaturizar. La metodología de SSCP involucra la amplificación por PCR del fragmento objetivo, con la sucesiva desnaturización del producto generado por la reacción de PCR bicatenario con calor y formamida (u otros desnaturizantes, por ejemplo, hidróxido de sodio, urea e hidróxido de metilmercurio). Así mismo, la movilidad electroforética de la separación afecta la forma de las moléculas monocatenarias plegadas (Konstantinos *et al.*, 2008). Incluso si la diferencia en la secuencia entre la muestra natural (ADN normal) y el fragmento examinado (mutado) es solo un nucleótido, se adoptará una movilidad electroforética única. Como consecuencia, inclusive una alteración de una sola base puede dar lugar a un cambio conformacional, que puede detectarse por la movilidad alterada de la molécula de ADN monocatenaria en esta metodología. Por lo tanto, para cada fragmento de DNA de cadena simple, el número de conformaciones estables, que dan lugar a bandas de diferente movilidad durante la electroforesis debe determinarse experimentalmente bajo condiciones controladas. Las conformaciones originadas poseen una relación de acuerdo con la longitud de la cadena, la secuencia, así como a la ubicación y al número de zonas de apareamiento de bases. De manera que, si se presenta una mutación en una posición específica de nucleótidos en la secuencia primaria es posible que se

modifique la conformación de la molécula. Con esta técnica molecular es posible identificar diferencias entre poblaciones microbianas, sin embargo, su uso más popular como ya se mencionó es para detectar mutaciones en posiciones específicas de los nucleótidos (Junca y Pieper, 2004).

Análisis de Restricción del DNA Ribosómico Amplificado (ARDRA) y el Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

El método de Análisis de Restricción del DNA Ribosómico Amplificado (ARDRA) y método de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) son técnicas de biología molecular que se usan para investigar diferencias genéticas en microorganismos, además de que ambas técnicas usan enzimas de restricción para dividir el DNA y separar los fragmentos generados de acuerdo con su longitud.

La técnica de ARDRA es una técnica de biología molecular ampliamente utilizada en estudios ambientales, la técnica involucra la amplificación de regiones específicas del DNA ribosómico (rDNA) también se le puede encontrar con el nombre de 16s-rDNA (Brightwell y Horváth, 2018). La muestra de interés se somete a la reacción en cadena de la polimerasa, comúnmente conocida como PCR, esta reacción se lleva a cabo con ayuda de cebadores que se utilizan para marcar a las regiones conservadas por los microorganismos que se están analizando, para después llevar ese DNA a una digestión con enzimas de restricción, al término de la digestión se obtienen fragmentos de restricción los cuales se separan por electroforesis en gel (Viti y Giovannetti, 2004). Con los pasos anteriores se genera un perfil de restricción, estos resultados se analizan con el fin de distinguir variaciones genéticas en el DNA ribosómico, esta técnica molecular se usa por lo general en estudios de ecología microbiana para identificar diferencias entre especies microbianas (Ingiani *et al.*, 1997).

En la técnica molecular RFLP se aísla el DNA de la muestra el cual es digerido con enzimas de restricción específicas que cortan el DNA en sitios de reconocimiento específicos, lo que genera un conjunto de fragmentos de DNA, una vez generados los fragmentos éstos son separados mediante electroforesis. Posteriormente es usada una sonda, la cual viene marcada, esta sonda debe de tener la característica que debe de ser complementaria a la región analizada para de este modo detectar la señal. En lo que se refiere a la detección puede ser identificada mediante rayos X. Finalmente, se generan patrones de bandas los cuales son analizados a fin de detectar diferencias entre cepas de microorganismos (Abastabar *et al.*, 2022; Didehdar *et al.*, 2016).

Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción Terminal (T-RFLP)

La técnica de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción Terminal es una técnica molecular de utilidad para la descripción de comunidades de microorganismos complejas en alta resolución es muy usada en estudios para caracterizar comunidades de microorganismos (Pesaro *et al.*, 2004). Además de reducir la complejidad de las huellas genéticas, esta técnica molecular presenta ventajas respecto de otras técnicas moleculares basadas en DNA, por citar algunos ejemplos de las ventajas, una de ellas es que la técnica T-RFLP con electroforesis capilar tiene una resolución considerablemente mayor que la comúnmente utilizada por sistemas electroforéticos de gel. Además, la cantidad y el tamaño de los fragmentos de restricción se detectan mediante fluorescencia inducida por láser y la salida es digital lo que facilita el manejo de datos, ya que se convierte con facilidad a datos numéricos que permiten análisis estadísticos posteriores. Así mismo, ofrece la posibilidad de comparar datos obtenidos con datos almacenados en base de datos de secuencias (Hartmann *et al.*, 2005). Esta técnica se utiliza con mayor frecuencia para amplificar genes de ARNr de sub unidades pequeñas (16s o 18s) a partir de DNA total mediante la reacción de PCR. Como primer paso se extrae el DNA de la muestra, posteriormente se realiza una amplificación por PCR con ayuda de primers específicos para cada región de DNA. Uno de los primers es marcado con un fluoróforo (por ejemplo, fluoroceína, cianina etc.) Luego el DNA marcado se digiere con enzimas de restricción específicas. Finalmente, los fragmentos que fueron generados después de la digestión se analizan por electroforesis capilar (Schütte *et al.*, 2008). Los fragmentos representan a los diferentes taxones de microorganismos y son detectados en función de sus etiquetas fluorescentes. Al finalizar el proceso, en esencia se genera una huella genética, que sirve para caracterizar a los microorganismos (Hartmann *et al.*, 2005; Lukow, 2000).

Análisis de Amplificación del Espaciador Intergénico Ribosomal (RISA)

Esta técnica molecular posee la cualidad que permite distinguir entre especies de microorganismos estrechamente relacionados. Además, la técnica RISA, a diferencia de la anterior, T-RFLP, requiere menos mano de obra y es menos costosa porque solo requiere amplificación por PCR sin posterior restricción enzimática. La técnica en esencia se fundamenta en la amplificación de regiones específicas entre los genes ribosomales, generalmente el ARNr 16S, donde los espaciadores Inter génicos presentan una variabilidad en su secuencia (Hartmann *et al.*, 2005). En esta

técnica al material genético que es extraído de la muestra de interés se le realiza una reacción en la cadena de polimerasa con la finalidad de amplificar los espaciadores Inter génicos entre los genes ribosomales 16S mediante cebadores específicos. La reacción va a originar fragmentos de DNA con diferentes longitudes correspondientes a los espaciadores Inter génicos. Los fragmentos que se generan se separan por electroforesis en gel para obtener perfiles. Los perfiles que se crean al ser amplificados presentan bandas en diferentes localizaciones en el gel de acuerdo con la longitud de los espaciadores Inter génicos. Así mismo, también es preciso mencionar que, a cada banda en el perfil de amplificación le corresponde un espaciador Inter génico con una longitud específica. Los perfiles que han sido amplificados indican diferencias, así como similitudes en la composición de las comunidades de los microorganismos, para esto se necesitan herramientas estadísticas. Con los datos anteriores se obtiene información en cuanto a la estructura, así como a la diversidad de los microorganismos contenidos en la muestra de analizada (Selenska-Pobell *et al.*, 2001).

Automatizado de Espaciadores Inter génicos Ribosómicos (ARISA)

La técnica ARISA, se basa en el análisis de secuencias espaciadoras transcritas internamente. Esta técnica fue por primera vez usada para caracterizar la estructura de microorganismos de agua dulce por Fisher y Triplett (1999). Y gracias a la versatilidad se usó en muchos otros estudios de sistemas ecológicos. Esta técnica extrae el material genético a partir de la muestra que se desea estudiar. Luego se hace la PCR usando cebadores específicos, esto con la finalidad de amplificar las regiones de espaciadores Inter génicos ribosómicos. Estos cebadores se marcan para facilitar la detección y la cuantificación de las regiones amplificadas. Los productos que se crean por la reacción se separan y analizan con la electroforesis capilar automatizada. Esta técnica confiere alta resolución, así como precisión en la determinación de la magnitud de los fragmentos que han sido originados a partir del material genético extraído. Con los perfiles generados se consigue información para analizar e interpretar, y así evaluar la comunidad de microorganismos de la muestra de interés. Los patrones de los perfiles de ARISA de diferentes muestras se comparan y se analizan para ver si existen similitudes y diferencias en la composición de los microorganismos que se están investigando (Cherif *et al.*, 2008). Esta técnica molecular se relaciona con la técnica molecular RISA, pero diverge en aspectos clave, por ejemplo, la técnica de ARISA se usan en estudios de nivel género o especie, además brinda mayor resolución y el análisis de datos es más sencillo.

Sin embargo, la técnica RISA es una técnica más económica y útil a nivel comunidad (Jami *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

Las técnicas para analizar a los microorganismos han ido avanzando, desde el tradicional recuento en placa hasta estudios de análisis molecular. Actualmente las técnicas moleculares son más frecuentes en las investigaciones debido a su precisión y dado que tiene el potencial de dar reconocimiento de una gran diversidad de microorganismos en suelos, que resultaban desconocidos debido a que no se habían obtenido en cultivos de laboratorio. Existe una gran diversidad de técnicas, tanto biológicas como moleculares, y cada una presenta ventajas, así como limitantes. El uso de una técnica u otra dependerá de los recursos con los que se cuente, así como del objetivo de la investigación. Así mismo, se puede concluir que los métodos tanto de biológicos como moleculares son dominados por las investigaciones que se llevan cabo en China, ya que los autores más prolíferos son de centros de investigación provenientes de esa nación.

Las principales líneas de investigación donde se usan técnicas para analizar a las comunidades edáficas son: biorremediación, relaciones filogenéticas, productividad agrícola, fitorremediación, nitrificación, actinobacterias, ecología molecular y agricultura sostenible.

Para la comunidad científica es sólo el comienzo de una nueva era en la microbiología molecular, con grandes retos futuros que se tienen que superar para que estos microorganismos sean aliados en desarrollar una agricultura más sostenible y mejorar la salud de los ecosistemas.

Funding. This research was financed by the authors.

Conflict of interests. The authors declare that they do not have conflicts of interest.

Compliance with ethical standards. Not applicable.

Data availability. Data are available with the corresponding author (echavarria.francisco@inifap.gob.mx), upon reasonable request.

Author contribution statement (CRediT). **J. J. Esquivel-Marín¹:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **F. G. Echavarría-Cháirez:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **R. Bañuelos-Valenzuela:**

Conceptualization, Investigation, Writing – review & editing. **N. H. Esquivel-Marín:** Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **L. R. Reveles-Torres:** Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, & Writing

REFERENCES

- Abastabar, M., Shabanzadeh, S., Valadan, R., Mayahi, S., Haghani, I., Khojasteh, S., Nargesi, S., Seyedmousavi, S. and Hedayati, M.T., 2022. Development of RFLP method for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*, two species with high importance in clinical and food microbiology. *Journal of Medical Mycology*, 32(3), pp. 101274-101274. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2022.101274>
- Afanador B.L.N., 2017. Biofertilizantes: conceptos, beneficios y aplicación en Colombia. *Ingencia*, vol 2, Num 1 P 65-76.
- Amy, P.S. and Morita, R.Y., 1983. Starvation-survival patterns of sixteen freshly isolated open-ocean bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3), pp. 1109-1115. <https://doi.org/10.1128/aem.45.3.1109-1115.1983>
- Aria, M. and Cuccurullo, C., 2017. Bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. *Journal of Informetrics*, 11(4), pp. 959-975. <https://doi.org/10.1016/j.joi.2017.08.007>
- Arias, N.M.M. and Sánchez-Yañez, J.M., 2014. Nitrificación en suelos tropicales, asunto de competencia microbiana: un modelo basado en la teoría de Lotka-Volterra. *Ecosistemas*, 23(3), pp. 98-104. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2014.23-3.13>
- Avarre, J.-C., de Lajudie, P. and Béna, G., 2007. Hybridization of genomic DNA to microarrays: A challenge for the analysis of environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), pp. 242-248. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.007>
- Bender, S.F., Wagg, C. and van der Heijden, M.G.A., 2016. Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(6), pp. 440-452. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.016>
- Bonilla-Rosso, G., Souza, V. and Eguiarte, L.E., 2008. Metagenómica, genómica y ecología molecular: la nueva ecología en el bicentenario de Darwin. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 11(1), pp. 41-51.
- Brightwell, G. and Horváth, K.M., 2018. Molecular discrimination of New Zealand sourced meat spoilage associated psychrotolerant *Clostridium* species by ARDRA and its comparison with 16s RNA gene sequencing. *Meat Science*, 138 pp. 23-27. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.12.007>
- Chadalavada, D.M. and Bevilacqua, P.C.B.T., 2009. Chapter 18 - Analyzing RNA and DNA Folding Using Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) with Application to In Vitro Selections. *Methods in Enzymology*, 468 pp. 389-408. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)68018-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)68018-6)
- Cherif, H., Ouzari, H., Marzorati, M., Brusetti, L., Jedidi, N., Hassen, A. and Daffonchio, D., 2008. Bacterial community diversity assessment in municipal solid waste compost amended soil using DGGE and ARISA fingerprinting methods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), pp. 1159-1167. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9588-z>
- Cho, J.C. and Tiedje, J.M., 2001. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), pp. 3677-3682. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3677-3682.2001>
- Clegg, C., Ritz, K. and Griffiths, B., 2000. %G+C profiling and cross hybridisation of microbial DNA reveals great variation in below-ground community structure in UK upland grasslands. *Applied Soil Ecology*, 14 pp. 125-134. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00045-7)
- Covarrubias, S.A., Berumen, J.A.G. and Cabriales, J.J.P., 2015. El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, 25

- pp. 40-45.
<https://doi.org/10.15174/au.2015.907>
- Degens, B.P. and Harris, J.A., 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(9), pp. 1309-1320.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00076-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00076-X)
- Deshoux, M., Sadet-Bourgeteau, S., Gentil, S. and Prévost-Bouré, N.C., 2023. Effects of biochar on soil microbial communities: A meta-analysis. *Science of The Total Environment*, 902 pp. 166079-166079.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166079>
- Didehdar, M., Shokohi, T., Khansarinejad, B., Ali Asghar Sefidgar, S., Abastabar, M., Haghani, I., Amirrajab, N., Mondanizadeh, M., 2016. Characterization of clinically important dermatophytes in North of Iran using PCR-RFLP on ITS region. *Journal de Mycologie Médicale*, 26(4), pp. 345-350.
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.06.006>
- Domsch, K.H. Beck., T.H., Anderson, J.P.E., Söderström, B., Parkinson, D. and Trollenier, G., 1979. A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 142(3), pp. 520-533.
<https://doi.org/10.1002/jpln.19791420322>
- Dong, J. Yang, B., Wang, H., Cao, X., He, F. and Wang, L., 2023. Reveal molecular mechanism on the effects of silver nanoparticles on nitrogen transformation and related functional microorganisms in an agricultural soil. *Science of The Total Environment*, 904 pp. 166765-166765.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166765>
- Esquivel-Marín, N.H., Sagarnagavillegas, L.M., Barrera-Perales, O.T., Leos-Rodríguez, J.A., Salas-González, J.M., 2023. Multifunctional agriculture in the framework of the Sustainable Development Goals (SDGs): Bibliometric review. *Acta Universitatis Sapientiae, Agriculture and Environment*, 15(1), pp. 36-51.
<https://doi.org/10.2478/ausae-2023-0004>
- Fischer, S. and Lerman, L., 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(6), pp. 1579-1583.
<https://doi.org/10.1073/pnas.80.6.1579>
- Fisher, M.M. and Triplett, E.W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), pp. 4630-4636.
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4630-4636.1999>
- Forlano, C., De Bernardi, P. and Yahiaoui, D., 2021. Entrepreneurial universities: A bibliometric analysis within the business and management domains. *Technological Forecasting and Social Change*, 165 pp. 120522.
<https://doi.org/10.1016/j.techfore.2020.120522>
- Garland, J.L. and Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), pp. 2351-2359.
<https://doi.org/10.1128/aem.57.8.2351-2359.1991>
- Grammatico, P., Costanzi, S., Vigneti, E., Plane, M., Roccella, M., Roccella, F. and Del Porto, G., 1992. Cytogenetic, immunohistochemical and molecular analysis of p53 gene by TGGE and DGGE gel electrophoresis in 14 primary melanoma cell cultures. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 63(2), pp. 116-116.
[https://doi.org/10.1016/0165-4608\(92\)90414-4](https://doi.org/10.1016/0165-4608(92)90414-4)
- Griffiths, B.S., Díaz-Raviña, M., Ritz, K., McNicol, J.W., Ebbelwhite, N. and Bååth, E., 1997. Community DNA hybridisation and %G+C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 24 pp. 103-112.
[https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(97\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(97)00050-0)
- Haosagul, S., Oaew, S., Prommeenate, P., Sawasdee, V. and Pisutpaisal, N., 2021. DNA microarray for detection and identification of sulfur oxidizing bacteria in Biogas Clean-up

- System. *Energy Reports*, 7 pp. 559-568. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.07.097>
- Hartmann, M., Frey, B., Kölliker, R. and Widmer, F., 2005. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: Comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 61 pp. 349-360. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.12.011>
- Higa, T. and Parr, J.F., 2013. Microorganismos Benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenibles. Maryland (USA): Centro internacional de Investigación de Agricultura Natural, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 13(2), pp. 128-135
- Ingianni, A., Petruzzelli, S., Morandotti, G. and Pompei, R., 1997. Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 18(1), pp. 61-66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1997.tb01028.x>
- Jae-Chang, C. and M, T.J., 2000. Biogeography and Degree of Endemicity of Fluorescent *Pseudomonas* Strains in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), pp. 5448-5456. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5448-5456.2000>
- Jami, E., Shterzer, N. and Mizrahi, I., 2014. Evaluation of automated ribosomal intergenic spacer analysis for bacterial fingerprinting of rumen microbiome compared to pyrosequencing technology. *Pathogens*, 3 pp. 109-120. <https://doi.org/10.3390/pathogens3010109>
- Jansson J.K., McClure R. and Egbert R.G., 2023. Soil microbiome engineering for sustainability in a changing environment. *Nature Biotechnology*, 41, 1716-1728. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01932-3>
- Johnson, J.L., 1985. 2 DNA Reassociation and RNA Hybridisation of Bacterial Nucleic Acids. *Methods in Microbiology*, 18 pp. 33-74. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70471-9)
- Junca, H. and Pieper, D.H., 2004. Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. *Environmental Microbiology*, 6(2), pp. 95-110. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00541.x>
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglou, P., Klironomos, J.N., Lee, H. and Trevors, J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), pp. 169-188. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.006>
- Konopka, A., Oliver, L. and Turco, R.F., Jr., 1998. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. *Microbial ecology*, 35(2), pp. 103-115. <https://doi.org/10.1007/s002489900065>
- Konstantinos, K.V., Panagiotis, P., Antonios, V.T., Agelos, P. and Argiris, N.V., 2008. PCR-SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases. *Molecular Biotechnology*, 38(2), pp. 155-163. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-9006-7>
- Koutsos, T.M., Menexes, G.C. and Dordas, C.A., 2019. An efficient framework for conducting systematic literature reviews in agricultural sciences. *Science of The Total Environment*, 682 pp. 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.354>
- Lander, E.S., 1999. Array of hope. *Nature Genetics*, 21(1), pp. 3-4. <https://doi.org/10.1038/4427>
- Lehman, R.M., Colwell, F.S., Ringelberg, D.B. and White, D.C., 1995. Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. *Journal of Microbiological Methods*, 22(3), pp. 263-281. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00012-A](https://doi.org/10.1016/0167-7012(95)00012-A)
- Lerch, T.Z. et al., 2009. Dynamics of soil microbial populations involved in 2,4-D biodegradation revealed by FAME-based Stable Isotope Probing. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1), pp. 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.020>
- Li, X., Zhang, H., Wu, M., Zhang, Y. and Zhang, C., 2008. Effect of methamidophos on soil fungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis. *Journal of*

- Environmental Sciences*, 20(5), pp. 619-625.
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62103-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62103-8)
- Lozada, A.E., Lagarda, G.G., Jiménez, A.M. and Zapata, F.B., 2004. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*, 38(6), pp. 583-592.
- Lukow, T., 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 32 pp. 241-247.
[https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00033-7)
- Malanski, P.D., Dedieu, B. and Schiavi, S., 2021. Mapping the research domains on work in agriculture. A bibliometric review from Scopus database. *Journal of Rural Studies*, 81 pp. 305-314.
<https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2020.10.050>
- Martinho, V.J.P.D., 2018. Interrelationships between renewable energy and agricultural economics: An overview. *Energy Strategy Reviews*, 22 pp. 396-409.
<https://doi.org/10.1016/j.esr.2018.11.002>
- Miller, O.K., Johnson, J.L., Burdsall, H.H. and Flynn, T., 1994. Species delimitation in North American species of *Armillaria* as measured by DNA reassociation. *Mycological Research*, 98(9), pp. 1005-1011.
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80426-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80426-7)
- Mink, R.W., Patterson, J.A. and Hespell, R.B., 1982. Changes in Viability, Cell Composition, and Enzyme Levels During Starvation of Continuously Cultured (Ammonia-Limited) *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), pp. 913-922. <https://doi.org/10.1128/aem.44.4.913-922.1982>
- Miura, T., Makoto, K., Niwa, S., Kaneko, N. and Sakamoto, K., 2017. Comparison of fatty acid methyl ester methods for characterization of microbial communities in forest and arable soil: Phospholipid fraction (PLFA) versus total ester linked fatty acids (EL-FAME). *Pedobiologia*, 63, pp. 14-18.
<https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2017.04.002>
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J. and Altman, D.G., 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ*, pp.339
<https://doi.org/10.1136/bmj.b2535>
- Montaño, N.M., Sánchez-Yañez J.M., 2014. Nitrificación en suelos tropicales, asunto de competencias microbiana: un modelo basado en la teoría de Lotka-Volterra. *Ecosistemas*, 23(3), pp.98-104.
<https://doi.org/10.7818/ECOS.2014.23.3.13>
- Moore, R.L., 1974. Nucleic acid reassociation as a guide to genetic relatedness among bacteria. In W. Arber, et al. ed. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Springer. pp. 105-128.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. and Łabużek, S., 2008. FAMES profiles of phenol-degrading *Pseudomonas stutzeri* introduced into soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(3), pp. 319-324.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.03.009>
- Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2(3), pp. 317-322. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80055-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80055-1)
- Muyzer, G. and Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), pp. 127-141.
<https://doi.org/10.1023/a:1000669317571>
- Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S. and Maniatis, T., 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13(9), pp. 3131-3145.
<https://doi.org/10.1093/nar/13.9.3131>
- Nazih, N., Finlay-Moore, O., Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J., 2001. Whole soil fatty acid methyl ester (FAME) profiles of early soybean rhizosphere as affected by temperature and matric water potential. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4), pp. 693-

696. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00197-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00197-8)
- Nkongolo, K.K. and Narendrula-Kotha, R., 2020. Advances in monitoring soil microbial community dynamic and function. *Journal of Applied Genetics*, 61(2), pp. 249-263. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00549-5>
- Olsen, R.A. and Bakken, L.R., 1987. Viability of soil bacteria: Optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbial Ecology*, 13(1), pp. 59-74. <https://doi.org/10.1007/BF02014963>
- Özay, B. and McCalla, S.E., 2021. A review of reaction enhancement strategies for isothermal nucleic acid amplification reactions. *Sensors and Actuators Reports*, 3 pp. 100033-100033. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100033>
- Pesaro, M., Nicollier, G., Zeyer, J. and Widmer, F., 2004. Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), pp. 2577-2587. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2577-2587.2004>
- Ramsey, P.W. et al., 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia*, 50(3), pp. 275-280. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.03.003>
- Ritz, K., Griffiths, B.S., Torsvik, V.L. and Hendriksen, N.B., 1997. Analysis of soil and bacterioplankton community DNA by melting profiles and reassociation kinetics. *FEMS Microbiology Letters*, 149(2), pp. 151-156. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00056-6)
- Sadet-Bourgeteau, S., Philippeau, C., Dequiedt, S. and Julliard, V., 2014. Comparison of the bacterial community structure within the equine hindgut and faeces using Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA). *Animal*, 8(12), pp. 1928-1934. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001943>
- Saleh-Lakha, S., Miller, M., Campbell, R.G., Schneider, K., Elahimanesh, P., Hart, M.M. and Trevors, J.T., 2005. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *Journal of Microbiological Methods*, 63(1), pp. 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.007>
- Schütte, U.M., Abdo, Z., Bent, S.J., Shyu, C., Williams, C.J., Pierson, J.D. and Forney, L.J., 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80 pp. 365-380. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1565-4>
- Selenska-Pobell, S., Kampf, G., Flemming, K., Radeva, G. and Satchanska, G., 2001. Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(2), pp. 149-161. <https://doi.org/10.1023/A:1010237711077>
- Shi, Z., Zhang, J. and Wei, H., 2020. Research progress on soil seed bank: A bibliometrics analysis. *Sustainability*, 12(12), pp. 4888. <https://doi.org/10.3390/su12124888>
- Smith, M.J., Britten, R.J. and Davidson, E.H., 1975. Studies on nucleic acid reassociation kinetics: reactivity of single-stranded tails in DNA-DNA renaturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(12), pp. 4805-4809. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.4805>
- Stokke, T., Collins, C., Kuo, W-L., Kowbel, D., Shadravan, F., Tanner, M., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O-P., Pinkel, D., Deaven, L. and Gray, J.W., 1995. A physical map of chromosome 20 established using fluorescence in situ hybridization and digital image analysis. *Genomics*, 26(1), pp. 134-137. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80092-Z](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80092-Z)
- Torrella, F. and Morita, R.Y., 1981. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(2), pp. 518-527. <https://doi.org/10.1128/aem.41.2.518-527.1981>
- Van Eck, N. and Waltman, L., 2010. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, 84(2),

- pp. 523-538. <https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3>
- Vestal, J.R. and White, D.C., 1989. Lipid analysis in microbial ecology. *BioScience*, 39(8), pp. 535-541. <https://doi.org/10.2307/1310976>
- Viljoen, B.C., Kock, J.L. and Lategan, P.M., 1986a. Fatty acid composition as a guide to the classification of selected genera of yeasts belonging to the Endomycetales. *Microbiology*, 132(8), pp. 2397-2400. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-8-2397>
- Viti, C. and Giovannetti, L., 2005. Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. *Applied Soil Ecology*, 28(2), pp. 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.07.008>
- Wang, Z., Zhang, H., Xiong, Y., Zhang, L., Cui, J., Li, G., Du, C. and Wen, K., 2023. Remediation mechanism of high concentrations of multiple heavy metals in contaminated soil by sedum alfredii and native microorganisms. *Journal of Environmental Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.10.002>
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), pp. 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Yafetto, L., 2022. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, 8(3), pp. e09173-e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>
- Yang, Y., Zhang, Y., Yu, X. and Jia, G., 2023. Soil microorganism regulated aggregate stability and rill erosion resistance under different land uses. *CATENA*, 228 pp. 107176-107176. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2023.107176>
- Zelles, L., Bai, Q.Y., Beck, T. and Beese, F., 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(4), pp. 317-323. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90191-Y](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90191-Y)