



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METILÓTROFAS
 EN MUESTRAS DE AGUA DE LA ZONA INUNDADA DE LA
 MIXTEQUILLA VERACRUZ**

**T E S I S
 (IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS)**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
 MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

P R E S E N T A

**ANTONIA CORREA BASURTO
 (207385665)**

Comité tutorial

Directora

Dra. María Teresa Núñez-Cardona
Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento El Hombre y su Ambiente, UAM-X

Asesores

M. en C. Alfonso Esquivel-Herrera
Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento El Hombre y su Ambiente, UAM-X

Dr. Jaime García Mena
Laboratorio de Genómica Ambiental, Departamento de Genética y Biología Molecular,
CINVESTAV-Zacatenco

MÉXICO, D.F. JULIO DE 2012

DEDICATORIA

Dedico este escrito a Dios y a mis Padres queridos. Lucía Basurto Sámano y José Correa Bautista, por darme la vida y el regalo más valioso que yo tanto soñaba (la escuela), por darme cariño, consejos valiosos, su gran apoyo tanto moral como económico y a la Dra. María Teresa Núñez-Cardona por ayudarme a cumplir este sueño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora María Teresa Núñez Cardona (Directora de tesis), al Doctor Jaime García Mena (asesor) por haberme abierto las puertas de sus valiosos laboratorios y por su apoyo académico, así como en la elaboración, redacción y corrección de este manuscrito; de la misma manera agradezco al Maestro en Ciencias Alfonso Esquivel-Herrera por sus observaciones valiosas.

A los Doctores Luis Arturo García (Coordinador de la Maestría en Ciencias Agropecuarias) y Doctor Facundo Rivera Becerril por sus valiosas observaciones al presente documento.

A la M en C. María Guadalupe Aguilar González del CINESTAV por su apoyo en el secuenciamiento del ADN.

También agradezco a la UAM-X por haberme aceptado como estudiante de la Licenciatura en Biología y del Posgrado.

A la Licenciada Rocío Hernández y a la Maestra en Ciencias Ruth Soto por sus atenciones.

A la Doctora Martha Signoret Poillon y al Doctor José Viccon Pale, quienes introdujeron la iniciativa dentro del Departamento El Hombre y su Ambiente para trabajar en el humedal de La Mixtequilla, Veracruz.

Agradezco al Sr. Gaspar Vépez y a su esposa, la Señora Yadira, por su gran apoyo durante la colecta de las muestras y por las facilidades otorgadas para el procesamiento de las mismas facilitándonos un espacio adecuado para ello.

A la Maestra Elizabeth Santamaría Hernández, los biólogos Magdalena Chávez-Hernández y Diego Hernández Herrera, por su apoyo para la elaboración de las pruebas bioquímicas. Así mismo, agradezco a la M en C Carolina Miranda Brito por su enorme apoyo y su amistad brindados desde mi estancia en el CINESTAV.

A la UAM por haberme otorgado una beca durante el periodo de octubre de 2008 a enero 2009, por parte de la Oficina de Becas y Egresados de la Rectoría General de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca brindada durante el periodo del 1 de febrero de 2009 a 30 de septiembre de 2009 (CVU/becario 241887/225186), lo cual hizo posible el desarrollo de este proyecto de investigación y la elaboración de este documento.

Al Doctor José Correa Basurto y a la Doctora Martha Cecilia Rosales por el invaluable apoyo recibido durante mis estudios de licenciatura y posgrado.

Agradezco a mis hermanos José, Ana, Angélica, Rocío, Pablo, Abel, Armando, así como al Sr Evello Pérez por brindarme su apoyo y consejos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	5
MARCO TEÓRICO	6
MATERIALES Y MÉTODOS	13
a) Descripción del área de estudio	13
b) Ubicación de los puntos de muestreo	14
c) Registro de las variables ambientales	14
d) Colecta de las muestras	14
e) Procesamiento de las muestras	15
f) Aislamiento y obtención de cultivos bacterianos puros	15
g) Caracterización morfológica celular de los aislados bacterianos	16
h) Caracterización fisiológica y catabólica de los cultivos bacterianos puros	16
i) Exposición de los aislados a alcoholes y compuestos aromáticos	18
j) Respuesta de los cultivos bacterianos a los antibióticos ensayados	18
k) Identificación molecular de los cultivos aislados	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	64
LITERATURA CONSULTADA	65
ANEXO I Medios de cultivo y técnicas para el aislamiento y caracterización de cultivos bacterianos	82
ANEXO II Secuencias parciales del gen 16S ARNr de las especies y géneros bacterianos localizados en el BLAST del NCBI	91



El trabajo de Biología Molecular y el análisis del 16S ADN ribosomal para la identificación de los cultivos bacterianos de este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Genómica Ambiental del Departamento de Genética y Biología Molecular pertenecientes al CINVESTAV-Zacatenco, bajo la dirección del Doctor Jaime García Mena.

RESUMEN

Las bacterias metilótrofas se han estudiado desde los años 80, por el papel que desempeñan en los ciclos de los nutrientes y su capacidad para degradar alcoholes y compuestos aromáticos. Para realizar este trabajo de investigación, se colectaron muestras de agua y sedimento en dos potreros inundados de La Mixtequilla, Veracruz. Para el aislamiento de bacterias se utilizó un medio de cultivo con metanol como única fuente de carbono y energía; se obtuvieron cultivos puros mediante la técnica de siembra y resiembra, su uniespecificidad se verificó mediante observaciones al microscopio óptico. Los cultivos fueron caracterizados utilizando pruebas fisiológicas y la producción de enzimas extracelulares. Para conocer su capacidad de resistir o degradar metanol, etanol, 1-butanol, 2-propanol, tolueno y xileno, los cultivos se inocularon en éstos y en sensibilizadores con 12 antibióticos para conocer su respuesta; se les realizó el análisis de su 16S ADN, sus secuencias fueron registradas en el GenBank del NCBI. Se obtuvieron 81 cultivos bacterianos y 43 de ellos fueron caracterizados fisiológicamente. Los resultados revelaron que entre el 72%-81% toleraron concentraciones de NaCl de 0.5%-1.5%; utilizaron como fuentes de carbono y energía principalmente a la fructosa (72%), glucosa, sacarosa (63% ambas), manosa (56%) y manitol (51%). Un porcentaje alto produjo ureasa (86%), lisina descarboxilasa (63%), amilasa (49%); más de la mitad (63%) presentó metabolismo anaerobio facultativo, redujeron nitratos (30%) y nitritos (23%). La mayoría de los cultivos crecieron en presencia de xileno en las concentraciones: 0.5% (83%), 1.0% (81%); 2-propanol a 0.5% (76%), 1.5% (81%), 1.0% (67%); tolueno a 1.0% (74%), 1.5% (72%) y 0.5% (67%). Los cultivos fueron sensibles principalmente a netilmicina (94%), amikacina (91%), cloranfenicol, gentamicina (86% ambos) y trimetoprim-sulfametoxazol (80%) y 14 cultivos mostraron resistencia a entre cuatro y ocho antibióticos. Se identificaron molecularmente nueve cultivos bacterianos con un 94-99% de identidad, de los cuales cinco presentaron características catabólicas similares a *Serratia marcescens*, *Enterobacter asburiae*, *Bacillus jeotgali*, *Bacillus pumilus* y *Tetrasphaera* sp. De acuerdo con los resultados planteados, las bacterias del humedal de La Mixtequilla pueden ser consideradas de importancia agropecuaria y ecológica, al degradar la materia orgánica participando en los ciclos del carbono y nitrógeno; además de ser capaces de crecer en presencia de alcoholes y compuestos aromáticos transformándolos a formas no tóxicas para los seres vivos.

INTRODUCCIÓN

Los humedales son hábitats de transición entre ecosistemas acuáticos y terrestres; se encuentran a lo largo de ríos, lagos, estuarios; están periódicamente saturados o cubiertos de agua y se forman en zonas con drenaje deficiente, algunos se forman por la presencia de rocas impermeables; también pueden originarse por la acumulación de materia orgánica (Torres-Alvarado *et al.*, 2005).

Estos sistemas son ecológicamente muy ricos y su biodiversidad rivaliza con la de las selvas tropicales. Además de su valor comercial, amortiguan y almacenan las aguas de inundación, retienen sedimentos y reducen la contaminación. Presentan flora y fauna características y son de los ecosistemas más productivos de la biósfera; además, se caracterizan por poseer altas tasas de sedimentación de material orgánico (Kusler *et al.*, 1994).

El valor comercial de los humedales se debe a que cumplen funciones muy útiles; por ejemplo, son fuentes lucrativas de arroz silvestre, de peces y mariscos, sin embargo, pese a su inmenso valor, están desapareciendo rápidamente y su pérdida se puede atribuir al mismo carácter que los hace tan valiosos. Debido a su naturaleza siempre cambiante se dificultan los esfuerzos para crear políticas relacionadas a su conservación (Kusler *et al.*, 1994).

De acuerdo con Torres *et al.* (2002), la superficie mundial que ocupan los humedales naturales es mínima (3%) pero la reserva del carbono que ahí se encuentra es del 15 al 30% y tienen un papel fundamental en los ciclos del carbono y nitrógeno.

En los humedales la materia orgánica es mineralizada principalmente en los sedimentos a través de procesos anaerobios; en especial, en los costeros, la sulfato-reducción es la fase terminal más importante de la descomposición anaerobia, mientras que la metanogénesis domina en los humedales de agua dulce (Torres-Alvarado *et al.*, 2005).

A los humedales se les ha considerado como fuentes naturales de metano por lo que ejercen un efecto sobre la composición de los gases de la atmósfera; el dióxido de carbono que extraen de ésta lo almacenan por un tiempo largo (Glagolev y Shnyrev, 2007) y aportan alrededor del 21% de las emisiones de metano (CH₄) hacia la atmósfera, mismo que contribuye 21 veces más al efecto invernadero que el dióxido de carbono (Ritchie *et al.*, 1997). Cabe destacar que el CO₂ tiene un tiempo

de vida en la atmósfera de 100 años (Gary y Chanton, 2001) y el metano de 9-12 años (Ritchie *et al.*, 1997). La mayor parte del metano es oxidado en la atmósfera por radicales libres (OH) y una pequeña fracción de este gas (1-10%) es transformado por el consumo bacteriano en el suelo (Lelieveld *et al.*, 1998), en tanto que en la columna de agua hay variaciones de emisión y oxidación de metano (Torres-Alvarado *et al.*, 2005).

El metano es producido por las bacterias metanógenas tras la degradación anaerobia de la materia orgánica (Torres *et al.*, 2002) y es oxidado para dar origen a metanol por bacterias metanótrofas (Auman *et al.*, 2000).

El metanol (CH₃OH) es un alcohol de bajo peso molecular, se caracteriza por ser tóxico para los seres vivos cuando se acumula en ellos (Dijkhuizen *et al.*, 1985; Peinador *et al.*, 1999) y puede ser utilizado como única fuente de carbono y energía por bacterias conocidas como metilótrofas facultativas, las cuales lo oxidan mediante la enzima metanol deshidrogenasa (Radajewski *et al.*, 2002). Esta enzima generalmente es sintetizada a bajos niveles en presencia de substratos con numerosos carbonos y es inducida al adicionar metanol al medio de cultivo (Goodwin y Anthony, 1995). La mayoría de las bacterias que oxidan al metanol se caracterizan por utilizar al ciclo de la vía de la serina para dar origen al formaldehído el cual es incorporado en la biomasa celular. Estos microorganismos metilótrofos habitan en una gran variedad de ambientes naturales (Vorob'ev *et al.*, 2009).

Las bacterias metilótrofas comparten la propiedad de utilizar fuentes reducidas de carbono, muchas de ellas están asociadas simbióticamente con plantas y son comunes en el suelo; su diversidad es muy amplia e incluye a los taxa α , β y γ -Proteobacteria, además de los Firmicutes (Cristales *et al.*, 2010). Se ha observado que muchas de ellas tienen efectos benéficos en el crecimiento de las plantas al producir fitohormonas, controlar patógenos y eliminar compuestos tóxicos (Swain y Ray, 2009; Mckenzie *et al.*, 2006).

Además de oxidar al metanol, las bacterias metilótrofas son capaces de tolerar o degradar xenobióticos (Wright y Reddy, 2001) como el benceno, el estireno, el naftaleno, el tolueno e isómeros de xileno que son considerados tóxicos y cancerígenos, aún a bajas concentraciones; algunos de estos son comunes en ambientes naturales (Mutzel *et al.*, 1996; Acuña *et al.*, 2008).

Es necesario analizar las bacterias del humedal de La Mixtequilla donde constituyen un componente esencial, cumplen una función clave en la degradación la materia orgánica por su capacidad para utilizar, como fuentes de carbono y energía, a ciertos carbohidratos; producir enzimas extracelulares y de reducir nitratos y nitritos, todo ello en su conjunto, les permite participar en los ciclos de nutrientes; además de ello, son capaces de crecer en presencia de alcoholes y compuestos aromáticos, esto último las hace cumplir un papel importante en la biorremediación de ambientes impactados por este tipo de compuestos, mismos que podrían estar presentes en el humedal de La Mixtequilla.

OBJETIVOS

General

Aislar, identificar y caracterizar bacterias metilótrofas que habitan en el agua de la zona anegadiza (inundada) del humedal de La Mixtequilla, Veracruz.

Particulares

Aislar y obtener cultivos puros de bacterias metilótrofas, mediante el uso de un medio de cultivo enriquecido con metanol.

Caracterizar las bacterias metilótrofas mediante su capacidad para utilizar, como fuentes de carbono y energía, diferentes compuestos orgánicos con uno o más átomos de carbono.

Conocer la respuesta de las bacterias metilótrofas aisladas al ser expuestas a antibióticos.

Identificar las bacterias metilótrofas mediante el análisis de su material genético (16S ADNr).

MARCO TEÓRICO

Los humedales son ecosistemas acuáticos inundados natural o artificialmente, saturados por agua subterránea y superficial en gran parte del año (Heinz-Ulrich, 1993). Su drenaje es escaso pero reciben agua pluvial y de ríos, que les aportan nutrientes (Torres-Alvarado *et al.*, 2005).

La importancia ecológica de los humedales radica en la riqueza de su biodiversidad, por lo que rivalizan con las selvas tropicales y son de gran importancia para que se cumplan los ciclos de vida de plantas y animales, endémicos y migratorios (Torres-Alvarado *et al.*, 2005 citado en Núñez-Cardona *et al.*, 2008).

Torres *et al.* (2002) definen a los humedales como componentes de la biósfera que juegan un papel fundamental en el balance geoquímico del carbono, nitrógeno y azufre; comprenden diversos ambientes tanto naturales como artificiales; generalmente están localizados en áreas con drenaje deficiente que se caracterizan por estar permanente o temporalmente inundados por aguas dulces, estuarinas (salobres) o salinas; incluyen, además, regiones marinas que no exceden de los seis metros de profundidad con respecto al nivel medio de las mareas bajas.

La clasificación de los humedales está principalmente determinada por las propiedades hidrológicas, ecológicas y topográficas, el régimen de nutrientes, la diversidad de plantas y la cantidad de materia orgánica. Establecer una buena clasificación de humedales no es fácil porque la terminología usada en los diferentes países es compleja y confusa (Torres-Alvarado *et al.*, 2005). Los humedales naturales están concentrados a altas latitudes del hemisferio Norte donde la permeabilidad impide el drenaje del suelo y dominan los histosoles con un 95%, pero también en los trópicos, donde las tasas de precipitación son altas (Torres-Alvarado *et al.*, 2005).

La vegetación de los humedales está adaptada a las condiciones de humedad; la abundante materia orgánica está constituida por polímeros orgánicos como pectinas y ligninas que son transformadas a oligopolímeros, monómeros, disacáridos y ácidos grasos (Worm *et al.*, 2001; Torres-Alvarado *et al.*, 2005; Kolb, 2009), mismos que son hidrolizados a alcoholes simples y éstos a diversos ácidos orgánicos como los ácidos acético, propiónico y butírico (González-Ávalos y Longoria-Ramírez, 2005) los

cuales a su vez son transformados en acetato, formiato y finalmente en metano (Torres-Alvarado *et al.*, 2005).

Mediante procesos de descomposición anaerobia, los humedales actúan como emisores importantes de CO₂ y CH₄ (Álvarez, 2005); su producción y oxidación se ven afectadas por otros factores como el contenido de agua en el suelo, el tipo de vegetación, temperatura y pH (Hanson y Hanson, 1996).

El metano es un hidrocarburo producido anaeróbicamente por miembros de los diferentes géneros de bacterias metanógenas, como resultado de sus actividades metabólicas (Torres *et al.*, 2002). Todos los microorganismos productores de metano pertenecen al Dominio Archaea y cuentan con diversas formas y arreglos celulares (Torres-Alvarado *et al.*, 2005); son organismos ubicuos que coexisten con otros microorganismos en los ambientes naturales y que han existido desde hace billones de años (Pesaro y Widmer, 2002).

Casi el 70% del metano total que se produce en los humedales se deriva del acetato (Ritchie *et al.*, 1997) o de otros sustratos orgánicos simples como el metanol y las metilaminas generados a partir de oligopolímeros y monómeros, resultado de la degradación de la materia orgánica (Torres *et al.*, 2002).

Existen diferentes formas de difusión del metano hacia la atmósfera, una de ellas es a través de las plantas que habitan en los humedales las cuales presentan dos rutas de difusión: la primera se realiza a través de las raíces y rizomas que están en contacto con el sedimento anóxico (donde es generado) y, la segunda, cuando el metano se introduce entre las raíces y sale a través de los microporos (estructuras adaptativas para la entrada del oxígeno) de los tallos y estomas de las hojas. El metano además de ser emitido por las plantas también es difundido en forma de burbujas a partir del agua y sedimento (Torres-Alvarado *et al.*, 2005). Se estima que los humedales emiten en forma de metano aproximadamente el 25% del carbono orgánico que fijan, lo que representa entre el 15 y el 20% del metano atmosférico (Álvarez, 2005).

La concentración del metano en la atmósfera es de 1.7 ppm, menor a la del CO₂ (345 ppm); el metano absorbe más luz solar, lo cual favorece el efecto invernadero (Torres *et al.*, 2002). Una fracción del metano que se genera (10-30%) puede ser oxidado bajo condiciones aerobias (con oxígeno como aceptor de electrones) al ser

utilizado como fuente de carbono y energía por una gran diversidad de microorganismos metanótrofos (Torres-Alvarado *et al.*, 2005).

De acuerdo con Brusseau *et al.* (1994), estos microorganismos son clasificados en dos grupos: uno comprende a los metanótrofos tipo I e incluye a β y γ -Proteobacteria (Radajewski *et al.*, 2002), las cuales utilizan la vía ribulosa monofosfato (RuMP) para la asimilación del carbono. Ejemplos de éstas son los géneros *Methylomonas*, *Methylobacter* y *Methylococcus*. El grupo de los metanótrofos tipo II lo conforman microorganismos pertenecientes a las α -Proteobacteria que emplean el ciclo de la vía serina para la asimilación del carbono y está integrado por los géneros *Methylosinus* y *Methylocystis*. Estos dos grupos de metanótrofos (tipo I y tipo II) han sido considerados como metilótrofos obligados (Lidstrom, 2006).

Existe un tercer grupo de bacterias metanótrofas conocido como tipo X el cual incluye a *Methylococcus capsulatus*, una especie metanótrofa obligada capaz de fijar autotróficamente el CO_2 (Brusseau *et al.*, 1994) y de poseer la enzima metanol deshidrogenasa para la asimilación del metanol (Patel *et al.*, 1978). Otro tipo de bacterias capaces de oxidar al metano son las bacterias nitrificantes y Firmicutes (Brusseau *et al.*, 1994; Torres-Alvarado *et al.*, 2005) que también contribuyen con la disminución del metano a la atmósfera al sintetizar la enzima extracelular metanomonoxigenasa (MMO) para dar origen al metanol (Hanson y Hanson, 1996).

El metanol en el suelo puede encontrarse heterogéneamente distribuido y en concentraciones no detectables, siendo clave para muchos microorganismos metilótrofos (Kolb, 2009). Este compuesto se origina gracias a la degradación de peptinas y ligninas (Madhaiyan *et al.*, 2007); su emisión a la atmósfera es de 4.9×10^{12} mol/año (Kolb, 2009); su periodo de vida es de 5-12 días (Millet *et al.*, 2008). Cabe señalar que el metanol y el metano en el aire contribuyen al conjunto de compuestos orgánicos volátiles que participan en la formación de ozono troposférico (Kolb, 2009).

Solo algunas bacterias oxidadoras de metanol (metilótrofas) son capaces de oxidar también el metano, sin embargo, se ha logrado aislar una gran diversidad de bacterias metilótrofas facultativas capaces de utilizar como única fuente de carbono y energía el metanol (Mancinelli *et al.*, 1981), gracias a la intervención de la enzima metanol-deshidrogenasa para dar origen al formaldehído. Este compuesto es

oxidado en el citoplasma (vía metabólica de C₁) mediante la enzima formaldehído deshidrogenasa y finalmente es asimilado para la generación de biomasa celular o la formación de dióxido de carbono por el ciclo de la vía serina.

El formaldehído es un compuesto tóxico para los seres vivos y es el intermediario principal del metabolismo metilótrofo (Chongcharoen *et al.*, 2005).

Para asimilar el metanol, las bacterias metilótrofas pueden utilizar el ciclo de la vía serina y así convertir dos formaldehídos y una molécula de CO₂ en un compuesto de tres átomos de carbono (C₃); o bien el ciclo de la ribulosa monofosfato (RuMP), para transformar tres formaldehídos en un compuesto de tres carbonos (Brusseau *et al.*, 1994; van Dien y Lidstrom, 2001).

Las primeras bacterias aerobias oxidadoras de metanol fueron descritas en 1892. Un ejemplo de ellas es *Bacillus methylicus*; actualmente se han aislado numerosas especies (Kolb, 2009) y comprenden grupos heterogéneos pertenecientes a la subclase de las α -, β - y γ -Proteobacteria (Miller *et al.*, 2005).

Las bacterias metilótrofas facultativas han sido aisladas a partir de suelo, sedimentos de lagos, dunas, aire, agua (dulce y marina), de la superficie de una variedad de plantas y partes de éstas como sus raíces, hojas y semillas (van Aken *et al.*, 2004).

De acuerdo con Madhaiyan *et al.* (2009) las bacterias oxidadoras de metanol se dividen en dos grandes grupos considerando los tipos de compuestos orgánicos que pueden utilizar: 1) los metilótrofos facultativos restringidos, pertenecientes a las α -Proteobacteria como *Hyphomicrobium* que utiliza la vía serina para asimilar el formaldehído; de las β -Proteobacteria los géneros *Methylophilus*, *Methylobacillus* y dentro de las γ -Proteobacteria está el género *Methylophaga*, que utilizan la vía de la RuMP. Colby y Zatman (1975) mencionan que este grupo de bacterias no usan el metano, pero sí crecen sobre un rango restringido de compuestos de varios carbonos.

El grupo 2 lo conforman los metilótrofos facultativos típicos o menos restringidos que cuentan con representantes dentro del grupo de las α -Proteobacteria e incluye a los géneros *Methylobacterium*, *Aminobacter*, *Methylorhabdus*, *Methylopila*, *Methylosulfonomonas* y *Marinosulfonomonas* que utilizan la vía de la serina para la asimilación del metanol. En tanto, los géneros *Paracoccus*, *Xanthobacter*,

Ancylobacter, *Thiobacillus*, *Rhodopseudomonas* y *Rhodobacter* utilizan el ciclo Calvin-Benson-Bassham (CBB) para fijar al CO₂. Finalmente, dentro de este grupo existen miembros de las γ -Proteobacteria como son los representantes de los géneros *Pseudomonas* y *Acetobacter* que utilizan la RuMP para fijar el CO₂; además de los Firmicutes como los del género *Bacillus* (Ej. *Bacillus subtilis*) y Actinobacterias (Ej. *Arthrobacter*); todos estos utilizan la vía de la RuMP (Lidstrom, 2006).

Jenkins *et al.* (1987) mencionan que las bacterias metilótrofas facultativas menos restringidas o típicas crecen sobre un rango amplio de compuestos que utilizan como única fuente de carbono y energía, ejemplos de ellos son el tetrametilamonio, trimetilamina, dimetilamina, glucosa, glutamato, citrato, alanina y betaina (Colby y Zatman, 1975).

Otros grupos de bacterias metilótrofas facultativas aún no clasificadas pertenecen a las γ -Proteobacteria como *Klebsiella pneumoniae* (Goodwin y Anthony, 1995), *E. coli* (Doronina *et al.*, 2003), *Pantoea citrea* (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008) además del género *Acinetobacter*, algunas Firmicutes como *Bacillus stearothermophilus* (Arfman *et al.*, 1997) y *Bacillus methanolicus* (Bystrykh *et al.*, 1993). Las bacterias metilótrofas facultativas aportan beneficios importantes a las plantas tales como inducir la nodulación en las raíces; dominan en sus rizósferas y tejidos (Madhaiyan *et al.*, 2007) debido a que requieren compuestos que contengan nitrógeno para su crecimiento. Algunas de estas bacterias son miembros de los géneros *Xanthobacter*, *Ancylobacter*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylococcus*, *Methylocella*, *Methylocapsa* (Kolb, 2009), *Methylobacterium* que son capaces de fijar nitrógeno (van Aken *et al.*, 2004). Otras bacterias metilótrofas pertenecientes al género *Methylobacterium* producen fitohormonas que estimulan la germinación de semillas, producen vitamina B₁₂ y el ácido indol acético (IAA) que favorecen el desarrollo de plantas acuáticas y terrestres (Madhaiyan *et al.*, 2006; Madhaiyan *et al.*, 2007).

De acuerdo con Mikesell *et al.* (1993) y Kolb (2009) los nitratos podrían ser clave para el desarrollo de las bacterias oxidadoras de metanol, debido a que son aceptores alternativos de electrones que aportan oxígeno para la reacción de oxigenasas. Por tal razón algunos microorganismos compiten por el nitrato y el amonio con otros microorganismos presentes en el suelo (Kolb, 2009).

Las bacterias metilótrofas producen la metanol deshidrogenasa que además de oxidar el metanol a formaldehído, preferentemente cuando el metanol se encuentra

como única fuente de carbono y energía, también es útil para oxidar una amplia variedad de alcoholes primarios como el etanol y butanol (Gómez-Manzo *et al.*, 2005).

Especies de *Gluconobacter*, *Acetobacter* y otros géneros de bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium* y *Arthrobacter*, poseen un conjunto de deshidrogenasas (Flores-Encarnación *et al.*, 2004) como la metanol-deshidrogenasa, etanol-deshidrogenasa, 1-butanol-deshidrogenasa, propanodiol-deshidrogenasa, para oxidar una amplia variedad de alcoholes primarios como metanol, etanol, 1-butanol e isopropanol a aldehídos y cetonas (Hou, 1984; Gómez-Manzo *et al.*, 2005).

Algunas deshidrogenasas como la etanol deshidrogenasa han sido aisladas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, están asociadas a la membrana citoplasmática y poseen un sitio activo catalítico orientado hacia el lado periplasmático (Flores-Encarnación *et al.*, 2004), otras como la 1-butanol-deshidrogenasa son solubles en el periplasma (Gómez-Manzo *et al.*, 2005).

Tanto el etanol como el butanol son principalmente productos de la degradación anaerobia de compuestos orgánicos como la glucosa, galactosa, manosa, lo cual es llevado a cabo por miembros del género *Clostridium*. Además de su producción natural son procesados químicamente y se han utilizado en la industria automotriz como aditivos en la gasolina (Rajchenberg-Ceceña *et al.*, 2009).

El butanol, como otros alcoholes primarios, es tóxico para los microorganismos al desestabilizar la membrana celular e interrumpir funciones como el transporte de moléculas (nutrimentos), incluyendo azúcares (Rajchenberg-Ceceña *et al.*, 2009).

Además de utilizar el metanol y otros alcoholes primarios, las bacterias metilótrofas facultativas (Ej. *Pseudomonas aminovorans*, *Hyphomicrobium* y *Methylobacterium*) son capaces de crecer en metilaminas (Colby y Zatman, 1973; van Dien y Lidstrom, 2001), incluyendo los hidrocarburos aromáticos policíclicos que son contaminantes muy tóxicos y cancerígenos (Vila *et al.*, 2001) además de deprimir el sistema nervioso central (Lovanh *et al.*, 2002). Dentro de ellos están el tolueno, el xileno (y sus isómeros) (van Aken *et al.*, 2004; Chongcharoen *et al.*, 2005) y el etileno ó etilbenceno el cual puede inhibir el crecimiento de las plantas y la prolongación de sus raíces (Madhaiyan *et al.*, 2006).

Los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), son comunes en sitios contaminados por depósitos subterráneos, lugares en donde se dan derrames accidentales de petróleo; también están presentes en la gasolina y el diesel. A todos estos se les ha considerado como fuentes importantes de contaminación de suelos y aguas subterráneas, sedimentos y suelos sumergidos (Littlejohns y Daugulis, 2008; Acuña *et al.*, 2008). Los BTEX son degradados a catecol (alcohol) mediante enzimas dioxigenasas, y por las catecol dioxigenasas a ácidos *cis-cis* mucónicos (Lovanh *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2009).

Yeon y Yoo (2002) y Torres (2003) mencionan que para la degradación de los BTEX, las enzimas son inducidas mediante la exposición bacteriana a éstos, y la capacidad de las bacterias para degradarlos depende del tiempo de exposición así como de las condiciones ambientales en las que se desarrollan. Esto se debe a que las bacterias en su ambiente natural se encuentran expuestas a varios compuestos aromáticos y cationes de metales pesados a los cuales responden mediante mecanismos diferentes estableciendo barreras de permeabilidad. Uno de los principales mecanismos son las bombas de eflujo activo (Putman *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2010) que están presentes en algunas especies del género *Pseudomonas* (Duque *et al.*, 2004).

Asimismo, el catabolismo del tolueno y el xileno por las bacterias incrementa su solubilidad en el agua y de esta forma se reduce el riesgo de contaminación al ser utilizados como fuentes alternativas de carbono (Da Silva y Alvarez, 2004; Mukerjee-Dhar *et al.*, 2005).

La amplia distribución de las bacterias metilótrofas facultativas y de otras bacterias como los miembros del género *Pseudomonas* en ambientes naturales contaminados por compuestos aromáticos tóxicos, podría ser el centro de atención para biorremediación (van Aken *et al.*, 2004; Gómez-Manzo *et al.*, 2005; Leedjärv *et al.*, 2008).

Dentro de las características de las bacterias oxidadoras de metanol están su resistencia a la deshidratación, a la luz ultravioleta, a la radiación ionizante y a temperaturas altas (Lidstrom y Chistoserdova, 2002; van Aken *et al.*, 2004). Algunas especies de bacterias metilótrofas típicas como las pertenecientes al género *Methylobacterium* han sido aisladas de algunas fuentes clínicas y consideradas como patógenos oportunistas en los seres humanos (van Aken *et al.*, 2004).

Además, han mostrado resistencia a antibióticos como nitrofurantoina y trimetoprim/sulfametoxazol; presentan susceptibilidad a los aminoglucósidos (Chen-Hsiang *et al.*, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Descripción del área de estudio

El humedal de La Mixtequilla se encuentra en el Estado de Veracruz (Fig. 1), entre las coordenadas 18°32'084" Norte y 95° 57'538" Oeste, a una altitud de 25 msnm; colinda con los Municipios de Alvarado al Norte; al Sur con Tierra Blanca e Ixmiquilpan; al Este con Alvarado y Acuña; al Oeste con Tierra Blanca y Tlalixcoyan (Signoret *et al.*, 2005; Rivera-Becerril *et al.*, 2008). Su clima es de tipo Aw2(i)w", (cálido), con temperatura media anual de 26.1°C; la más baja se presenta en enero (22.3°C) y la más alta en junio (28.6°C). La zona presenta poca oscilación térmica con lluvias en verano, su precipitación anual es de 1828 mm; hay presencia de canícula en agosto. El mes más lluvioso es septiembre (322.9 mm) y el más seco es marzo (20.7 mm); en la mayor parte del año los vientos sobre la zona vienen del Norte (Rivera-Becerril *et al.*, 2008).

El 61.8% de la superficie de La Mixtequilla son llanuras de inundación que se ubican en los bordes de ríos o arroyos; estas llanuras se alimentan de agua pluvial, agua subterránea o por el retroceso del agua de los ríos por influencia marina. Este sistema se encuentra entre el curso de los ríos Blanco (conocido localmente como río Camarón) y Papaloapan (Signoret *et al.*, 2005; Rivera-Becerril *et al.*, 2008).

En los márgenes del río Camarón se encuentran potreros que se inundan de junio a noviembre (promoviendo el desarrollo de comunidades de plantas y animales adaptados a estas condiciones); se secan de diciembre a mayo por la evaporación y la transpiración de plantas emergentes, así como por la permeabilidad del suelo (Rivera-Becerril *et al.*, 2008).

Los habitantes de La Mixtequilla se dedican a la agricultura, ganadería, pesca y a la captura de reculillas (*Procambarus acanthophorus*). En este lugar, PEMEX ha construido pozos para la extracción de gas en donde algunos de sus pobladores emplean su fuerza de trabajo (Rivera-Becerril *et al.*, 2008).

b) Ubicación de los puntos de muestreo

Para coleccionar las muestras de agua se seleccionaron dos puntos, uno ubicado en el potrero El Llanete (PLL) y el otro en el potrero Don Rufino (PDR); ambos están separados longitudinalmente por el río Camarón (Figura 1). El muestreo se realizó a finales de la época de lluvias (noviembre de 2008).

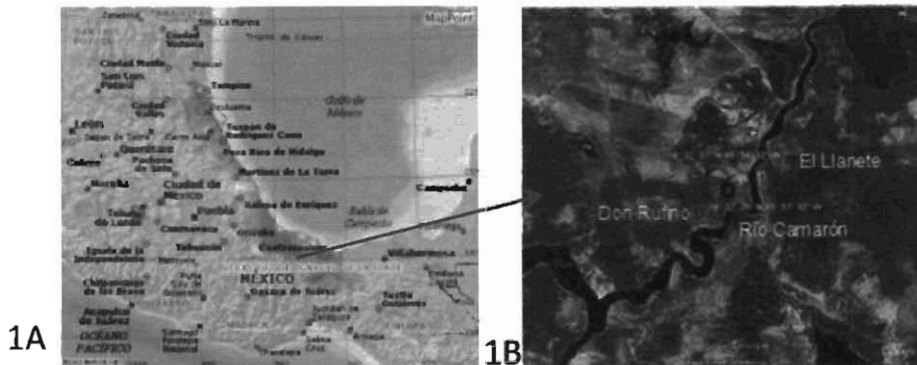


Figura 1. A) Ubicación del Estado de Veracruz y 1.B) puntos de muestreo (potreros El Llanete y Don Rufino) (Rivera-Becerril *et al.*, 2008).

c) Registro de las variables ambientales

Los puntos de muestreo se ubicaron geográficamente mediante un geoposicionador; con un termómetro convencional se hicieron registros de la temperatura ambiental y del agua. Con un YSI se registró la salinidad y el pH del agua; para la turbidez y profundidad se utilizó un disco de secchi y para la cobertura de la nubosidad se hicieron observaciones directas.

d) Colecta de las muestras

En el potrero El Llanete se coleccionaron dos muestras, una de agua del nivel subsuperficial (PLLS) y otra del fondo (PLLF). En el potrero Don Rufino se coleccionó una muestra de agua (PDRA) y una de suelo húmedo (PDRS) a un metro de distancia de donde se coleccionó la muestra de agua.

Para coleccionar las muestras de agua se utilizaron frascos de vidrio estériles de 250 mL de capacidad y para la de suelo húmedo una jeringa estéril sin punta de 10 cm³. Todas las muestras se conservaron a 5°C y se procesaron en un laboratorio provisional instalado en la casa de la familia Yépez (Núñez-Cardona *et al.*, 2009).

e) Procesamiento de las muestras

Con las muestras de agua y en condiciones estériles, se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} en tubos de ensaye que contenían 9.0 mL de solución salina (0.8 g de NaCl por litro de agua destilada).

En un frasco de vidrio conteniendo 25.0 mL de solución salina estéril se suspendieron 5.0 cm^3 de la muestra de suelo húmedo y se hicieron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) con pipetas serológicas graduadas estériles de 5.0 mL. A partir de las diluciones de agua y suelo se tomaron 0.1 mL y se estriaron con un asa de Digralsky, en cajas Petri conteniendo medio base con metanol (Tabla 1). Los cultivos se incubaron durante 24-48 horas a 28°C .

Tabla 1. Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de bacterias oxidadoras de metanol (Núñez-Cardona *et al.*, 2009)

Compuestos	Cantidad
NaCl	1.00 g
KNO ₃	1.00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 g
K ₂ HPO ₄	0.23 g
Agar bacteriológico	15.00 g
Metanol	5.0 mL
*Solución de cloruro férrico	1.0 mL
**Solución de elementos traza	1.0 mL
Agua destilada	1000.0 mL
pH	6.8

*Solución de cloruro férrico. Para la preparación de esta solución se agregan 1.2 g de FeCl₃·6H₂O en 1000 mL de agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos y se conserva a 5°C (Carballo-Cruz, 1985).

**Solución de elementos traza (Van-Niel, 1971), modificado por Núñez-Cardona *et al.* (2009). Cada 1000 mL de agua destilada contienen: 10.0 mg de ZnSO₄·7H₂O; 3.0 mg de MnCl₂·4H₂O; 3.0 mg de H₃BO₃; 2.0 mg de CoCl₂·6H₂O; 1.0 mg de CuCl₂·2H₂O; 2.0 mg de NiCl₂·6H₂O; 3.0 mg de Na₂MoO₄·2H₂O, esterilizar en autoclave a 121°C , durante 20 minutos y conservar a 5°C .

f) Aislamiento y obtención de cultivos bacterianos puros

Las colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo base con metanol se seleccionaron al azar y se hicieron registros del color y se resembraron en viales conteniendo agar nutritivo; se les aplicó la técnica de siembra y resiembra para obtener cultivos puros, su uniespecificidad se comprobó mediante observaciones al microscopio óptico, previa tinción de Gram. Una vez ratificada la pureza de los cultivos bacterianos, estos fueron conservados en viales conteniendo agar nutritivo inclinado y a 5°C .

g) Caracterización morfológica celular de los aislados bacterianos

Para la caracterización morfológica celular de los aislados bacterianos, se aplicó la tinción Gram, se registró su forma celular y su respuesta a dicha tinción. La descripción de la técnica se presenta en el Anexo I A.

h) Caracterización fisiológica y catabólica de los cultivos bacterianos puros

Los cultivos bacterianos puros fueron caracterizados mediante pruebas fisiológicas, la producción de enzimas extracelulares, así como por su capacidad de reducir nitratos, nitritos y producir H₂S e indol.

Caracterización fisiológica

Se evaluó la capacidad de los cultivos bacterianos de crecer o tolerar concentraciones diferentes de NaCl; se utilizó un medio compuesto por 1000 mL de agua destilada, 1.0 g de extracto de levadura, 1.0 g de peptona bacteriológica, 1.0 mL de cloruro férrico y 15.0 g de agar bacteriológico. A este medio de cultivo se le adicionaron por separado diferentes concentraciones de NaCl (5.0, 10.0 y 15.0 g/L); como blanco se preparó un medio de cultivo sin NaCl. En todos los casos se ajustó el pH a 7.5; se esterilizó por autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 20 minutos (Anexo I B) y se distribuyó el medio de cultivo en cajas Petri. Antes de inocular estos medios, los cultivos bacterianos fueron suspendidos en 2.0 mL de caldo nutritivo contenido en tubos de ensaye, se incubaron durante 30 minutos a 28°C y con la ayuda de una asa de siembra de punta plana se hicieron los inoculos y posteriormente fueron incubados a 28°C durante 24-48 horas. La prueba fue positiva cuando el crecimiento en los medios de cultivo, con salinidades diferentes, fue mayor que el crecimiento observado en el medio de cultivo testigo (sin NaCl).

Caracterización catabólica de los cultivos bacterianos puros

Se examinó la capacidad catabólica de los cultivos bacterianos puros en base rojo de fenol (BIOXON) al que se le adicionó, por separado, diferentes substratos que incluyeron glucosa, lactosa, manitol, manosa, sacarosa, maltosa y fructosa (5.0 g/L de cada uno). En el medio citrato de Simmons se observó su capacidad para utilizar citrato como única fuente de carbono y energía; en medio lisina descarboxilasa se verificó su capacidad para degradar el aminoácido lisina. Todos los cultivos fueron incubados durante 24-48 horas a 28°C (Anexo IC).

Metabolismo respiratorio

Se determinó el metabolismo respiratorio de los cultivos bacterianos mediante óxido-fermentación de glucosa, fructosa y sacarosa. Se utilizó medio base rojo de fenol (16.0 g/L) al que se adicionó, separadamente, sacarosa, fructosa y glucosa (5.0 g/L), además de 3.0 g/L de agar bacteriológico (Anexo I C).

La capacidad de los aislados bacterianos para reducir los nitratos y nitritos se examinó en un medio de cultivo con nitrato de potasio contenido en tubos de ensaye, a los que se les colocó una campana de Durham para observar la producción de N_2 . Los cultivos fueron incubados durante 24-48 horas a 28°C. La composición del medio de cultivo y la forma de cómo se hicieron las lecturas, se describen en el Anexo I C.

Producción de H_2S e indol por los cultivos bacterianos

Se observó la capacidad de los cultivos bacterianos de producir H_2S e indol y la movilidad al ser inoculados en medio SIM (BIOXON). Los cultivos fueron incubados durante 24-48 horas a 28°C. La respuesta positiva a la producción de H_2S se observó por la presencia de color negro en el cultivo; la de indol, por la presencia de un anillo de color rojo en la superficie del cultivo tras adicionar tres gotas de reactivo Kovacs (la composición de este reactivo se detalla en el anexo I C); finalmente, la movilidad fue positiva cuando el cultivo bacteriano creció alrededor del inóculo (Anexo I C).

Producción de enzimas extracelulares y el polisacárido de Levana

Para observar la capacidad de producir enzimas extracelulares, los cultivos bacterianos se inocularon en caldo nutritivo e incubaron durante 30 minutos a 28°C; pasado este tiempo y con un asa de vidrio de punta plana, se inocularon los medios de cultivo conteniendo substratos específicos para la producción de ADNasa, gelatinasa, esculinasa, ureasa, lipasa y amilasa. Estos fueron incubados durante 24-48 horas a 28°C. La composición de los medios de cultivo para la producción de enzimas extracelulares y el registro de los resultados se describen en el Anexo I D.

I) Exposición de los aislados a alcoholes y compuestos aromáticos

Se analizó la capacidad de los aislados de tolerar o utilizar diferentes alcoholes y compuestos aromáticos como fuentes de carbono; se consideraron las recomendaciones de Marco *et al.* (2004). Para ello, se utilizó el medio base descrito en la tabla 1, después de ser esterilizado por autoclave (121°C durante 20 minutos), se le adicionó por separado diferentes concentraciones de etanol, 1-butanol, 2-propanol, metanol, tolueno y xileno (Tabla 2). Los aislados bacterianos se hicieron crecer en 2.0 mL de caldo nutritivo contenido en tubos de ensaye, se incubaron durante 30 minutos a 28°C; posteriormente, con un asa de vidrio de punta plana se depositaron los inóculos en la superficie de cada uno de los medios de cultivo y se incubaron durante 72 horas a 28°C. Se consideró la capacidad de los cultivos bacterianos para utilizar como fuente de carbono o tolerar los compuestos probados, al observar mayor biomasa en éstos que en el blanco, al que no se adicionó algún compuesto (Núñez-Cardona *et al.*, 2009).

Tabla 2. Alcoholes y compuestos aromáticos ensayados

Compuestos	Fórmula	mL/L					
Etanol	C_2H_6O	5	10	15	20	30	40
Metanol	CH_3OH	5	10	15	20	30	40
Tolueno	$C_6H_5CH_3$	5	10	15	20	30	40
Xileno	$C_6H_4(CH_3)_2$	5	10	15	20	30	40
2-propanol	$CH_3CHOHCH_3$	5	10	15	20	30	40
1-butanol	$CH_3(CH_2)_2CH_2OH$	5	10	15	20	30	40

J) Respuesta de los cultivos bacterianos a los antibióticos ensayados

Para conocer la respuesta de los cultivos bacterianos a la exposición a los diferentes antibióticos, se tomó como base el procedimiento descrito por Correa-Basurto *et al.* (2007). Los antibióticos ensayados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Antibióticos ensayados, grupo al que pertenecen, concentración en microgramos (μg) y tamaño del halo de inhibición en milímetros (mm) considerado para determinar la respuesta de las bacterias a los antibióticos ensayados.

Antibiótico	Grupo	*C(μg)	R(mm)	I(mm)	S(mm)
Carbenciclina (CB)	Carboxipenicilinas	100	0-12	20-22	≥ 23
Amikacina (AK)	Aminoglucósido	30	0-14	15-16	≥ 17
Gentamicina (GE)	Aminoglucósido	10	0-12	13-14	≥ 15
Netilmicina (NET)	Aminoglucósido	30	0-12	13-14	≥ 15
Cefotaxima (CTX)	Cefalosporina 3ª generación	30	0-14	15-22	≥ 23
Cefalotina (CF)	Cefalosporina 1ª generación	30	0-14	15-17	≥ 18
Ceftriaxona (CRO)	Cefalosporina 3ª generación	30	0-13	14-20	≥ 21
Ampicilina (AM)	Penicilinas	10	0-13	14-16	≥ 17
Nitrofurantolna (NF)	Nitrofuranos	303	0-14	15-16	≥ 17
Trimetoprim-sulfametoxazol (STX)	Trimetoprima-Sulfanamidas	25	0-10	11-15	≥ 17
Cloranfenicol (CL)	Anfenicoles	30	0-12	13-17	≥ 18
Pefloxacina (PEF)	Quinolona 2ª generación	5	0-14	15-22	≥ 23

*C-concentración en microgramos (μg), R=resistente, I=intermedio, S=sensible

Para realizar este ensayo, se hicieron suspensiones celulares en 2.0 mL de caldo nutritivo y se incubaron durante 20 minutos a 28°C; después de ese tiempo, se inoculó 0.1 mL de la suspensión en cajas de Petri conteniendo agar Müeller-Hinton (Merck). Con una asa de vidrio estéril (asa de Digrafsky), se esparció el inóculo sobre la superficie del medio sólido y con pinzas estériles se colocaron los sensibilizadores con 12 antibióticos específicos para bacterias Gram negativas (BIORAD) y se incubaron a 28°C durante 24 horas.

La respuesta de los aislados bacterianos ante los antibióticos se determinó al medir el diámetro de los halos de inhibición tomando como base el manual del proveedor (BIORAD), que clasifica a los cultivos bacterianos en resistentes, sensibles e intermedios (Tabla 3)

k) Identificación molecular de los cultivos aislados

Extracción del ADN total

Los ácidos nucleicos totales fueron extraídos mediante la técnica fenol-cloroformo. Para ello, los cultivos bacterianos fueron cultivados por estría en cajas Petri con medio LB (compuesto por 1.0 g extracto de levadura, agar-bactotripton y NaCl) y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Una vez disponibles los cultivos masivos, se adicionaron 1000 μL de agua estéril, se concentró la biomasa con una varilla de vidrio estéril; se recolectaron 500 μL de células y se colocaron en un tubo eppendorf estéril, al cual se le adicionaron 500 μL de fenol (que tiene como función romper las paredes celulares y separar las enzimas de los ácidos nucleicos), se agitó con un vortex (Shelton científico VSM-3) durante tres minutos y se centrifugó (centrífuga 5804

R) a 13,000 rpm durante tres minutos. Una vez separadas las fases, con una micropipeta se tomó la fase transparente (superficial) tratando de no tomar la fase intermedia (capa blanca) ni la fase amarilla del fondo del tubo. La fase transparente se colocó en un tubo eppendorf nuevo al cual se adicionaron 500 μL de cloroformo (que tiene como función conservar los ácidos nucleicos), se agitó en un vortex durante tres minutos y se centrifugó nuevamente durante tres minutos a 13,000 rpm. Posteriormente, de ese mismo tubo se tomó la fase superficial, se colocó en otro tubo eppendorf al que se adicionaron 50.0 μL de acetato de sodio (CH_3COONa 3M pH 5.3) que tiene como función precipitar los ácidos nucleicos y se agitó durante dos a tres segundos con vortex. Se adicionaron 1000 μL de etanol absoluto frío y puro ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$); se agitó durante dos a tres segundos con vortex, después se centrifugó durante 30 minutos a 14,000 rpm y se decantó el etanol dejando la pastilla en el fondo del tubo la cual se lavó nuevamente con etanol al 70% con el fin de eliminar residuos de fenol y cloroformo; posteriormente se agitó con un vortex de dos a tres segundos y se centrifugó durante 10 minutos a 14,000 rpm. Se retiró el etanol al 70% dejando únicamente la pastilla de ADN total misma que se dejó secar (se evaporaron los alcoholes) durante 30-60 minutos; después de ese tiempo se suspendió en 50.0 μL de agua estéril.

Para observar el ADN, se preparó un gel de agarosa al 1.0% (20.0 mL TBE 0.5x; 2.0 g de agarosa). Para ello, se calentó en un microondas durante cuatro segundos y se agregaron 0.5 μL de bromuro de etidio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$) (250 ng/mL); éste es un marcador para ácidos nucleicos que se intercala dentro de la molécula del ADN y hace que fluoreszca con luz ultravioleta. El gel se vació en una canastilla a la que se le colocó un peine con diez dientes para hacer los pozos; una vez sólido el gel se colocó en una cámara de electroforesis que contenía como tampón TBE 0.5x (0.5x es decir, cinco veces su concentración) con bromuro de etidio. El tampón hizo conexión con la energía eléctrica proveniente de la fuente de poder en la que está conectada la cámara de electroforesis; finalmente, cada uno de los pozos del gel se cargaron con una mezcla de 6.0 μL de agua estéril, 2.0 μL de buffer de carga con glicerol; 2.0 μL de muestra de ADN. Se aplicó la electroforesis a 120 V y con un transiluminador con luz UV, se observó el ADN.

Cuantificación del ADN total

El ADN de todas las muestras fue cuantificado siguiendo el procedimiento previamente ensayado con *E. coli*, mismo que se utilizó para estandarizar la técnica que se describe en los párrafos siguientes:

Con cada muestra de ADN de cada uno de los cultivos bacterianos se hicieron diluciones 1:100 (1.0 µL de ADN en 99.0 µL de agua) ó 1:50 (1.0 µL de ADN en 49.0 µL de agua), esto dependió de la cantidad del ADN que pudiera detectar el espectrofotómetro. Se hicieron las lecturas de absorbancia del ADN de doble cadena en un espectrofotómetro (eppendorf Biophotometer) a 260 nm.

El ADN se cuantificó considerando la siguiente fórmula (Manual Biolabs New England 2007.08 Technical Catalog, página 362):

$1.0 A_{260}$ = unidad de ADN de doble cadena = 50.0 µg/mL = 0.15 mM (en nucleótidos)

Se tomó la lectura de absorbancia de una dilución de ADN total de *E. coli* de 1:250 µL, dando como resultado 0.548 mg/mL del ADN, multiplicado por la densidad óptica de ADN de doble cadena de 50.0 µg/mL (0.548 mg/mL x 50.0 µg/mL) que es igual a 27.4 mg/mL; este es multiplicado por la dilución de ADN de 1:250 µL (27.4 mg/mL x 250 µL) igual a 6.850 mg/mL.

Para transformar µg/µL, se dividió entre 1000 µg/µL, se obtuvo como resultado 6.85 µg/µL y para transformar a nanogramos, 6.85 µg/µL se multiplicó por 1000 ng/µL = 6.850 ng/µL de ADN total.

La reacción de la PCR requirió de 100 ng/µL de ADN para lo cual se calculó un volumen necesario de la siguiente forma:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$C_1=6.850 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$V_1= X \text{ (desconocido)}$$

$$C_2=100 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$V_2=100 \mu\text{L}$$

C_1 = concentración 1 que es de 6.850 ng/µL

V_1 =Volumen 1 (fue calculado)

C_2 = concentración necesaria en ng/µL (100 ng/µL)

V_2 = volumen necesario en µL (100 µL)

$V_1 = [100 \text{ ng}/\mu\text{L} (100 \mu\text{L})] / 6.850 \text{ ng}/\mu\text{L} = 1.45 \mu\text{L}$, el cual se diluyó en 100 μL de agua inyectable, de la siguiente forma: $V_1 = 1.45 \mu\text{L}$ de ADN se adicionaron en 98.55 μL de agua inyectable con lo que se obtuvo un total de 100 μL . Se tomó 1.0 μL de la dilución, equivalente a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN, a utilizar en la reacción de PCR.

Amplificación (múltiples copias del fragmento) de la parte interna del gen 16S ADNr por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Después de cuantificado el ADN, se amplificó un fragmento interno del gen 16S ADNr de 1371 pb por PCR con la que se obtienen múltiples copias. Para ello, en una campana de flujo laminar (Class II, type A2 Biological Safety Cabinet) se prepararon las mezclas de reacción de la forma siguiente: en un tubo eppendorf de 20.0 μL se colocó agua inyectable, buffer *Taq* polimerasa, MgCl_2 , dNTPs; iniciadores universales para bacterias: *forward* FBac 5'ATCATGGCTCAGATTGAACGC3' y *reverse* CGO605R 3'CGGTGAATACGTTCCCGGG5' (Invitrogen), *Taq* polimerasa y 1.0 μL de la suspensión de ADN como molde (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN) (Tabla 4). Se preparó un control negativo sin ADN. Las mezclas de reacción fueron agitadas durante 2 segundos en un minivórtex, se colocaron en un termociclador (AB Applied Biosyst 2720 thermal cycler) y se sometieron a un programa de 25 ciclos a temperaturas y tiempos diferentes (Tabla 5).

Para observar las bandas de 1371 pb, las muestras fueron depositadas en pozos del gel de agarosa al 1% (6.0 μL de agua, 2.0 μL de buffer de carga y 2.0 μL de ADN producto de PCR) y 1.0 μL de marcador Lambda (λ BstE II) que sirvió como regla molecular. Las muestras se sometieron a electroforesis a 100 V.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la reacción de la PCR

Reactivos	Concentración del stock	Concentración de la reacción	Volumen (μL)
Agua	1.0 X	50.0 μL	32.75
Buffer	10.0 X	1.0 X	5.0
MgCl_2	14.0 mM	4.0 mM	8.0
dNTPs	10.0 mM	0.2 mM	1.0
FBac (iniciador)	10.0 mM	0.2 mM	1.0
CGO605R (iniciador)	10.0 mM	0.2 mM	1.0
<i>Taq</i> polimerasa	50.0 U/ μL	0.025 U/ μL	0.25
ADN molde	1.0 ng	100.0 $\text{ng}/\mu\text{L}$	1.0

mM=milimolar, 1.0X y 10.0X=1.0 y 10.0 veces su concentración, respectivamente, U/ μL =unidades por microlitro.

Tabla 5. Programa del termociclador para la amplificación del ADN

Programa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95.0	5'
Desnaturalización etapa final	95.0	30''
Temperatura media de hibridación	57.7	30''
Alargamiento inicial	72.0	30''
Alargamiento etapa final	72.0	5'
Enfriamiento	4.0	X

X=tiempo no determinado

Una vez corroborada la amplificación del fragmento esperado de 1371 pb en las muestras de ADN, de cada cultivo bacteriano, los productos de la PCR fueron purificados; para ello se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

Purificación de los productos de las reacciones de PCR

Los productos de la PCR fueron purificados con el fin de eliminar los residuos de fenol y cloroformo que podrían interferir en la secuenciación del ADN. Con este fin, los productos de la PCR se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 10.0 µL de acetato de sodio 3M, pH 5.3 (precipita o sedimenta el ADN) y 200 µL de etanol absoluto (elimina residuos de fenol y cloroformo). Se agitó suavemente se centrifugó durante 30 minutos a 14,000 rpm a 4°C; para sedimentar al ADN; se retiró el etanol absoluto cuidadosamente con una micropipeta sin tocar la pastilla, la cual se lavó con 300 µL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C; con una micropipeta se retiró el etanol y se dejó secar la pastilla. Posteriormente, el ADN se suspendió en 50 µL de agua inyectable y se verificó en un gel de agarosa al 1% donde se observó la banda de 1371 pb, se hizo la cuantificación del ADN producto de la purificación de la PCR para una última reacción (Tabla 6) con los iniciadores universales para bacterias CGO *forward* 465 (5'CTCCTACGGGAGGCAGCAG3') y CGO *reverse* 465 (3'CAGGATTAGATACCCTGGTAG5').

Reacción para secuenciar la parte interna del gen 16S ADNr producto de la PCR

Posteriormente, los productos de la PCR (fragmento del gen 16S ADNr de 1371 pb) fueron amplificados en su parte interna (para evitar errores de apareamiento de bases), esperando un producto de 465 pb. Para ello, teniendo la concentración de ADN amplificado y purificado, se realizó una reacción para la secuencia *forward*

(dirección 5' a 3') y una segunda reacción para la secuencia *reverse* (dirección 3' a 5') (Tabla 6). En cada reacción se adicionó 1.0 µL de mix compuesto por MgCl₂, dNTP y buffer *Taq* polimerasa, 150 ng/µL de ADN producto de la PCR purificada. El programa en el termociclador se presenta en la tabla 7.

Tabla 6. Reactivos utilizados para las reacciones de las secuencias *forward* (5' a 3') y *reverse* (3' a 5').

Reactivos	Concentración	Volumen (µL)
Mezcla	X	1.0
Buffer de secuencia	5X	2.0
Iniciador CGO <i>forward</i> 465	9.9 pmol	1.0
Iniciador CGO <i>reverse</i> 465	9.9 pmol	1.0
ADN (doble cadena)	150.0 ng/µL	Variable
Agua	X	Variable
Total	X	20.0

pmol=partes por mol, 5X=cinco veces su concentración (no conocida), X=concentración no conocida

Tabla 7. Programa del termociclador para las reacciones de secuencias.

Pograma	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	96	1'
Desnaturalización etapa final	96	10"
Temperatura media de hibridación	50	5"
Alargamiento	60	4'
Enfriamiento	4	X

X=indeterminado

Los productos de las secuencias *forward* y *reverse* ya amplificados se limpiaron y precipitaron por separado de la siguiente forma: se centrifugaron (durante 5 segundos), posteriormente, cada uno de ellos se transfirió a tubos eppendorf de 1.0 mL a los que se adicionó 5.0 µL de EDTA (125 mM, pH 8) y 60.0 µL de etanol absoluto (CH₃-CH₂-OH). Se agitó en vortex brevemente y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos; posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm y con una micropipeta se removió el sobrenadante de cada reacción inmediatamente después de centrifugar. Finalmente, las pastillas se lavaron con 250 µL de etanol al 70% y se centrifugaron a 14,000 rpm siguiendo la misma orientación de los tubos; los sobrenadantes se removieron cuidadosamente, nuevamente se adicionaron 250 µL de etanol al 70% y se centrifugaron a una velocidad de 14,000 rpm, durante 5 minutos, se removieron los sobrenadantes y se dejaron secar las pastillas durante 5

minutos. Por último, se secuenciaron en la Unidad de Ácidos Nucleicos del CINVESTAV-Zacatenco. Los electroferogramas de las secuencias *forward* y *reverse* de cada muestra de ADN (de cada cultivo bacteriano) se grabaron en un CD; se accedió a los archivos, con ayuda del programa BioEdit Sequence Alignment Editor y las secuencias *reverse* se invirtieron para alinearlas con las *forward*.

Las secuencias, en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, se seleccionaron y copiaron para abrirlas con el programa Vector NTI versión 6.0 en el cual se transformaron en una molécula nueva y se alinearon. Una vez alineadas se copiaron, se enviaron a un documento en Word en el cual se depuraron con el apoyo del electroferograma de la secuencia correspondiente (*forward* o *reverse*).

Las secuencias nucleotídicas depuradas de cada uno de los cultivos se registraron y sometieron a la aplicación BLAST, en la base de datos del Genbank en el NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en este se localizaron secuencias parciales del gen 16S ARNr de especies y géneros bacterianos relacionados. Las secuencias, de los cultivos bacterianos (especies y géneros localizados en el BLAST), se alinearon y se verificó la presencia del mismo número de pares de bases.

El archivo de las secuencias con el mismo número de pares de bases se abrió con el programa MEGA 4 para la elaboración de un árbol filogenético eligiendo la acción Bootstrap para encontrar el árbol con mayor parsimonia, utilizando el método Neighbor-Joining, UPGMA, seleccionando la opción de 500 réplicas para encontrar el árbol con mayor parsimonia (el mejor árbol de un promedio de 500 réplicas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 8 se presentan los registros de las variables ambientales de la zona de estudio, que fueron realizados el 18 de noviembre de 2008 (finales de la época de lluvias).

Tabla 8. Variables ambientales registradas en los Potreros El Llanete (PLL) y Don Rufino (PDR).

Muestras	Localización	T °C Amb.	T. °C agua	Transp Agua	Z (cm) del agua	pH	Salinidad del agua	Nubosidad (%)
PDR	18°32' 507" N 95°57' 200" O	25	24	12 cm	12	7	0.7	100
PLL	18°32' 623" N °56' 545" O	24	21.4	25 cm	40	7	0.2	99

T°C Amb=temperatura del ambiente, T°C agua=temperatura del agua. Transp. Agua=transparencia del agua. Z=profundidad del agua en centímetros.

La temperatura y la profundidad de la columna del agua en los dos puntos de muestreo fueron diferentes. Estas variaciones en la profundidad también fueron

registradas por Rivera-Becerril *et al.* (2008) quienes mencionan que durante el periodo comprendido del 2002-2004, en El Llanete fue mayor que la de Don Rufino. El pH registrado en los dos Potreros (PDR y PLL) concuerda con Signoret *et al.* (2005) y Rivera-Becerril *et al.* (2008).

Torres-Alvarado *et al.* (2005) argumentan que en la mayoría de los humedales naturales el pH es neutro; otros autores como Wright y Reddy (2001) mencionan que el pH en los suelos de los humedales varía entre 7 y 8, mientras que en un estudio realizado por Vorob'ev *et al.* (2009), en humedales de zonas boreales del hemisferio Norte observaron pH ácidos (3-5); este contraste se debe a que en el presente estudio se trata de una zona templada con abundante materia orgánica.

Por otro lado, la salinidad en el Potrero El Llanete, tanto en la superficie como en el fondo del agua, fue de 0.2 y en el Potrero Don Rufino de 0.7; el aumento de la salinidad en este último posiblemente se debe a la evaporación, ambos potreros son regados con aguas provenientes del Río Camarón, el cual lleva desechos municipales e industriales de diversos poblados, junto con agua marina (Rivera-Becerril *et al.*, 2008).

A partir del medio base con metanol se aislaron colonias bacterianas; tras aplicar la técnica de siembra y resiembra, se obtuvieron 81 cultivos puros que fueron caracterizados morfológicamente considerando el color, así como su forma celular (Tabla 9).

Tabla 9. Morfología celular y colonial de los cultivos puros obtenidos en las muestras de agua y suelo del humedal de La Mixtequilla.

Morfología/cultivos	PLL F 24	PLL S 21	PDRA 23	PDRS 13	Total 81	% de cultivos
Color de colonias						
Crema	22	15	16	12	65	80
Amarillo	2	6	3	1	12	15
Blanco	0	0	1	0	1	
Naranja	0	0	1	0	1	
Rosa	0	0	2	0	2	2
Morfología celular						
Bacilos	15	16	12	10	53	65.4
Cocos	3	4	7	0	14	17
Cocobacilos	6	1	4	3	14	17
Gram-positivo	1	2	1	0	4	5.0
Gram-negativo	23	19	22	13	77	95.0

PLL F=Potrero El Llanete fondo, PLL S=Potrero El Llanete superficie, PDRA=Potrero Don Rufino agua, PDRS=Potrero Don Rufino suelo.

Los resultados generales revelaron que la mayoría de los cultivos bacterianos (80%) presentaron colonias color crema, principalmente en las muestras provenientes de

PLLF (22) y PDRS (12) (Tabla 9). El porcentaje de colonias bacterianas de color crema fue mayor que en el lago de los Reyes Aztecas en donde se registró un poco más de la mitad (61%) (Correa-Basurto, 2007); éste es un humedal que también recibe agua de origen doméstico y de las actividades agrícolas que allí se desarrollan.

El color crema es característico en bacterias oxidadoras de metanol como *Arthrobacter methylotrophus* (Actinobacteria), una metilótrofa típica (Borodina *et al.*, 2002), y en *Methylibium petroleiphilum* (β -Proteobacteria), una metilótrofa facultativa restringida (Song y Jang-Cheon, 2007). El color amarillo lo presentó sólo el 15% de los cultivos bacterianos y el mayor número fue registrado en el PLLS (6 cultivos). La pigmentación rosa fue observada en dos cultivos y el color naranja en un cultivo, todos ellos aislados de la muestra del PDRA (Tabla 9). El color rosa es característico de bacterias metilótrofas facultativas típicas como las pertenecientes al género *Methylobacterium* (α -Proteobacteria) (van Aken *et al.*, 2004).

Gallardo *et al.* (2004) mencionan que los diferentes pigmentos como el amarillo, naranja y rojo son comunes en bacterias que se desarrollan en los ambientes acuáticos, como estrategia de protección frente a la acción fotodinámica de la luz solar a la cual suelen estar expuestas, principalmente aquellas que se encuentran en la superficie. Dicho color está asociado como una característica distintiva entre los diferentes grupos bacterianos.

La forma celular predominante en los cultivos bacterianos de todas las muestras fue bacilar (65%). Así mismo, la mayoría de los cultivos bacterianos (95%) fueron Gram-negativos (Tabla 9). Las bacterias con respuesta negativa a la tinción de Gram, poseen una capa de peptidoglicano que no retiene el colorante (Osvaldo, 2007).

En las figuras 2 y 3 se observan las formas celulares de algunos cultivos bacterianos procedentes de las muestras de agua del nivel subsuperficial y de fondo del Potrero El Llanete. Estas imágenes fueron tomadas en el Laboratorio de Genómica Ambiental del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-Zacatenco. Los cultivos bacterianos de la muestra de agua de fondo de El Llanete mostraron formas de bacilos cortos, como los que se presentan en la figura 2 (A-G) y de cocos (H-N), todos con respuesta negativa a la tinción de Gram, excepto el aislado K. En algunos cocos se observaron agregados celulares (I, K, L y N).

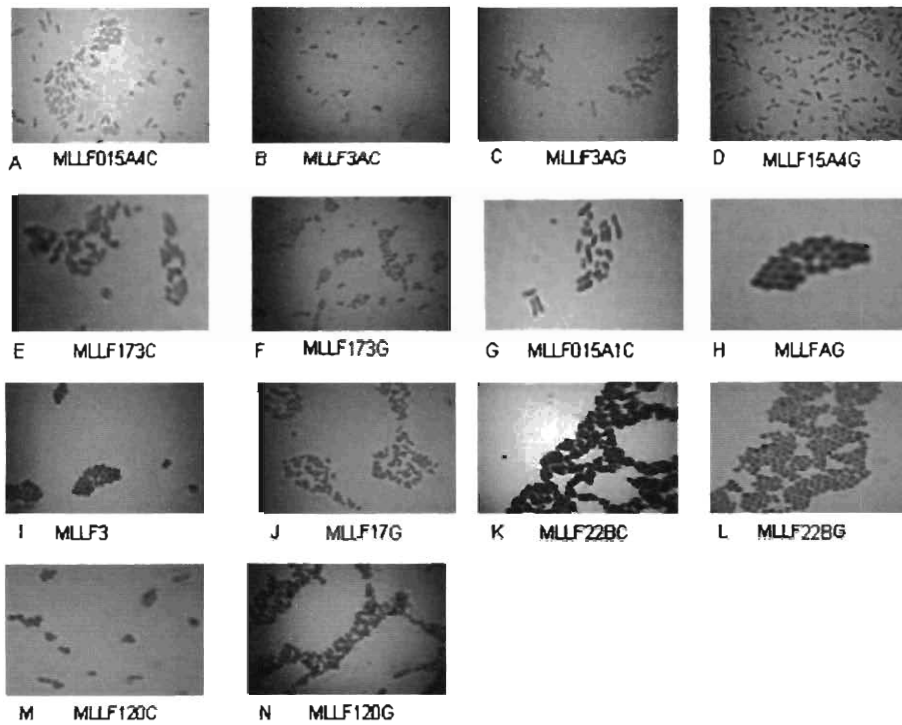


Figura 2. Morfología celular de algunos cultivos bacterianos aislados de la muestra de agua de fondo del Potrero El Llanete.

Los cultivos bacterianos de la muestra de agua de superficie del Potrero El Llanete presentaron forma de bacilos con respuesta negativa a la tinción de Gram (figura 3 de la O a la T); el aislado V presentó forma de coco con respuesta positiva a la tinción de Gram.

Cabe destacar que los aislados O, R, S y T formaron cadenas de células bacterianas. En el aislado S las células presentaron prolongaciones que podrían tratarse de flagelos; el aislado T presentó endoesporas (Fig. 3).

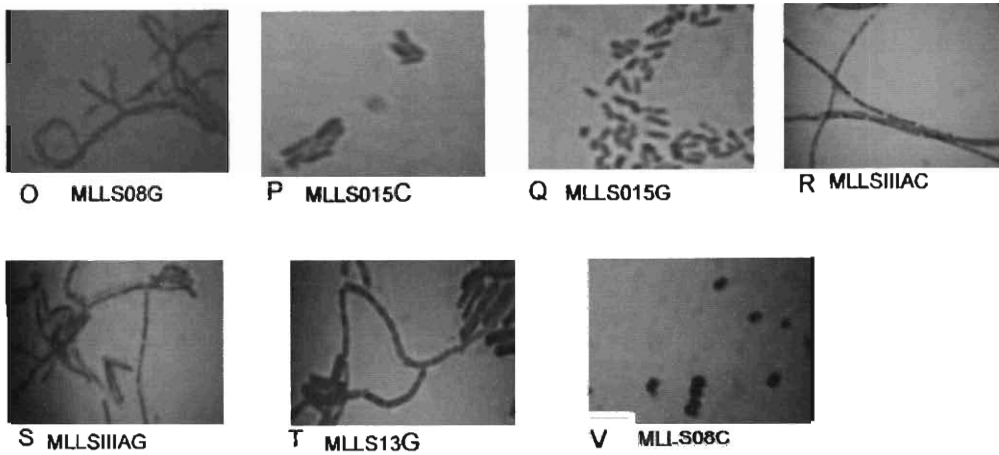


Figura 3. Morfología celular de algunos cultivos bacterianos aislados de la muestra de agua superficie del Potrero El Llanete del humedal de La Mixtequilla.

La movilidad fue observada en nueve aislados de PDRA, ocho de PLLF, cinco de PLLS y dos de PDRS. Esta es una característica de los miembros del género *Pseudomonas*, que presentan uno o más flagelos polares (Koneman *et al.*, 2003), así como de bacterias metilótrofas facultativas típicas pertenecientes a las α -Proteobacteria como *Methylobacterium hispanicum* (Gallego *et al.*, 2005) y de los géneros *Aminobacter*, *Methylopila*, *Methylosulfonomonas* (Miller *et al.*, 2005) y la especie metilótrofa facultativa restringida *Methylibium petroleiphilum* (Song y Jang-Cheon, 2007).

En la tabla 10 se muestran el número y el porcentaje de cultivos bacterianos puros, capaces de tolerar las tres concentraciones ensayadas de NaCl. Se observó que un porcentaje alto de cultivos bacterianos fueron capaces de crecer en presencia del 0.5%, 1.5% y 1.0% de NaCl; con esto se demuestra que las bacterias del humedal de La Mixtequilla son tolerantes a variaciones de salinidad.

Tabla 10. Número de cultivos de cada muestra y porcentaje total de cultivos del humedal de La Mixtequilla que toleraron concentraciones diferentes de NaCl.

NaCl(%)cultivos bacterianos	PLLF	PLLS	PDRA	PDRS	Total	Total (%)
0.5	14	11	13	5	43	81
1.0	9	8	11	5	33	77
1.5	13	7	9	5	34	79

PLLF= Potrero El Llanete fondo, PLLS=Potrero El Llanete superficie, PDRA=Potrero Don Rufino agua, PDRS=Potrero Don Rufino suelo

De acuerdo con Torres *et al.* (2006), las bacterias tolerantes a la salinidad también resisten la desecación que prevalece en la temporada de secas, en la que disminuye

el aporte fluvial, lo que provoca el incremento de la salinidad y el contenido alto de sulfatos.

La facultad de resistir la desecación podría presentarse también en las bacterias aisladas del humedal de La Mixtequilla, ya que fueron capaces de tolerar diferentes concentraciones de NaCl. Bacterias Gram-negativas que toleran un rango de 1.0-2.0% de NaCl pertenecen al género *Methylobacterium* (Gallego *et al.*, 2005) y a géneros metilótrofos Gram-positivos como *Arthrobacter* (metilótrofos típicos) e *Hyphomicrobium* (metilótrofo facultativo) que crecen en presencia de 1.5% de NaCl (Borodina *et al.*, 2002), además de los metilótrofos facultativos (acidófilos que crecen en 0.5% de NaCl) de las especies *Methylovirgula ligni* y *Beijerinckia mobilis* (Vorob'ev *et al.*, 2009). Pero existen bacterias que toleran rangos más altos de salinidad; por ejemplo *Bacillus subtilis* se desarrolla en presencia de 2.5 a 4.0% de NaCl; este microorganismo favorece la germinación de semillas y el crecimiento de plantas en los humedales (Swain y Ray, 2009) e incluye a los microorganismos metilótrofos facultativos capaces de oxidar al metanol (Bystrykh *et al.*, 1993).

Los resultados generales sobre la capacidad catabólica de los cultivos muestran que presentaron mayor actividad sobre la fructosa (72%), siguiendo la glucosa y sacarosa (63%), manosa (56%) y manitol (51%). De la misma manera, los cultivos de las muestras de PLLS y de PDRA crecieron bien en glucosa, fructosa, sacarosa y manosa (Tabla 11).

Los resultados expresados en la tabla 11 sobre la utilización de los carbohidratos concuerdan con los reportados por Rivera-Becerril *et al.* (2008), quienes observaron que bacterias aisladas de la Mixtequilla utilizaron como fuentes de carbono y energía, principalmente fructosa, glucosa y sacarosa.

Tabla 11. Utilización de carbohidratos y citrato por los cultivos bacterianos

Carbohidratos /cultivos bacterianos	PLL F 14	PLL S 11	PDRA 13	PDRS 5	Total 43	% aislados bacterianos
Glucosa	6	9	11	1	27	63
Lactosa	5	5	7	2	19	44
Manitol	5	6	9	2	22	51
Manosa	4	8	11	1	24	56
Sacarosa	8	9	9	1	27	63
Maltosa	1	9	5	1	16	37
Fructosa	9	9	10	3	31	72
Citrato	10	1	2	3	16	37

PLL F=Potrero El Llanete fondo, PLL S=Potrero El Llanete superficie, PDRA=Potrero Don Rufino agua, PDRS=Potrero Don Rufino suelo

Algunos miembros de bacterias oxidadoras de metanol que se especializan en utilizar principalmente la glucosa y fructosa son metilótrofos facultativos típicos como el género *Methylobacterium* que son aerobios estrictos (van Aken *et al.*, 2004), *Arthrobacter methylotrophus* (actinobacteria) (Borodina *et al.*, 2002) y el género *Methylibium* (Nakatsu *et al.*, 2006) considerado dentro de los metilótrofos facultativos restringidos.

El citrato, como única fuente de carbono, fue utilizado por menos de la mitad (37%) de los cultivos bacterianos del humedal de La Mixtequilla; la mayoría de ellos (10) proceden de la muestra de PLLF (Tabla 11). Estos resultados son similares a los expuestos por Rivera-Becerril *et al.* (2008) (4 cultivos de siete) donde también se observó que el citrato fue utilizado por aislados bacterianos. van Aken *et al.* (2004) y Gallego *et al.* (2005) indican que la utilización del citrato es característico de algunas bacterias metilótrofas facultativas típicas como las pertenecientes a los géneros *Methylobacterium* (α -Proteobacteria), *Arthrobacter* (Actinobacteria) y γ -Proteobacteria como *Pseudomonas* (Colby y Zatman, 1973; Borodina *et al.*, 2002), además de *Klebsiella* (Stock y Wiedeman, 2001).

Con base en los resultados de las capacidades catabólicas sobre los carbohidratos y el citrato, se puede decir que las bacterias aisladas del humedal de La Mixtequilla, cumplen un papel importante en la degradación de la materia orgánica al utilizar los carbohidratos (fructosa, glucosa y sacarosa) como única fuente de carbono. La glucosa, sacarosa y fructosa son comunes en las plantas (Lotz, 2006) y son ampliamente utilizados por bacterias entéricas (Koneman *et al.*, 2003) que habitan en los sedimentos de humedales de agua dulce; ejemplos de estas especies son *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea ananitis* y *Serratia odorifera* (Halda-Alija, 2004).

Carbohidratos con seis átomos de carbono como la glucosa y fructosa son degradados inicialmente a ácido pirúvico-acetato-acetil-CoA, dando como producto final acetona y alcoholes primarios como el butanol y etanol (Nielsen *et al.*, 2009), quedando disponibles para bacterias acuáticas como las que se encuentran en el humedal de La Mixtequilla.

En cuanto al metabolismo respiratorio, poco más de la mitad de los cultivos bacterianos (63%) fueron anaerobios facultativos (en glucosa, fructosa y sacarosa), principalmente los aislados procedentes de PLLF (9) y PDRA (9) (Tabla 12).

Ejemplos de bacterias metilótrofas facultativas Gram-negativas que presentan este metabolismo son *Methylibium aquaticum* perteneciente a las β -Proteobacteria (Song y Jang-Cheon, 2007) y *Klebsiella* sp. que también crece en metanol (Hou *et al.*, 1983).

Tabla 12. Metabolismo respiratorio de los cultivos bacterianos de cada punto de muestreo.

Actividad/cultivos bacterianos	PLL 14	PLS 11	PDRA 13	PDRS 5	Total 43	Total (%)
Anaerobios facultativos	9	8	9	1	27	63
Reducción nitratos	7	2	3	1	13	30
Reducción nitritos	6	1	2	1	10	23
Desnitrificación	3	1	1	1	6	14
Producción de H ₂ S	5	1	0	0	6	14
Producción de indol	2	0	0	0	2	5

A partir del catabolismo anaerobio de la fructuosa, sacarosa, algunos aislados bacterianos del humedal de La Mixtequilla fueron capaces de producir gas (Tabla 13) lo cual no se observó en glucosa como sustrato.

Tabla 13. Cultivos bacterianos del humedal de La Mixtequilla capaces de producir gas a partir de la degradación de la sacarosa y fructosa.

Producción de gas	PLL	PLS	PDRA
Sacarosa	7	2	1
Fructosa	6	1	2

La producción de gas (CO₂) a partir de carbohidratos es una característica de bacterias anaerobias facultativas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (Yang *et al.*, 2000). Con la fermentación de la sacarosa y fructosa por algunas bacterias del humedal de La Mixtequilla, se demuestra que son organismos anaerobios facultativos que tienen como función participar en el proceso de la degradación anaerobia de la materia orgánica.

De acuerdo con Torres *et al.* (2006), en el proceso de la degradación de la materia orgánica por las bacterias anaerobias facultativas está involucrada la hidrólisis de compuestos de peso molecular alto (polisacáridos, lípidos y proteínas) para formar compuestos de peso molecular bajo (ácidos orgánicos y alcoholes) que posteriormente son fermentados hasta ácidos grasos volátiles (propionato, acetato) y gases (H₂ y CO₂), sustratos para las fases terminales de la descomposición de la materia orgánica, es decir, la sulfatorreducción y la metanogénesis.

Cabe destacar que la fermentación es un proceso metabólico de óxido-reducción que tiene lugar en un entorno anaerobio en el que un sustrato inorgánico

(hidrógeno) sirve como aceptor final de electrones en lugar de oxígeno, liberando CO₂ el cual es un gas con efecto invernadero (Koneman *et al.*, 2003).

Menos de la mitad de los cultivos fueron capaces de reducir nitratos (30%) y nitritos (23%); la reducción de nitratos (7 aislados) y nitritos (6 aislados) se observó en los cultivos de PLLF (Tabla 12). Los porcentajes de aislados que redujeron los nitratos son semejantes al 31% reportados por Rivera-Becerril *et al.* (2008).

La reducción de nitratos como fuente de nitrógeno es una característica de las bacterias metilótrofas facultativas típicas como las de los géneros *Methylohabdus* y *Methylophilus* (α -Proteobacteria) (Miller *et al.*, 2005); las α -Proteobacteria: *Methylobacterium aquaticum* (Gallego *et al.*, 2005) y *Methylovirgula ligni*, (Vorob'ev *et al.*, 2009) y la especie metilótrofa facultativa restringida *Methylophilus methylotrophus* (Jenkins *et al.*, 1987), además de las enterobacterias (Rajasekar *et al.*, 2007) y las pertenecientes a la familia Intrsporangiaceae como *Tetrasphaera* sp. (Hanada *et al.*, 2002). La reducción de nitritos es una característica propia de *Serratia marcescens* (Rajasekar *et al.*, 2007) y de algunas bacterias provenientes de muestras de sedimentos marinos como *Pseudomonas* sp. y *Halobacterium* (Labbé *et al.*, 2003). De acuerdo con Pacheco *et al.* (2002), los nitratos y nitritos son formas disponibles de nitrógeno en el agua y se originan a partir de la descomposición microbiana de materiales orgánicos como las proteínas de las plantas, aunque también existen aportes de fertilizantes nitrogenados y desechos municipales e industriales hacia los cuerpos de agua.

Las bacterias heterótrofas de los humedales juegan un papel importante en el ciclo del nitrógeno al producir ureasa, reducir nitratos, nitritos y por su capacidad para desnitrificar, además, algunos grupos son fijadores de nitrógeno molecular.

Las bacterias reductoras de nitrato, en su mayoría son anaerobias facultativas y son comúnmente encontradas en el ambiente. Son capaces de acoplar la reducción de nitratos a la oxidación de diversos substratos orgánicos (Kourtev *et al.*, 2009), además de utilizar los nitratos y nitritos como fuentes de nitrógeno (Starkenbug *et al.*, 2008).

El paso que sigue a la reducción de nitratos a nitritos es la desnitrificación, que es un proceso de respiración en el cual el aceptor de electrones es el nitrato, con la liberación de nitrógeno molecular (N₂) y óxido nítrico (NO). Ejemplos de bacterias

que pueden realizar este proceso son las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Alcaligenes* (Torres-Alvarado *et al.*, 2005) y las enterobacterias (Koneman *et al.*, 2003). Esta capacidad de desnitrificar también es una característica de metilótrofos facultativos típicos que incluyen los géneros *Paracoccus*, *Rhodobacter* (Labbé *et al.*, 2003), *Xanthobacter*, *Ancylobacter*, el género metilótrofo facultativo restringido *Hyphomicrobium* y los metanótrofos obligados (Lidstrom, 2006) que comprenden los géneros *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocella*, *Methylococcus* y *Methylocapsa*, en los cuales también se presenta la capacidad para fijar N₂ en suelos agrícolas (Kolb, 2009).

De acuerdo con Evans *et al.* (1991) algunos aislados bacterianos de diversos ambientes naturales, además de desnitrificar, también son capaces de metabolizar compuestos aromáticos como el tolueno y el *orto*-xileno, por lo que existe un acoplamiento de los ciclos del nitrógeno y del carbono en los humedales.

La producción del H₂S solamente se observó en el 14% de los cultivos bacterianos aislados del humedal de La Mixtequilla (Tabla 12). La producción de H₂S es una característica de algunos metilótrofos facultativos restringidos como los pertenecientes al género *Hyphomicrobium* cuando crecen en presencia de dimetilsulfano (Borodina *et al.*, 2002), así como por algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae como *Pectobacterium carotovorum* y *Pantoea* (Kageyama *et al.*, 1992; Fassihiani y Nedaeinia, 2008).

Torres-Alvarado *et al.* (2005) citado en Núñez-Cardona *et al.* (2008) mencionan que en los humedales agrícolas el H₂S es generado por el rompimiento de aminoácidos azufrados o por la reducción del sulfato; cabe destacar que el H₂S es tóxico para la mayoría de los organismos vivos.

La producción de indol fue observada únicamente en dos cultivos de PLLF (Tabla 12); este es un compuesto nitrogenado resultado de la degradación del aminoácido triptofano por la acción de la enzima triptofanasa (Knaggs, 2000). La producción de indol es una propiedad de algunas bacterias metilótrofas facultativas restringidas como *Methylophaga* (Doronina *et al.*, 2003), *Methylophilus rhizosphaerae* (Madhaiyan *et al.*, 2009), *Methylidium petroleiphilum* (Nakatsu *et al.*, 2006) en *Janibacter limosus*, perteneciente a las Actinobacterias, familia Intrasporangiaceae (Hanada *et al.*, 2002).

Las bacterias en los humedales, por su capacidad de producir enzimas extracelulares, cumplen una función central en los ciclos de elementos como el nitrógeno (N), carbono (C), fósforo (P) y azufre (S). Estos nutrientes que se encuentran tanto en forma orgánica como inorgánica en los ambientes acuáticos, son producto de la descomposición de la materia orgánica, dando como resultado, en el caso del nitrógeno, la liberación del amonio (NH₄). Dichas enzimas hidrolíticas extracelulares (adheridas a la membrana celular), son un grupo clave en el aprovechamiento de la materia orgánica (Álvarez, 2005) permitiendo que las sustancias disueltas sean capaces de pasar a través de la membrana citoplasmática (Nakamura *et al.*, 2004).

En la tabla 14 se muestran los resultados generales representados en porcentaje de cultivos y por número de cultivos de cada potrero del humedal de La Mixtequilla que fueron capaces de producir enzimas extracelulares.

Tabla 14. Número de cultivos de cada muestra (número y porcentaje total) que produjeron enzimas extracelulares y el polisacárido de Levana en cada uno de los potreros.

Enzimas extracelulares/ cultivos bacterianos	PLL 14	PLLS 11	PDRA 13	PDRS 5	Total 43	% total
ADNasa	3	1	4	2	10	23
Amilasa	9	5	6	1	21	49
Gelatinasa	2	1	5	0	8	19
Esculinasa	2	6	4	0	12	28
Ureasa	12	9	11	5	37	86
Lipasa	2	0	1	2	5	12
Polisacárido de Levana	2	0	0	0	2	5
Lisina descarboxilasa	12	2	8	5	27	63

La ADNasa es una enzima extracelular conocida como desoxirribonucleasa que tiene como función la degradación del DNA dando como productos finales nucleótidos; esta enzima fue producida por el 23% de los cultivos bacterianos aislados del humedal de La Mixtequilla (Tabla 14); se ha observado que la especie metilótrofa *Rhodococcus yunnanensis* también cuenta con esta propiedad (Yu-Qin *et al.*, 2005).

Menos de la mitad de los cultivos (49%) fueron capaces de producir amilasa, útil para degradar almidón, siendo éste, un polisacárido utilizado como fuente de carbono (Tabla 14). Miller *et al.* (2005) y Gallego *et al.* (2005) señalan que esta enzima extracelular es producida por algunos géneros de bacterias metilótrofas facultativas típicas como *Methylohabdus*, *Methylopila* y *Methylobacterium*. Otro ejemplo de bacterias metilótrofas facultativas restringidas que producen amilasa son

Methylbium petroleiphilum (Nakatsu *et al.*, 2006) y *Methylophaga* (Doronina *et al.*, 2003).

El 19% de los cultivos bacterianos fueron capaces de producir gelatinasa, útil para degradar gelatina (proteína), dando como resultado polipéptidos, péptidos y aminoácidos (Tabla 14). Miller *et al.* (2005) mencionan que la producción de gelatinasa ha sido observada en bacterias metilótrofas facultativas típicas pertenecientes a los géneros *Methylorhabdus* y *Methylopila* y algunos miembros de enterobacterias como *Pantoea* (Gavini *et al.*, 1989) y *Pectobacterium carotovorum* (Fassihiani y Nedaeinia, 2008), así como en especies del género *Pseudomonas* (Achouak *et al.*, 2000) y miembros de la familia Intrasporangiaceae como *Janibacter melonis* (Loubinoux *et al.*, 2005).

La esculinasa es una enzima extracelular útil para degradar esculina (glucósido presente en algunos vegetales), para dar origen a esculetina. La esculinasa fue producida por el 28% de los cultivos bacterianos (28%) aislados del humedal de La Mixtequilla (Tabla 14). La producción de esculinasa se ha documentado en algunas de las especies del género *Rhodococcus* como *R. fascians*, *R. maanshanensis* y *R. erythropolis* (Yu-Qin *et al.*, 2005).

Las bacterias capaces de sintetizar la enzima ureasa utilizan urea como fuente de nitrógeno dando como resultado la liberación del amonio (Bhadra *et al.*, 2005). La mayoría de los cultivos (86%) del humedal de La Mixtequilla fueron capaces de producir ureasa (Tabla 14). La producción de esta enzima extracelular concuerda con resultados obtenidos (7 cultivos bacterianos) por Rivera-Becerril *et al.* (2008). La capacidad de producir ureasa es una característica de bacterias oxidadoras de metanol (metilótrofas facultativas típicas) como las de los géneros *Methylobacterium* (Gallego *et al.*, 2005), *Rhodococcus* (Yu-Qin *et al.*, 2005) y la especie *Labrys monachus* (Miller *et al.*, 2005), *Methylophilus methylotrophus* (Jenkins *et al.*, 1987) *Methylophaga* (Doronina *et al.*, 2003). Estas dos últimas son metilótrofas facultativas restringidas. Finalmente, *Enterobacter asburiae* (Brenner *et al.*, 1986) también posee esta capacidad.

De acuerdo con Pacheco *et al.* (2002), la producción de ureasa por las bacterias en los humedales se debe a la presencia de urea que aportan las aguas residuales de origen doméstico y agropecuario, además de los animales que ahí habitan. En el

caso del humedal de La Mixtequilla, la producción de esta enzima extracelular se explica porque en una estación del año, especialmente en la época de secas, predominan las actividades ganaderas.

La lipasa es utilizada por las bacterias para hidrolizar Tween 80, el cual es un detergente; esta enzima extracelular fue producida sólo por el 12% de los cultivos del humedal de La Mixtequilla (Tabla 14) y se sabe que también es producida por bacterias metilótrofas como *Rhodococcus yunnanensis* (Yu-Qin *et al.*, 2005).

Cabe destacar que de los 43 cultivos bacterianos, únicamente dos del PLLF sintetizaron el polisacárido de Levana (Tabla 14) el cual, de acuerdo con Gallego *et al.* (2005), es producido por *Methylobacterium aquaticum*. Hans-Curt *et al.* (2007) argumentan que la producción extracelular del polisacárido de Levana es una de las propiedades del género *Pseudomonas*; además mencionan que la presencia de polisacáridos en los ambientes naturales es rara. Se ha observado que dentro de las principales especies productoras de polisacáridos están *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* y miembros del género *Acinetobacter* (Wilches, 2004; Cuthbertson *et al.*, 2009).

La lisina descarboxilasa es una enzima no extracelular que tiene como función degradar el aminoácido lisina, componente de las proteínas dando como producto final la cadaverina. La lisina descarboxilasa fue producida por más de la mitad de los cultivos (63%) del humedal de La Mixtequilla (Tabla 14). La producción de esta enzima es característica del género *Serratia* (Koneman *et al.*, 2003) y de la β -Proteobacteria metilótrofa facultativa restringida *Methylibium petroleiphilum* (Nakatsu *et al.*, 2006).

Chowdhury *et al.* (2008) mencionan que las enzimas extracelulares, además de degradar la materia orgánica, también cumplen un papel importante en el ámbito industrial por su aplicación en la producción de fármacos, detergentes y en la industria textil.

De acuerdo con Worm *et al.* (2001), las bacterias acuáticas son altamente diversas en cuanto a sus preferencias catabólicas por el uso de los carbohidratos y la producción de enzimas extracelulares que les permiten degradar la materia orgánica.

Las concentraciones ensayadas (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 3.0% y 4.0%) tanto de compuestos aromáticos como de alcoholes (como única fuente de carbono y energía), fueron altas si se comparan con otros estudios en donde utilizaron 0.1% de etanol y 1.0% de metanol. A partir de estos ensayos se aislaron bacterias metilótrofas como *Labrys methylaminiphilus*, metilótrofo facultativo perteneciente a las α -Proteobacteria (Miller *et al.*, 2005). Madhaiyan *et al.* (2006) aislaron bacterias del género *Methylobacterium* utilizando una concentración de 0.5% de metanol; por su parte, Pinto *et al.* (2010) aislaron bacterias heterótrofas pertenecientes al género *Enterobacter* utilizando una concentración de butanol de 0.2%.

En la tabla 15 se muestran los resultados de la respuesta de 43 cultivos del humedal de La Mixtequilla, capaces de crecer a concentraciones diferentes de metanol, etanol, 1-butanol, 2-propanol, tolueno y xileno.

Tabla 15. Porcentaje de cultivos bacterianos aislados del humedal de La Mixtequilla capaces de crecer en alcoholes y en compuestos aromáticos.

Concentración (%)	Metanol	Etanol	1-butanol	2-Propanol	Tolueno	Xileno
0.5	69	74	76	76	67	83
1.0	70	69	58	67	74	81
1.5	60	69	65	81	72	67
2.0	60	76	21	44	35	32
3.0	44	62	23	49	56	39
4.0	58	60	25	42	49	51

Los resultados revelaron que más de la mitad de los cultivos bacterianos fueron capaces de crecer en todas las concentraciones de etanol, siguiendo el metanol; en 2-propanol hubo un mayor porcentaje (81%) de cultivos que creció bien en la concentración de 1.5%; un menor porcentaje de cultivos se desarrolló en el 1-butanol (Tabla 15).

En los compuestos aromáticos (xileno y tolueno), el comportamiento de los cultivos bacterianos fue diferente; el mayor porcentaje de ellos creció bien en las dos primeras concentraciones (0.5% y 1.0%) de xileno y más de la mitad en las concentraciones 1.0% y 1.5% de tolueno (Tabla 15).

De la misma manera, el mayor número de cultivos bacterianos de cada muestra creció bien en las tres primeras concentraciones (0.5%, 1.0% y 1.5%) de xileno y más de la mitad de los cultivos del PLLF y PDRA en las tres primeras concentraciones (0.5%, 1.0% y 1.5%) de tolueno (Tabla 16).

Tabla 16. Número de cultivos bacterianos aislados, por sitio de muestreo, capaces de crecer en alcoholes y compuestos aromáticos.

Concentración (%)	Metanol	Etanol	1-butanol	2-Propanol	Tolueno	Xileno
PLL (15 cultivos)						
0.5	12	15	12	12	11	15
1.0	11	12	10	12	14	13
1.5	11	11	13	13	11	10
2.0	10	14	4	8	4	8
3.0	8	11	3	8	7	6
4.0	12	12	3	5	9	9
PDRA (12 cultivos)						
0.5	8	7	9	11	7	10
1.0	8	9	7	8	10	10
1.5	6	8	8	11	10	8
2.0	6	5	2	4	6	3
3.0	5	6	2	4	8	5
4.0	3	5	2	4	4	5
PLLS (11 cultivos)						
0.5	6	6	9	6	6	6
1.0	7	5	5	6	5	7
1.5	5	7	5	7	6	7
2.0	7	9	2	4	3	1
3.0	3	6	2	6	5	2
4.0	8	5	4	4	5	5
PDRS (5 cultivos)						
0.5	4	4	3	4	5	5
1.0	4	4	3	3	3	5
1.5	4	4	3	4	4	4
2.0	3	5	1	3	2	2
3.0	3	4	2	3	4	4
4.0	2	4	2	5	3	3

De acuerdo con Bellion y Wu (1978), las bacterias metilótrofas facultativas son capaces de oxidar diferentes alcoholes primarios como etanol, metanol y 1-butanol, mediante el uso de enzimas alcohol deshidrogenasas (ADHs). Este grupo de enzimas también es sintetizado por miembros de los géneros *Bacillus* (Colby y Zatman, 1975) y *Methylobacterium* (Miller *et al.*, 2005), por α -Proteobacteria como *Labrys methylaminiphilus*; γ -Proteobacteria como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, por *E. coli* (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008) y *Enterobacter* sp. (Pinto *et al.*, 2010), además de las actinobacterias *Arthrobacter* y *Rhodococcus* (Nielsen *et al.*, 2009).

Las enzimas alcohol deshidrogenasas sintetizadas por las bacterias metilótrofas facultativas tienen como función transformar los alcoholes como el etanol a acetaldehído, y éste a acetil CoA por la acetaldehído deshidrogenasa. *Pseudomonas putida* genera ácido pirúvico a partir de 2-propanol (alcohol secundario), formándose acetona y después hidroxiacetona para finalmente producir ácido pirúvico (Steffan *et al.* 1997; Fernandes, 2002).

El 1-butanol es convertido a butanal por la alcohol-deshidrogenasa-secundario-1-butanol, y el butanal a butanoil-CoA; éste a 2-metil malato, después a piruvato y luego a acetil CoA por la piruvato deshidrogenasa; dichos procesos los realiza *E. coli* (Ranganathan y Maranas, 2010). Finalmente, el etanol, 1-butanol y 2-propanol pasan al ciclo de Krebs para ser transformados a CO₂ generando energía y metabolitos para la formación de biomasa celular (Fernandes, 2002; Steffan *et al.* 1997; Ranganathan y Maranas, 2010).

Además de estar presentes en la gasolina, el etanol, butanol y propanol también son producidos por *Clostridium*, a partir de carbohidratos como la glucosa, galactosa y manosa, provenientes de la materia orgánica. Otros productores del butanol a partir de la glucosa son *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium butyricum* y la arquea *Hyperthermus butylicus* (Radjchenberg-Ceceña *et al.*, 2009).

Especies de bacterias metilótrofas facultativas como las del género *Methylobacterium*, además de crecer en metanol, metabolizan compuestos químicos orgánicos tóxicos como cloruro de metilo, bromuro de metilo, diclorometanos, sulfuros metilados y cianidas (van Aken *et al.*, 2004).

En cuanto a los compuestos aromáticos (tolueno y xileno), en el presente trabajo se ensayaron concentraciones más altas que las utilizadas por Mikesell *et al.* (1993) y Tsao *et al.* (1998), quienes lograron estimular el crecimiento de bacterias heterótrofas como las del género *Pseudomonas* (aisladas de muestras de agua y suelo) adicionando concentraciones de 0.1 mL y 0.15 mL de BTEX (beneceno, tolueno, etilbenceno y xileno) en forma de vapores y como únicas fuentes de carbono. En otro estudio realizado por León *et al.* (1999), al aumentar la concentración de tolueno a 200 µL (0.2 mL) y de xileno a 20 µL (0.02 mL) se inhibió el crecimiento de bacterias heterótrofas.

Tanto el tolueno como el xileno son compuestos monoaromáticos comunes en ambientes contaminados con residuos de petróleo, gasolina o diesel y, además de ello, han tenido un uso amplio en la industria como solventes químicos (Phelps y Young, 1999; Tsao *et al.*, 1998). En Estados Unidos, estos compuestos han sido clasificados como contaminantes prioritarios, están presentes en la gasolina y los derrames accidentales de ésta son los responsables de la contaminación de los cuerpos de agua (Otenio *et al.*, 2005).

Los BTEX presentes en el suelo y en el agua, son degradados como únicas fuentes de carbono por un amplio rango de microorganismos como bacterias de los géneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* (Morlett-Chávez *et al.*, 2010) y *Enterobacter* (Machnicka y Suschka, 2001).

El catabolismo bacteriano de los BTEX (Maliyekkal *et al.*, 2004) y BTX (benceno, tolueno y xilenos) en ambientes acuáticos es un mecanismo de biorremediación al ser mineralizados por las bacterias heterótrofas nativas (Jang-Young *et al.*, 1995), las cuales utilizan enzimas oxigenasas. El tolueno es transformado por la tolueno oxigenasa y los xilenos (*orto*, *para* y *meta*) por xileno oxidasas; tanto el tolueno como los xilenos pasan a formar benzil alcoholes, éstos se transforman de ácidos metilbenzoicos a catecoles y finalmente pasan al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Evans *et al.*, 1991; Jean-Pierre y Arvin, 1995; Otenio *et al.*, 2005). Una vez degradados los BTEX y BTX por las bacterias heterótrofas (Jang-Young *et al.*, 1995; Maliyekkal *et al.*, 2004), se transforman en formas químicas no tóxicas para otros organismos vivos (Tsao *et al.*, 1998).

Las bacterias del humedal de La Mixtequilla son capaces de crecer en metanol, etanol, 1-butanol, 2-propanol y en los compuestos aromáticos tolueno y xileno, aunque estos dos últimos son anillos con dobles enlaces de carbono-carbono, difíciles de romper para muchas bacterias. La fuente de ingreso de estos compuestos (presentes en la gasolina) en el sistema en estudio, puede deberse al uso de lanchas por los pobladores para el transporte cotidiano, la colecta del acocil y las actividades de la industria petrolera. De acuerdo con Ortiz-Hernández *et al.* (2001), las bacterias al estar en contacto con los pesticidas y el tolueno, a lo largo de la evolución, han sido capaces de degradar también a los xilenos.

Lang (1996) menciona que las bacterias heterótrofas únicamente toleran los alcoholes y los compuestos aromáticos cuando tienen disponible otra fuente de carbono; para tolerarlos establecen diferentes mecanismos como son el modificar la permeabilidad de su membrana celular, formar esporas y vesículas, así como la sobre expresión de proteínas de membrana.

De los 43 cultivos del humedal de La Mixtequilla, únicamente 35 fueron expuestos a 12 antibióticos de uso clínico de los cuales 11 fueron aislados del PLLF, ocho de

PLLS, 11 de PDRA y cinco de PDRS; la mayoría de estos cultivos presentaron forma de bacilos con colonias color crema.

Con respecto a la respuesta de los cultivos al ser expuestos a 12 antibióticos específicos para bacterias Gram negativas, un porcentaje alto de los cultivos presentaron sensibilidad a netilmicina (94%), amikacina (91%), cloranfenicol (86%), gentamicina (86%) y trimetoprim-sulfametoxazol (80%). Cabe señalar que el 43% de los aislados de la Mixtequilla, presentaron sensibilidad a la pefloxacina (Fig. 4); Orden y De la Fuente (2001) mencionan que este antibiótico pertenece al grupo de las quinolonas, las cuales han tenido poca aplicación clínica por ser inductores de resistencia en bacterias y además de actuar en el sistema nervioso central de humanos y animales.

Estos resultados son similares a los reportados por Rivera-Becerril *et al.* (2008), en aislados bacterianos del humedal de La Mixtequilla, donde encontraron que la mayoría de ellos fueron sensibles a la amikacina y al cloranfenicol, siguiendo la ampicilina. Brown *et al.* (1992) y Chen-Hsiang *et al.* (2004) señalan que especies pertenecientes al género *Methylobacterium* presentan sensibilidad a la gentamicina, a la amikacina y al trimetoprim-sulfametoxazol.

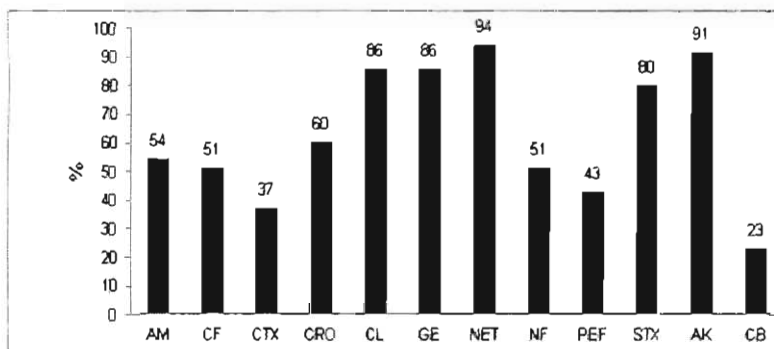


Figura 4. Porcentaje de cultivos bacterianos del humedal de La Mixtequilla que fueron sensibles a los antibióticos ensayados. AM=ampicilina, CF=cefalotina, CTX=cefotaxima, CRO=ceftriaxona, CL=cloranfenicol, GE=gentamicina, NET=netilmicina, NF=nitrofurantoina, PEF=pefloxacina, STX=trimetoprim-sulfametoxazol, AK=amikacina y CB=carbenicilina.

Poco más de la mitad de los cultivos (57%) presentó resistencia a la carbenicilina y menos de la mitad lo fue ante la nitrofurantoina (46%), la cefalotina (43%) y la ampicilina (40%) (Fig. 5). La mayoría de los cultivos de PLLF presentaron resistencia a la carbenicilina (57%), siguiendo la nitrofurantoina (46%), la cefalotina (43%) y la

ampicilina (40%); mientras que cuatro de los cultivos de PDRS resistieron la cefalotina, la nitrofurantoina y la carbenicilina (Tabla 17).

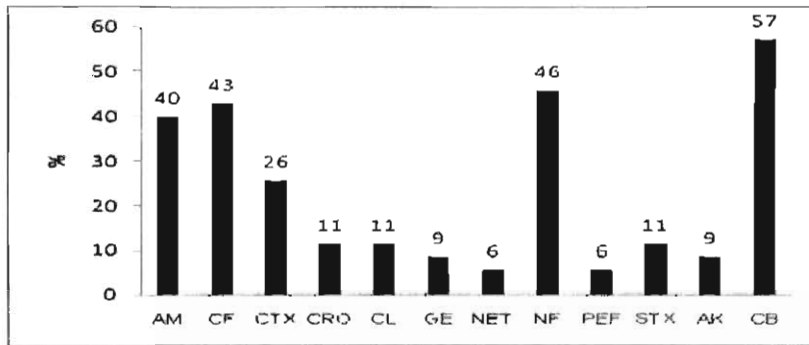


Figura 5. Cultivos bacterianos del humedal de La Mixtequilla que mostraron resistencia a los antibióticos ensayados. AM=ampicilina, CF=cefalotina, CTX=cefotaxima, CRO=ceftriaxona, CL=cloranfenicol, GE=gentamicina, NET=netilmicina, NF=nitrofurantoina, PEF=pefloxacina, STX=trimetoprim-sulfametoxazol, AK=amikacina y CB=carbenicilina.

La respuesta intermedia a la pefloxacina fue observada en el 51% de los cultivos bacterianos, a la cefotaxina en el 37% y a la ceftriaxona en el 29% (Fig. 6); más de la mitad de los cultivos (8) de PLLF presentaron respuesta intermedia a la pefloxacina (Tabla 17).

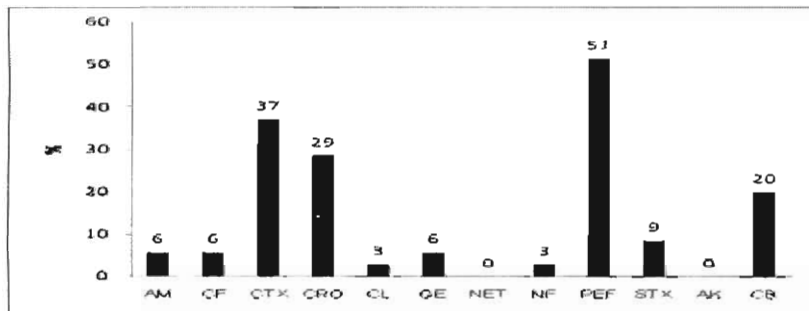


Figura 6. Porcentaje de los cultivos bacterianos del humedal de La Mixtequilla que presentaron respuesta intermedia a los antibióticos ensayados: AM=ampicilina, CF=cefalotina, CTX=cefotaxima, CRO=ceftriaxona, CL=cloranfenicol, GE= gentamicina, NET=netilmicina, NF=nitrofurantoina, PEF=pefloxacina, STX=trimetoprim-sulfametoxazol, AK=amikacina y CB=carbenicilina.

Tabla 17. Número de cultivos bacterianos de las muestras del humedal de La Mixtequilla y su respuesta a los antibióticos ensayados.

Respuesta	Sensible				Resistente				Intermedia			
Muestras	PLLF	PLLS	PDRA	PDRS	PLLF	PLLS	PDRA	PDRS	PLLF	PLLS	PDRA	PDRS
Antibióticos/ No.cultivos	11	8	11	5	11	8	11	5	11	8	11	5
AM	4	4	9	2	7	4	1	2	0	0	1	1
CF	4	5	8	1	7	1	3	4	0	2	0	0
CTX	4	3	6	0	3	4	2	0	4	1	3	5
CRO	8	2	9	2	1	2	1	0	2	4	1	3
CL	9	7	10	4	1	1	1	1	1	0	0	0
GE	9	8	9	4	2	0	1	0	0	0	1	1
NET	10	8	10	5	1	0	1	0	0	0	0	0
NF	5	6	6	1	5	2	5	4	1	0	0	0
PEF	3	4	6	2	0	1	1	0	8	3	4	3
STX	10	4	9	5	1	2	1	0	0	2	1	0
AK	10	8	9	5	1	0	2	0	0	0	0	0
CB	1	1	6	0	9	4	3	4	1	3	2	1

En la tabla 18 se presentan las características fisiológicas de 29 cultivos bacterianos del humedal de La Mixtequilla y su respuesta (resistente o sensible) a los antibióticos ensayados. Los cultivos MP15 y MLLF19 fueron capaces de resistir a ocho antibióticos, que incluye a ampicilina (grupo de los β -lactámicos), ceftriaxona (cefalosporinas de 3^a generación), cloranfenicol (anfencícoles), gentamicina (aminoglucósidos) y nitrofurantoína (nitrofuranos). Estos cultivos son anaerobios facultativos, móviles, produjeron esculinasa y lisina descarboxilasa, participan en el ciclo del nitrógeno al reducir nitratos, nitritos y desnitrificar, como única fuente de carbono utilizaron el citrato.

Tabla 18. Características fisiológicas de los cultivos bacterianos y su respuesta (resistente o sensible) a los antibióticos ensayados.

Prueba/cultivos bacterianos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Total de cultivos
Ampicilina															11
Cefalotina															10
Cefotaxima															6
Ceftriaxona															5
Cloranfenicol															4
Gentamicina															3
Netilmicina															2
Nitrofurantoina															10
Pefloxacina															1
Trimetoprim-Sulfametoxazol															4
Amikacina															2
Carbenicilina															13
Forma	c	b	b	b	b	cb	Cb	b	cb	cb	C	B	b	b	
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
Anaerobio	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	5
Aerobio	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	9
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	3
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
Movilidad	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	8
ADNasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	2
Amilasa	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	3
Gelatinasa	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	3
Esculinasa	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	6
Ureasa	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	10
Lipasa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	2
Lisina	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	12
Polisacárido de Levana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Nitratos	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	5
Nitritos	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	4
Desnitrificación	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3
Citrato	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	9
Glucosa	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	5
Lactosa	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	6
Manitol	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
Manosa	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	5
Sacarosa	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	7
Maltosa	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	4
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	10
Metanol	N	N	-	N	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	5
Etanol	N	N	-	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
1-butanol	N	N	+	N	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	10
2-propanol	N	N	+	N	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	9
Tolueno	N	N	+	N	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	9
Xileno	N	N	+	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11

1 (MP15), 2 (MLLF19), 3 (MLLF17B), 4 (MLLSO2), 5 (MLLSO8), 6 (MP119A), 7 (MPSU218A), 8 (MLLS1B), 9 (MLLF17G), 10 (MLLFO15A1), 11 (MLLFO17), 12 (MLLF9), 13 (MPSU2171) y 14 (MPSU217). Cuadros rellenos con negro=resistencia al antibiótico, cuadros sin rellenar=sensibilidad al antibiótico, (-)=respuesta negativa a, (+)=respuesta positiva. N=prueba no aplicada.

El cultivo MP15 presentó actividad sobre seis carbohidratos (excepto maltosa), mientras que MLLF19 solamente creció en sacarosa, maltosa y fructosa. Ambos cultivos no se sometieron a la presencia de alcoholes ni de compuestos aromáticos. Por otro lado, el cultivo MLLF17B fue aerobio estricto con características genéticas y

fisiológicas similares a *Bacillus jeotgali*, especie anaerobia facultativa descrita por Jung-Hoon *et al.* (2001). De acuerdo con Green-Ruiz *et al.* (2008), *B. jeotgali* es capaz de resistir metales pesados como el cadmio y el zinc. Se observó que MLLF17B resistió seis antibióticos (cefotaxima, gentamicina, netilmicina, trimetoprim-sulfametoxazol, amikacina y carbenicilina), produjo enzimas extracelulares como amilasa, gelatinasa, ureasa y lisina descarboxilasa; utilizó como fuentes de carbono la glucosa, el manitol, la manosa, la sacarosa y la fructosa; fue capaz de crecer en presencia de 1-butanol, 2-propanol, tolueno y xileno (Tabla 18).

Los cultivos MLLSO2, MLLSO8, MP119A, MPSU218A y MLLS1B fueron resistentes a cinco antibióticos; los tres primeros a cefotaxima y los aislados MP119A, MPSU218A y MLLS1B lo fueron a nitrofurantoina; los cinco cultivos lo fueron a carbenicilina. El cultivo MLLSO8 fue anaerobio facultativo, produjo esculinasa y ureasa, ésta última también sintetizada por MLLSO2 y MPSU218A que produjeron lisina descarboxilasa, mientras que MP119A produjo gelatinasa, esculinasa y lisina descarboxilasa. Únicamente el aislado MLLS1B catabolizó a todos los carbohidratos y el MLLSO2 utilizó glucosa, lactosa, sacarosa y fructosa; no se ensayó en los alcoholes ni compuestos aromáticos.

Los cultivos MLLSO8, MP119A, MPSU218A y MLLS1B crecieron en etanol, 1-butanol y xileno y los últimos dos cultivos (MPSU218A y MLLS1B) también crecieron en 2-propanol y tolueno; por otro lado, los cultivos MLLFO15A1, MLLFO17, MLLF17G, MLLF9, MPSU2171 y MPSU217 fueron Gram-negativos, resistentes a cuatro antibióticos. MLLFO17, MLLF17G fueron anaerobios facultativos. Los seis cultivos produjeron ureasa y lisina descarboxilasa; utilizaron citrato como única fuente de carbono y energía, fueron capaces de crecer en etanol, 1-butanol, 2-propanol, tolueno y xileno.

En la tabla 19 se presentan los resultados de los cultivos bacterianos que resistieron de tres a un antibiótico; los cultivos MLLFO15A, MPSU5 y MLLF3A mostraron resistencia a tres antibióticos; comparten la propiedad de resistir a la cefalotina y a la carbenicilina, además de producir ureasa y lisina descarboxilasa. Los cultivos MLLFO15A y MPSU5 utilizaron como fuentes de carbono el manitol, sacarosa y fructosa; los cultivos MPSU5 y MLLF3A crecieron en los alcoholes y compuestos aromáticos.

Tabla 19. Características fisiológicas de cultivos bacterianos que resistieron de uno a tres antibióticos.

Prueba/cultivo bacteriano	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total de cultivos
Ampicilina																3
Cefalotina																5
Cefotaxima																3
Ceftriaxona																0
Cloranfenicol																0
Gentamicina																0
Netilmicina																0
Nitrofurantoina																6
Peфлоxacina																0
Trimetoprim-sulfametoxazol																0
Amikacina																1
Carbencilina																8
Forma	b	b	c	b	cb	c	c	b	c	b	c	b	b	cb	b	
Gram	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Anaerobio	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	12
Aerobio	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
H ₂ S	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Movilidad	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	5
ADNasa	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6
Amilasa	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	9
Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
Esculinasa	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Ureasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15
Lipasa	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Lisina	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	7
Polisacárido de levana	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Nitratos	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Nitritos	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Desnitrificación	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Citrato	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	5
Glucosa	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	12
Lactosa	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	6
Manitol	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	10
Manosa	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	10
Sacarosa	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	11
Maltosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	4
Fructosa	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	9
Metanol	N	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
Etanol	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
1-butanol	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
2-propanol	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
Tolueno	N	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
Xileno	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14

1 (MLLFO15A), 2 (MPSU5), 3 (MLLF3A), 4 (MLLSO13AC), 5 (MP119), 6 (MP16A), 7 (MP113), 8 (MLLS111A), 9 (MLLSO2G), 10 (MP19A), 11 (MLLSO2AC), 12 (MP116), 13 (MP116AA), 14 (MLLF22B) y 15 (MLLFO5). Cuadros rellenos con negro=resistencia al antibiótico, cuadros sin rellenar=sensibilidad al antibiótico, (-)=negativo a la prueba, (+)=positivo a la prueba. N=prueba aplicada. El cultivo MLLF17B (3) fue identificado genéticamente como *Bacillus jeotgali*.

Seis cultivos (MLLSO13AC, MP119, MP16A, MP113, MLLS111A y MLLSO2G) mostraron resistencia a dos antibióticos; tres de ellos (MLLSO13AC, MP16A y MLLS111A) resistieron a la cefotaxima y cinco (MPSU5, MLLSO13AC, MP119,

MP16A y MP113) a la nitrofurantolína; todos produjeron ureasa. MLLSO13AC también produjo esculinasa y lipasa y MP16A fue capaz de producir ADNasa, amilasa y lisina descarboxilasa; éste último participa en el ciclo del nitrógeno al reducir nitratos, nitritos y desnitrificar; cinco de los cultivos emplearon la glucosa y manosa; los seis cultivos crecieron en los alcoholes y compuestos aromáticos.

El aislado bacteriano MLLSO13AC no creció en tolueno y, con base en sus propiedades genéticas y fisiológicas, es muy cercano a *Bacillus pumilus*. De acuerdo con Reva *et al.* (2002), *B. pumilus* produce antibióticos para proteger las plantas de bacterias y hongos patógenos y se caracteriza por producir enzimas hidrolíticas para degradar la materia orgánica

Los cultivos bacterianos MP19A, MLLSO2AC, MP116, MP116AA, MLLF22B MLLFO5 resistieron a antibióticos diferentes; todos produjeron ureasa, cinco sintetizaron ADNasa y amilasa; todos presentaron actividad sobre glucosa, manitol, sacarosa y fructosa, fueron capaces de tolerar los alcoholes y compuestos aromáticos.

La mayoría de los cultivos que resistieron de tres a un antibiótico fueron anaerobios facultativos (12 cultivos); todos produjeron ureasa (14) y la mayoría a la amilasa (12); redujeron nitratos, nitritos (3) y desnitrificaron (2); crecieron en citrato (5), glucosa (12), sacarosa (11), manitol y manosa (10); los cultivos (14) sometidos en los alcoholes y compuestos aromáticos crecieron bien (Tabla 19).

Más de la mitad de los cultivos que resistieron de cuatro a ocho antibióticos fueron aerobios estrictos (9), produjeron ureasa (10) y casi todos, también, a la lisina descarboxilasa; redujeron nitratos (5), nitritos (4) y desnitrificaron (3); utilizaron el citrato (9). El carbohidrato utilizado por más de la mitad de los cultivos (10) fue la fructosa. La mayoría de los cultivos creció en presencia de xileno (11), etanol, 1-butanol (10), 2-propanol y tolueno (9) (Tabla 18).

La enzima extracelular que más produjeron los cultivos bacterianos fue la ureasa, lo cual indica la presencia de urea en el humedal de La Mixtequilla, probablemente por los desechos domésticos provenientes del río Camarón y la presencia de ganado vacuno. De acuerdo con los resultados acerca de la reducción de nitratos, nitritos y desnitrificación, pocos cultivos participan en el ciclo del nitrógeno.

La mayoría de los cultivos que resistieron de uno a tres antibióticos (Tabla 19) utilizaron los carbohidratos, por lo que desempeñan un papel importante en el ciclo del carbono degradando la materia orgánica presente en el humedal de La Mixtequilla; que fueron capaces de crecer en todos los alcoholes y compuestos aromáticos, lo que indica que participan en el ciclo del carbono y en la biorremediación de ambientes impactados por estos compuestos. Algunas de las bacterias multiresistentes a los antibióticos podrían causar alguna enfermedad en los animales o en humanos en el humedal de La Mixtequilla; además, al utilizar como fuentes de carbono y energía alcoholes y compuestos aromáticos, se les considerara como bacterias con potencial como biorremediadores de ambientes contaminados por petróleo. Este combustible contiene alcoholes como etanol, butanol y compuestos aromáticos como tolueno y xileno.

Cabe mencionar que los 15 cultivos bacterianos fueron sensibles a ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina, netilmicina y a trimetoprim-sulfametoxazol (Tabla 19). Ejemplos de bacterias multiresistentes a los antibióticos de uso clínico están enterobacterias como *Serratia marcescens* (Guollet y Picard, 1997) y miembros del género *Acinetobacter* (Nemec *et al.*, 2010) que incluye a *Acinetobacter radioresistens* (aislado de suelo y agua; son capaces de resistir antibióticos como los pertenecientes a las cefalosporinas, aminoglucósidos (amikacina y netilmicina) y flouroquinolonas (Towner, 1977; Townsend *et al.*, 2008). Ésta especie (*A. radioresistent*) y *Serratia marcescens* están estrechamente relacionadas con las bacterias del humedal de La Mixtequilla, considerando el análisis del 16S rDNA de algunos aislados de este ecosistema (Fig. 11).

De acuerdo con Halda-Alija (2004), las bacterias entéricas están comúnmente presentes en los sedimentos de humedales de agua dulce, debido a que la rizósfera de las plantas podría servir como reservorio para el crecimiento y expansión de patógenos potenciales como *Klebsiella* y *Enterobacter*. Estos géneros son capaces de colonizar humanos y animales y han mostrado alta resistencia a cefalosporinas y ampicilina (que pertenecen a los β -lactámicos); la función catalítica de las β -lactamasas sintetizadas por estas bacterias es la principal responsable de resistencia a los antibióticos β -lactámicos.

La resistencia a netilmicina, amikacina y gentamicina (aminoglucósidos) por bacterias Gram-negativas se debe a que sintetizan enzimas modificadoras

conocidas como acetil-transferasa (AAC) y adenil-transferasa (ANT o AAD) codificadas en plásmidos (Fuchs *et al.*, 1994). Fuchs *et al.* (1994) argumentan que las bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas sintetizan acetil-transferasas (CAT) para resistir al cloranfenicol. Dicha resistencia a los antibióticos se debe a que ha aumentado la introducción de estos agentes antimicrobianos en el ambiente por diferentes vías, como la terapia médica, la agricultura y la ganadería, lo cual ha conducido nuevas presiones selectivas sobre las poblaciones bacterianas en los ambientes naturales (Halda-Alija, 2004).

van Den Bogaard y Stobberingh (2000) argumentan que la aplicación de los antibióticos en los animales y en los humanos aumentan el número de bacterias patógenas resistentes a estos compuestos, las cuales transfieren genes de resistencia a otras bacterias pertenecientes a la microbiota intestinal.

De acuerdo con Demaneche *et al.* (2008) y Vanzzini *et al.* (2009), los antibióticos pertenecientes a los aminoglucósidos y betalactámicos han tenido un extenso uso clínico para el tratamiento de enfermedades infecciosas y han favorecido la evolución de mecanismos de resistencia en las bacterias heterótrofas Gram-negativas.

Tres de los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos desarrollados por éstas son: a) la permeabilidad de la membrana celular, b) la producción de enzimas β -lactamasas que también hidrolizan antibióticos pertenecientes al grupo de las α -carboxipenicilinas (Fass, 1983) y c) la producción de enzimas fosfotransferasas con las cuales resisten los aminoglucósidos (Wai-Ching *et al.*, 1997). Estos tres mecanismos son similares a los que utilizan para tolerar compuestos aromáticos como tolueno y xilenos.

Stock y Wiedemann (2001) mencionan que miembros del género *Klebsiella* spp. son patógenos oportunistas que causan un gran número de infecciones en el humano. Se ha observado que estos son sensibles a antibióticos como los pertenecientes a cefalosporinas, aminoglucósidos, quinolonas, cloranfenicol y nitrofurantoina. *Klebsiella* también fue ubicada en el árbol filogenético del presente trabajo (Fig.11). Bacterias de la especie *Serratia marcescens* y del género *Acinetobacter* producen enzimas extracelulares como algunas nucleasas y proteasas; crecen en lactosa y sacarosa (Ashelford *et al.*, 2002; Abdel-El-Haleem, 2003; Kumar y Shekhar, 2007);

las bacterias del género *Pantoea* hidrolizan esculina y gelatina, reducen nitratos y nitritos; utilizan como fuente de carbono fructosa, manosa, lactosa, sacarosa y manitol (Gavini *et al.*, 1989). Tanto *Serratia* como *Pantoea* fueron detectadas en el árbol filogenético obtenido en el presente trabajo de investigación (Fig. 11).

Las bacterias desempeñan un papel relevante en la biorremediación de ambientes naturales contaminados por compuestos tóxicos; ejemplos de estas bacterias son *Serratia marcescens* capaz de degradar debenzofurán (Kumar y Shekhar, 2007) y el género *Acinetobacter* que degradan fenol, benzoato, petróleo crudo (Abdel-El-Haleem, 2003) y tolueno (Zilli *et al.*, 2001). Este mismo género, además, tiene como función remover fosfatos y metales pesados (Abdel-El-Haleem, 2003) y, como se mencionó anteriormente, sintetiza alcohol deshidrogenasas para la degradación de alcoholes (Bellion y Wu, 1978).

En lo que se refiere a la identificación molecular de los cultivos bacterianos mediante el análisis de su 16S ADN, en las figuras 7A, 7B y 7C, se observa el ADN total que se extrajo de 22 aislados bacterianos, estos fueron analizados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etido y observados mediante el uso de un transiluminador con luz ultravioleta.

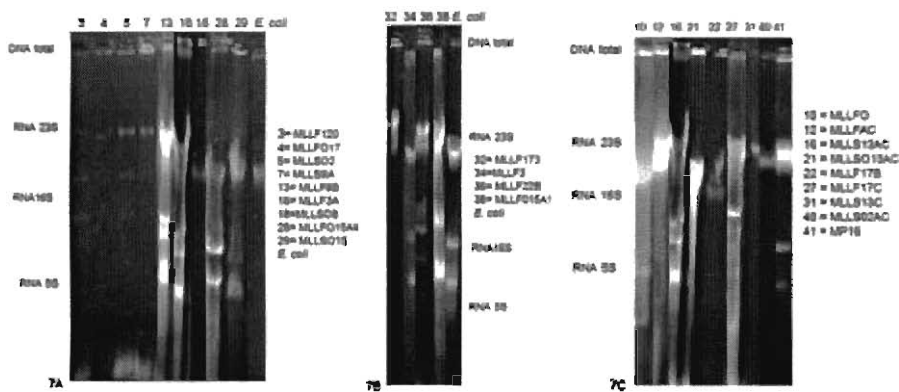


Figura 7. ADN total extraído de 22 cultivos bacterianos aislados del humedal de La Mixtequilla, analizados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etido.

Se amplificó un fragmento del gen 16S ADN de nueve cultivos bacterianos del humedal de La Mixtequilla (7 bacilos y 2 cocos) contenidos en la figura 7C, así como de *E. coli* (utilizada como referencia). Se utilizaron los iniciadores universales *forward* FBac 5' ATCATGGCTCAGATTGAACGC 3' y *reverse* CGO605R 3'

CGGTGAATACGTTCCCGGG 5' y nuevamente se cuantificó el ADN total (Tabla 20) para la secuenciación posterior. Se hicieron lecturas del ADN diluido (1:100 ó 1:50) en un espectrofotómetro a 260 nm, para ello se consideró un volumen determinado (volumen final V₁) de ADN (en microlitros) que fue diluido hasta obtener una concentración de 100 ng, misma que fue utilizada para la amplificación del gen 16S ADNr.

Tabla 20. Lecturas de ADN total en nanogramos/microlitro, de los nueve cultivos bacterianos.

Cultivos bacterianos	Dilución de ADN	Aborbancia (260 nm)	(C1) en ng/μL	(V1) en μL	H ₂ O*
MP16	1:100	0.195	772	12.945	87.05
MLLFO	1:100	0.417	2085	4.8	95.2
MLLFAC	1:100	0.537	2685	3.72	96.28
MLLSO13AC	1:100	0.133	665	15.00	85.00
MLLF17B	1:100	0.040	200	50.00	50.00
MLLS13AC	1:100	0.221	110	9.05	90.95
MLLF17C	1:500	0.121	302	33.05	66.95
MLLS13C	1:100	0.107	535	18.70	81.3
MLLSO2AC	1:100	0.243	1215	8.230	91.77

C1=ng/μL de ADN total, V1=Volumen final de ADN en μL, nm=nanómetros, ng/μ=nanogramos por microlitros. * la necesaria para contar con un volumen de 100 μL

Para amplificar el ADN por PCR, se utilizaron 100 ng/μL (1.0 μL) de ADN molde. El ADN producto de la reacción de la PCR, se depositó en un gel de agarosa al 1% contenido en una cámara de electroforesis para su migración a 120 V. Finalmente, en un transiluminador UV se observaron las bandas del fragmento del gen 16S ADNr; fue verificado el tamaño esperado del producto de aproximadamente de 1371 pb (Figura 8) y se tomaron las fotografías de las bandas con una cámara Kodak.

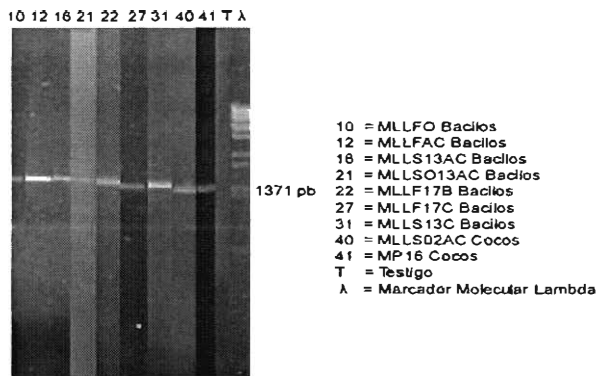


Figura 8. Bandas del fragmento del gen 16S ADNr de aproximadamente 1371 pb de los nueve cultivos bacterianos y de un testigo negativo sin ADN (T), analizados en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. Al final aparece el marcador Lambda (λ) que sirvió para estimar el tamaño del amplicón. Nota: las bandas parecen de tallas distintas debido al error de edición de la imagen.

Purificación de los productos de PCR

Los fragmentos del gen 16S ADNr de los nueve aislados bacterianos fueron purificados considerando el producto esperado de 1371 pb y observados también en un gel de agarosa al 1.0%, teñido con bromuro de etidio (Fig. 9).

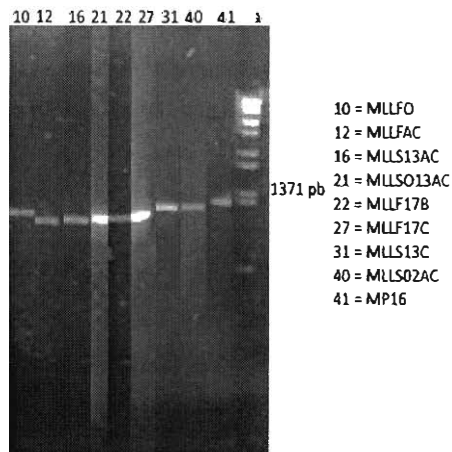


Figura 9. Bandas purificadas del gen 16S ADNr de aproximadamente 1371 pb de cada uno de los cultivos bacterianos; al final aparece el marcador molecular Lambda (λ). Nota: las bandas parecen de tallas distintas debido al error de edición de la imagen.

El ADN producto de la PCR purificada nuevamente fue cuantificado (Tabla 21) con el fin de obtener una concentración de 150-300 ng/ μ L; con este producto se amplificó un fragmento de 465 pb, utilizando los iniciadores universales para bacterias CGO (*Forward*) 465 (5' CTCCTACGGGAGGCAGCAG 3') y CGO (*Reverse*) 465 (3' CAGGATTAGATACCTGGTAG 5').

Tabla 21. Resultados de la cuantificación del ADN producto de la PCR.

Cultivos bacterianos	Dilución	Absorbancia (260 nm)	ADN en ng/ μ L (producto de la PCR) para secuenciar el ADN de doble cadena	μ L de ADN necesarios para secuenciar el ADN de doble cadena
MP16	1:50	0.037	92.5	2.0
MLLFO	1:50	147.5	67.79	3.0
MLLFAC	1:50	0.077	192.5	1.0
MLLSO13AC	1:50	0.106	37.73	5.0
MLLF17B	1:50	0.082	205.0	1.0
MLLS13AC	1:50	0.059	147.5	1.0
MLLF17C	1:50	0.065	162.5	1.0
MLLS13C	1:50	0.105	262.5	1.0
MLLSO2AC	1:50	0.052	130.0	2.0

El producto de 465 pb (parte interna del fragmento de 1371 pb) se llevó a secuenciar a la Unidad de Ácidos Nucleicos del CINVESTAV-Zacatenco.

Las secuencias de los nueve cultivos bacterianos fueron alineadas con el programa Vector NTI versión 6.0 (Fig. 10). Estas secuencias se depuraron y se sometieron al BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ubicado en el sitio del NCBI (National Center of Biotechnology Information), para compararse con secuencias parciales existentes del gen 16S ARNr de diferentes géneros y especies bacterianas (Tabla 22). Finalmente, todas las secuencias fueron alineadas con el programa Vector NTI versión 6.0 y, con el programa Mega 4, se elaboró un árbol filogenético donde se ubicaron los nueve cultivos (Fig. 11).

>ACB 05F y 06R MP16

**TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAA
AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAG
GCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAAATCCGGGGCTCAACCCCGGACTTGCAGT
GGGTACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCG
GTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGC**

>ACB09F y ACB10R MLLFO

**TGTGTGAAGAAGGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTACGCGGGGAGGAAGACGA
TAAGGTTAATACCCTTCTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTACC
TCCGTACCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGCCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGT
GCCGAAGGC**

>ACB11F y ACB12R MLLFAC

**TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGA
TGAGGTTAATAACCTTGTGCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGT
GCCGAAGGC**

>ACB13F y ACB14R MLLS013AC

**TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG
CAAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGG
CTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGA
GTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
GCCGAAGGC**

>ACB17F y AB18R MLLF17B

**TGAGCGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTCAGAGAAGAACAAGT
ACCGGAAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACGTGACCAGAAAGCAACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAACGTAGTTGCAGAGCGTTATCCGGAGA
TATGGGGCGTAAAGCGCGCGCAGCCGGCTCCTAAGTCTGATGTGAAGGCCAC
GGCTCAACCGTTGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGGAGAG
AAAAGGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGGGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGC**

>ACB21F y ACB22R MLLS13AC

**TGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGTGC
TGAGGTTAATAACCTCAGCATTTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGT
GCCGAAGGC**

>ACB23F y 24R MLLF17C

TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG
TGAGCTTAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG**GAATACCGGT**
GGCGAAGGC

>ACB25F y 26R MLLS13C

TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG
TGAGCTTAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGAATGTGAAATCCCCGG
GCCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGG
GGGTAGAATACCAGGCGAAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG**GAATTCCG**
GTGGCGAAGGC

>ACB33F y ACB34R MLLS02AC

TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGACGA
TAAGGTTAATACCCTTCTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTACC
TCCGTACCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGCCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG**GAATACCGGT**
GCCGAAGGC

Figura 10. Secuencias del 16S ADN de los nueve aislados bacterianos del humedal de La Mixtequilla. Las letras negras señalan la localización de los iniciadores; al principio se encuentra el iniciador *forward* y al final el iniciador *reverse*.

Tabla 22. Aislados bacterianos del humedal de La Mixtequilla y su relación con especies bacterianas.

Aislado y clave de acceso	Género (secuencia parcial del gen 16S ARNr)	Forma celular y Gram	Familia y Phylum	Pb	Total score	Q.cov.	Eval.	% M. Identidad
MP16 (AC806F y AC806R)		Cocos (-)		384	675	100	0	98
EL67764	<i>Jarabacter terra</i> TP36AC	Bacilos y cocos (+)	Intrasporangiaceae Actinomyces	1394	675	100	0	98
GO34403.1	<i>Physcoccus</i> L. 1b16	Cocos (+)	Intrasporangiaceae Actinomyces	1411	675	100	0	98
ELJ71152.1	<i>Tetradacter</i> sp. 13548C	Bacilos (+)	Intrasporangiaceae Actinomyces	1484	675	100	0	98
AF403018.1	<i>Tetrasphaera</i> sp. Ellin776	Cocos (+/-)	Intrasporangiaceae Actinomyces	1370	675	100	0	98
AB247111.1	<i>Korarchaeo</i> sp. S2P10	Cocos y bacilos (+)	Intrasporangiaceae	882	675	100	0	98
MLLFO (AC808F y AC810R)		Bacilos (-)		371	705	100	0	97
FJ554298	<i>Mitsuiella pneumoniae</i> B16	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae y Proteobacteria	1482	705	100	0	97
FJ54659	<i>Endophytic bacterium</i> Y03	Bacilos (+)	γ-Proteobacteria	1024	705	100	0	97
FJ527493	<i>Pectobacterium caraboverum</i> subs. <i>Pectobacterium</i> Ec37	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae y Proteobacteria	1290	705	100	0	97
MLLFC (AC811F y AC812R)		Bacilos (-)		381	705	100	0	99
FJ55336	<i>Mitsuiella pneumoniae</i> T.M1	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae y Proteobacteria	1440	705	100	0	99
FJ55784	<i>Mitsuiella</i> sp. L.3	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae y Proteobacteria	1310	705	100	0	99
MLLS013AC (AC813F y AC814R)		Bacilos (+)		381	678	100	0	99
GO28013	<i>Bacillus pumilus</i> JS-03	Bacilos (+)	Bacillaceae Firmicute	1512	678	100	0	99
GO49364	<i>Bacillus stratosphaeris</i> Jfr13G	Bacilos (+/+)	Bacillaceae Firmicute	1032	678	100	0	99
GO46505	<i>Bacillus subtilis</i> NC1	Bacilos (+)	Bacillaceae Firmicute	1427	678	100	0	99
MLL17B (AC817F y AC818)		Bacilos (-)		342	529	100	4-147	94
FJ539705	<i>Bacillus pasteurii</i> LW4	Bacilos (+/+)	Bacillaceae Firmicute	720	529	100	4-147	94
ELJ81047.1	<i>Bacillus torquophilus</i> CM25	Bacilos (+)	Bacillaceae Firmicute	1511	529	100	4-147	94
MLLS13AC (AC821F y AC822R)		Bacilos (-)		403	678	100	0	97
GO40807	<i>Enterobacter asburiae</i> AN6TSM02	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae y Proteobacteria	723	678	100	0	97
EF44825	<i>Acinetobacter radocissarii</i> Philippines-11	Cocos y ovoides (-)	Moraxellaceae y Proteobacteria	1400	678	100	0	97
FJ56656	<i>Pantoea</i> sp. PPN-25	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae y Proteobacteria	951	678	100	0	97
MLL17C (AC822F y AC824R)		Bacilos combs (-)		410	737	99	0	99
GU20796	<i>Serratia marcescens</i> C1	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae y Proteobacteria	1414	737	99	0	99
FJ55236	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PSY-11	Bacilos (-)	Pseudomonadaceae y Proteobacteria	1446	737	99	0	99
MLLS13C (AC825F y AC826R)		Bacilos (-)		389	636	100	3-179	99
EL002852.1	<i>Serratia marcescens</i> DAP-27	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae y Proteobacteria	1465	636	100	3-179	99
EL54578.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PSY-11	Bacilos (-)	Pseudomonadaceae y Proteobacteria	1454	636	100	3-179	99
MLLS02AC (AC833F y AC834R)	Bacteria no clasificada	Cocos (-)	No clasificada	371 y 1372	604	95	8-170	93

Pb=pares de bases, Total score=resultado total, Q. Cov.-Query coverage=consulta completa, Eval.=evaluado y % Max. ident.=porcentaje de máxima identidad, (-)=Gram-negativo, (+)=Gram-positivo.

En la figura 11 se observa el árbol filogenético construido con 28 secuencias de un fragmento de 310 pb del gen 16S ARNr. Nueve de las secuencias son del gen 16S ADNr de MLLFO, MLLFC, MLLS02AC, MLLS13AC, MLLF17C, MLLS013AC, MLLF17B, MLLS13C y MP16, aisladas de muestras de agua del humedal de La Mixtequilla, y 19 de las secuencias (Anexo II) son parciales del gen 16S ARNr de las diferentes especies y géneros bacterianos localizados en el BLAST.

El árbol filogenético se elaboró con el programa MEGA 4 por el método Neighbour-joining con valores de bootstrap en cada nodo representados en porcentajes, los

cuales indican un promedio de 500 réplicas que significarían que es el árbol de máxima probabilidad; este análisis soporta las relaciones filogenéticas de los cultivos con un porcentaje de identidad de 94-99% (Tabla 22).

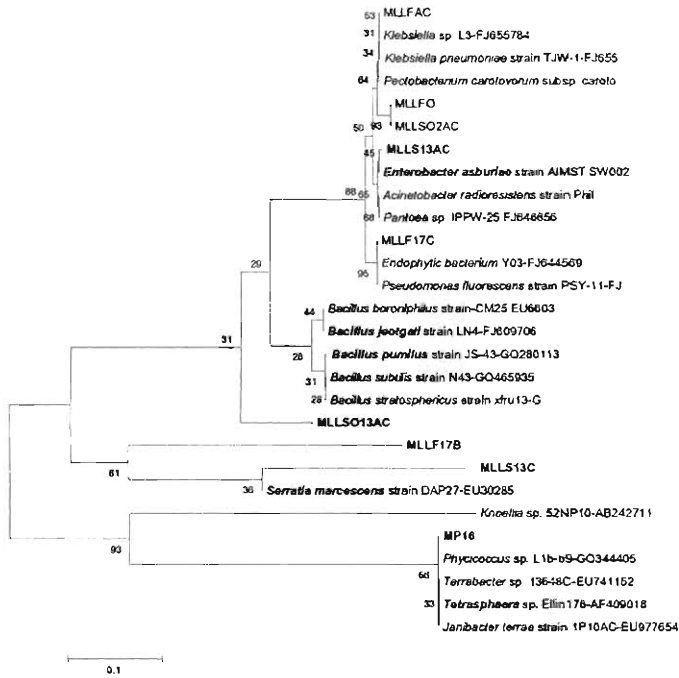


Figura 11. Árbol filogenético que indica la posición de los cultivos bacterianos con respecto a otros taxa, basado en las secuencias del gen 16S ARNr. Se observa el valor 0.1 de la barra que representa la sustitución de un nucleótido por 100 nucleótidos en las secuencias 16S rRNA.

Cabe destacar que en el árbol filogenético (Fig. 11) se observan tres grupos: el primero lo conforman las γ -Proteobacterias (Ejs. Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae), el segundo los Firmicutes (Ej. Bacillaceae) y el tercero está integrado por las Actinobacterias (Ej. Intrasporangiaceae). La especie *Serratia*

marcescens también pertenece a las γ -Proteobacteria, pero se encuentra separada de ellas (Fig. 11) posiblemente por presentar endoesporas. Anteriormente se había identificado como *Bacillus* sp., crece en presencia de 7% de NaCl (Ajithkumar *et al.*, 2003); es única entre las Enterobacterias por secretar una quitinasa, varias proteasas, una nucleasa y una lipasa (Hejazi y Falkner, 1997); presenta resistencia múltiple a los antibióticos cefalotina, cefotaxima, gentamicina, amikacina netilmicina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol (Goulet y Picard, 1997).

De los nueve aislados identificados genéticamente se lograron caracterizar catabólicamente cinco de ellos, los cuales comparten algunas características fisiológicas con *Tetrasphaera* sp. (MP16), *Bacillus pumilus* (MLLSO13AC), *Bacillus jeotgali* (MLLF17B), *Enterobacter asburiae* (MLLS13AC) y *Serratia marcescens* (MLLS13C) (Tabla 23), localizados con el BLAST del NCBI. Solamente cuatro de estos cultivos se expusieron alcoholes primarios y compuestos aromáticos y tres en los antibióticos.

Tabla. 23. Características fenotípicas de los cinco aislados bacterianos identificados mediante secuenciación de un segmento del 16S ADNr, y las especies con las que se relacionan, localizadas en el BLAST

Carácter	MP16: <i>Tetrasphaera</i> sp.	MLLSO13AC <i>Bacillus pumilus</i> ^b	MLLF17B <i>Bacillus jeotgali</i> ^e	MLLS13AC <i>Enterobacter asburiae</i> ^d	MLLS13C <i>Serratia marcescens</i> ^a
Identidad (%)	98	99	94	97	99
Forma celular	c	b	b	b	b
Gram	-	+	-	-	-
Movilidad	+	+	+	-	+
ADNasa	-	-	-	-	-
Amilasa	-	-	+	+	-
Gelatinasa	-	+	+	+	-
Esculinasa	+	+	+	+	+
Ureasa	+	+	+	+	+
Lipasa	-	-	-	-	-
Glucosa	-	+	+	+	+
Lactosa	+	+	-	+	-
Manitol	-	+	+	-	+
Manosa	-	+	-	+	+
Sacarosa	-	+	-	+	+
Maltosa	-	+	-	+	+
Fructosa	-	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-	-
Nitrito	+	-	-	-	+
Nitrato	+	-	-	-	+
Desnitrificación	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-

+ = Respuesta positiva; - = Respuesta negativa, espacios vacíos = prueba no documentada, c = coco, b = bacilo. MLLS13C no se expuso a los alcoholes y compuestos aromáticos. Las especies fueron reportadas por a = McKenzie *et al.* (2006) y Maszenan *et al.* (2000); b = Reva *et al.* (2002); c = Ten *et al.* (2007); Jung-Hoon *et al.* (2001) y Yamamura *et al.* (2007); d = Brenner *et al.* (1986), e = Rajasekar *et al.* (2007).

A continuación se describen los cinco aislados que fueron identificados mediante el análisis de su 16S ADNr del humedal de La Mixtequilla y se discuten algunas de sus posibles funciones en este ecosistema.

El aislado MP16 (Fig. 12) presentó forma de coco con respuesta negativa a la tinción Gram; fue una bacteria que mostró metabolismo anaerobio facultativo y fue aislada de la muestra de agua (12 cm de profundidad); no creció en ninguna de las concentraciones de NaCl, pero sí en presencia de metanol (0.5% y 1.0%), etanol (0.5%, 1.0% y 1.5%), 2-propanol (0.5%, 1.0% y 1.5%), tolueno y xileno (0.5%, 1.0% y 1.5%).

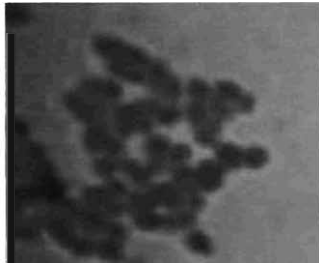


Figura 12. Cultivo bacteriano MP16 aislado de la muestra de agua del Potrero Don Rufino.

El cultivo MP16 se relacionó genéticamente con *Tetrasphaera* sp. (98% de identidad), con la que comparte algunas características fisiológicas. El género *Tetrasphaera* pertenece a la familia Intrasporangiaceae, sub-orden Micrococccineae del Phylum Actinomycetes (establecidos en el suelo) (Mckenzie *et al.*, 2006; Stackebrand y Schumann, 2006). Algunas especies de este género han sido aisladas del suelo y se ha observado que participan en la remoción de fosfatos, mismos que almacenan como gránulos de polifosfatos (Mckenzie *et al.*, 2006).

El aislado MLLSO13AC (Fig. 13) fue relacionado con *Bacillus pumillus* con 99% de identidad, presentó forma de bacilo y respuesta positiva a la tinción de Gram; fue capaz de crecer a concentraciones del 1.0% y 1.5% de NaCl, así como en metanol, 1-butanol (0.5%), 2-propanol (2.0%, 3.0% y 4.0%) y tolueno (1.0 y 1.5%) y presentó resistencia a los antibióticos CTX y NF. Cabe señalar que el cultivo MLLSO13AC presentó características fisiológicas semejantes a *Bacillus stratosphericus*, bacteria recientemente descrita por Shivaji *et al.* (2006), aislada de la atmósfera.

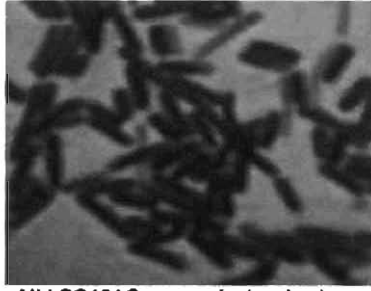


Figura 13. Cultivo MLLSO13AC proveniente de la muestra colectada en el nivel subsuperficial de El Llanete

Bacillus pumilus es una bacteria Gram-positiva con metabolismo aerobio estricto, propiedad que no comparte con el cultivo MLLSO13AC. *B. pumilus* pertenece a la familia Bacillaceae, es de vida libre y forma parte de la biota de los suelos; promueve el crecimiento de las plantas y el alargamiento de las raíces; también puede ser endófito y es capaz de producir antibióticos útiles para el control de patógenos en las plantas (Reva *et al.*, 2002).

El cultivo bacteriano MLLF17B (Fig. 14) fue un bacilo con respuesta negativa a la tinción de Gram; presentó metabolismo aerobio estricto, fue capaz de tolerar las tres concentraciones de NaCl; crece en etanol (0.5% y 1.0%), 1-butanol (1.5% y 2.0%), 2-propanol (1.0% y 1.5%), tolueno y xileno (0.5%, 1.0%, y 4.0%); presentó resistencia a los siguientes antibióticos: CTX, GE, NET, STX, AM y CB.

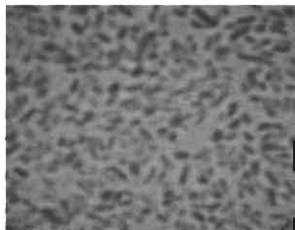


Figura 14. Cultivo MLLF17B de la muestra de agua de fondo de El Llanete.

El cultivo MLLF17B se relacionó genéticamente con *Bacillus jeotgali* (porcentaje de identidad del 94%) y fisiológicamente también comparten algunas características. *B. jeotgali* presenta células con forma de bacilo y respuesta variable a la tinción de Gram; es anaerobio facultativo (esta característica no la comparte con el aislado MLLF17B) y es capaz de acumular metales pesados como el cadmio y el zinc (Green-Ruíz *et al.*, 2008). Esta especie fue descrita por Jung-Hoon *et al.* (2001) quien la aisló del jeotgal y de sedimentos.

El cultivo MLLS13AC fue parecido genéticamente a *Enterobacter asburiae* con un porcentaje de identidad de 97%; mostró forma de bacilo con respuesta negativa a la tinción Gram y metabolismo anaerobio facultativo, característica que comparte con *E. asburiae* (Brenner *et al.*, 1986); MLLS13AC creció en presencia de 1.0% de NaCl, así como en algunas concentraciones de metanol (1.0%), etanol (0.5%, 1.0% y 1.5%), 1-butanol (en todas las concentraciones), 2-propanol (0.5%, 1.0%, 1.5% y 3.0%), tolueno y xileno (0.5%, 1.0% y 1.5%). El género *Enterobacter* fue descrito en 1960 por Hormaeche y Edwards, está ampliamente distribuido en EU y al parecer es el género más registrado de la familia Enterobacteriaceae. De manera particular, *Enterobacter asburiae* ha sido aislada de la rizósfera de plantas, produce ácido indol acético (IAA) el cual es un excelente promotor del crecimiento vegetal (Gyaneshwar *et al.*, 1999; Halda-Alija, 2003); también solubiliza el fosfato mineral de los suelos alcalinos y resiste los antibióticos AM y CF (Brenner *et al.*, 1986).

El cultivo MLLS13C (Fig.15) presentó forma de bacilo con respuesta negativa a la tinción de Gram y metabolismo anaerobio facultativo, propiedades generales de las enterobacterias. Genéticamente comparte el 99% de identidad con *Serratia marcescens*.

Este aislado fue sensible a las tres concentraciones de NaCl. Debido a la pérdida de viabilidad, no fue sometido a los antibióticos, alcoholes ni compuestos aromáticos.



Figura 15. Cultivo bacteriano MLLS13C aislado de la muestra de agua superficial de El Llanete.

Se sabe que *S. marcescens* es una especie endófito (asociada a las raíces de las plantas) y ha sido aislada de suelo, agua, raíces de plantas como arroz y maíz; promueve el crecimiento de tomate y trigo al producir IAA, incrementa el alargamiento de las raíces de las plantas y fija N₂. Induce resistencia contra patógenos (Ej. hongos y bacterias), a las plantas de tabaco, algodón y en cultivos agrícolas se utiliza para biocontrol (Press *et al.*, 1997; Gyaneshwar *et al.*, 2001); también tiene capacidad para degradar diesel (Rajasekar *et al.*, 2007).

Las especies bacterianas aisladas de los humedales podrían jugar un papel relevante en la agricultura, especialmente porque han sido asociadas genéticamente con bacterias que promueven el crecimiento de las plantas y participan en el biocontrol de patógenos (Fontes *et al.*, 2009), tal es el caso de miembros de los géneros *Serratia*, *Enterobacter* y *Bacillus* que pueden desempeñar estas funciones en los humedales de agua dulce (Halda-Alija, 2003).

De acuerdo con Fontes *et al.* (2009), ciertas bacterias asociadas a plantas favorecen la tolerancia vegetal contra compuestos tóxicos como el tolueno gracias a que es degradado en el suelo por las bacterias.

Como se indicó en párrafos previos, los cultivos bacterianos del humedal de La Mixtequilla presentaron características fenotípicas que comparten con *Enterobacter asburiae*, *Serratia marcescens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus jeotgali* y *Tetrasphaera* sp; son capaces de degradar alcoholes y compuestos aromáticos, mismos que pueden llegar al ambiente gracias a la industria petrolera que en esta zona está ampliamente extendida.

Tres aislados bacterianos identificados genéticamente no se lograron caracterizar fisiológicamente debido a que perdieron viabilidad aún cuando se trató de recuperarlos con diferentes medios de cultivo que incluyeron: agar nutritivo, medio base sin metanol y sin alguna fuente de carbono, medio base con metanol, en ninguno de éstos se observó crecimiento, sin embargo, sí se ensayaron en los alcoholes y los compuestos aromáticos. En los párrafos siguientes se presentan las características registradas de los tres cultivos antes citados.

El aislado MLLSO2AC se localizó en el BLAST como bacteria no cultivable (Tabla 22), sí presentó viabilidad en los diferentes alcoholes primarios y compuestos aromáticos; fue capaz de crecer en presencia de metanol y etanol en todas las concentraciones ensayadas; en tolueno creció al 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0% y 4.0%, de xileno al 0.5%, 1.0% y 1.5%, en 2-propanol al 0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0%; en 1-butanol al 0.5%, 1.0% y 1.5%. Finalmente, se observó que es resistente a la ampicilina y fue sensible al resto de antibióticos.

Los cultivos MLLFAC y MLLFO se relacionaron genéticamente con *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 22). El primero creció en presencia de metanol (0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0% mL/L), tolueno (0.5%, 1.0% y 4.0%), xileno (al 0.5% y 1.0%), 2-propanol

(0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% y 3.0%), 1-butanol (0.5%, 1.5%, 3.0% y 4.0%) y etanol (0.5% y 1.0%). La actividad del cultivo MLLFO fue más discreta, sólo fue capaz de crecer en metanol al 0.5%, tolueno al 1.0%, xileno al 0.5% y 4.0%; en etanol en 0.5%, 1.0% y 2.0%. El aislado bacteriano MLLF17C genéticamente es muy cercano a *Serratia marcescens* y no fue expuesto a ninguno de los alcoholes ni compuestos aromáticos.

CONCLUSIONES

Los aislados bacterianos del humedal de La Mixtequilla presentaron actividad metilótrofa al crecer en medio base con metanol y su participación en el ciclo del carbono al crecer en presencia de diferentes carbohidratos y en el del nitrógeno al reducir los nitratos a nitritos.

La mayoría de los cultivos bacterianos fueron capaces de producir ureasa con lo cual se deduce que hay urea en el humedal de La Mixtequilla.

Se identificaron genéticamente cinco cultivos bacterianos que están estrechamente, relacionados con *Tetrasphaera* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus jeotgali*, *Enterobacter asburiae* y *Serratia marcescens*.

La actividad metilotrófica de las bacterias del humedal de La Mixtequilla podría deberse a que producen enzimas alcohol deshidrogenasas que les permiten oxidar a alcoholes primarios como el metanol, etanol y 1-butanol tal y como fue realizado por las especies de los géneros *Bacillus*, *Acinetobacter* y *Enterobacter*, localizados en el BLAST.

Los antibióticos que más resistieron fueron la carbenicilina, nitrofurantoína, cefalotina y ampicilina.

El cultivo MLLSO2AC resultó identificado, en el BLAST, como un organismo no cultivable; los cultivos MLLFO y MLLFAC genéticamente se relacionaron con *Klebsiella pneumoniae* y MLLF17C con *Serratia marcescens*.

LITERATURA CONSULTADA

- Abdel-El-Haleem D. 2003. *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *African Journal of Biotechnology*, 2(4): 71-74.
- Achouak W, Sutra L, Heulin T, Jean-Marie M, Fromin N, Degraeve S, Christen R, Gardan L. 2000. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1): 9-18.
- Acuña KA, Villarreal JFC, Gracia MVL, Tijerina RM, Garza GMT, Chávez GB, Rodríguez SIP, Barrera SHA. 2008. Cinética de biodegradación de mezclas BTEoX-EMTB por medio de un proceso de bioaumentación. *Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León*, 11(1): 63-68.
- Ajithkumar B, Ajithkumar VP, Iriye R, Doi Y, Sakai T. 2003. Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. sakuensis subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1): 253-258.
- Álvarez S. 2005. La descomposición de la materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, 14(2): 17-29.
- Arfman N, Hektor HJ, Bystrykh LV, Govorukhina NI, Dijkhuizen L, Frank J. 1997. Properties of an NAD(H)-containing methanol dehydrogenase and its activator protein from *Bacillus methanolicus*. *European Journal of Biochemistry*, 244(2): 426-433.
- Ashelford KE, Fry JC, Bailey MJ, Day MJ. 2002. Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont et al. 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6): 2281-2289.
- Auman AJ, Stolyar S, Costello AM, Lidstrom ME. 2000. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 5259-5266.

- Bellion B, Wu GTS. 1978. Alcohol dehydrogenases from a facultative methylotrophic bacterium. *Journal of Bacteriology*, 135(1): 251-258.
- Bhadra B, Roy P, Chakraborty R. 2005. *Serratia ureilytica* sp. Nov., a novel urea-utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5): 2155-2158.
- Borodina E, Kelly DP, Schumann P, Rainey FA, Ward-Rainey NL, Wood AP. 2002. Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. Nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. Nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. Nov. *Archives of Microbiology*, 177(2): 173-183.
- Brenner DJ, Mcwhorter AC, Kai A, Steigerwalt AG, Farmer JJ. 1986. *Enterobacter asburiae* sp. Nov., a new species found in clinical specimens and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. Nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. Nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(6): 1114-1120.
- Brown WJ, Sautter RL, Crist AE. 1992. Susceptibility testing of clinical isolates of *Methylobacterium* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(8): 1635-1638.
- Brusseau GA, Bulygina ES, Hanson RS. 1994. Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2): 626-636.
- Bystrykh LV, Govorukhina NI, Van Ophem PW, Hektor HJ, Dijkhuizen L, Duine JA. 1993. Formaldehyde dismutase activities in Gram-positive bacteria oxidizing methanol. *Journal of General Microbiology*, 139(9): 1979-1985.
- Carballo-Cruz R. 1985. Caracterización de bacterias heterótrofas en los aportes de la laguna de Términos a la sonda de Campeche. Tesis licenciatura UNAM Facultad de Química. México DF, pp.128.
- Carmona M, Zamorro MT, Blázquez B, Durante-Rodríguez G, Juárez JF, Valderrama JA, Barragán MJL, García JL, Díaz E. 2009. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(1): 71-133.

- Chen-Hsiang L, Ya-Fen T, Jien-Wei L. 2004. Underdiagnosis of urinary tract infection caused by *Methylobacterium* species with current standard processing of urine culture and its clinical implications. *Journal of Medical Microbiology*, 53(8): 755-759.
- Chongcharoen R, Smith TJ, Flint KP, Dalton H. 2005. Adaptation and acclimatization to formaldehyde in methylotrophs capable of high-concentration formaldehyde detoxification. *Microbiology*, 151(8): 2615-2622.
- Chowdhury S, Madhusmita M, Adarsh VK, Anindita M, Ranjan TA, Ray CS. 2008. Novel metal accumulator and protease secretor microbes from east Calcutta wetland. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(3): 255-264.
- Colby J, Zatman LJ. 1973. Trimethylamine metabolism in obligate and facultative methylotrophs. *Biochemical Journal*, 132(1): 101-112.
- Colby BJ, Zatman LJ. 1975. Tricarboxylic acid-cycle and related enzymes in restricted facultative methylotrophs. *Biochemical Journal*, 148(3): 505-511.
- Correa-Basurto A. 2007. Estudio bacteriológico del agua en el Lago de los Reyes Aztecas, Tlahuac (Distrito Federal). Informe Final de Servicio Social de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México, D.F. 39 pp.
- Correa-Basurto A, Núñez-Cardona MT, Peña-Bentancourt SD. 2007. Bacterias heterótrofas aisladas del Lago de los Reyes Aztecas (Tlahuac) y su resistencia a diferentes antibióticos. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 3(1): 84-89.
- Cristales BMR, Rojas MJ, Lucio CM, Lucas HI, Villegas MC, Ramírez FLE. 2010. Diversidad bacteriana metilotrófica asociada a la cactácea (*Neobuxbaumia macrocephala*). XXXVII. Congreso Nacional de Microbiología, Morelia, 1 pp.
- Cuthbertson L, Mainprize IL, Naismith JH, Whitfield C. 2009. Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(1): 155-177.
- Da Silva MLB, Alvarez PJJ. 2004. Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8): 4720-4726.
- Demaneche S, Sanguin H, Poté J, Navarro E, Bemillon D, Mavingui P, Wildi W, Vogel TM, Simonet P. 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant

fields. *Proceeding on the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10): 3957-3962.

Dijkhuizen L, Hanson TA, Harder W. 1985. Methanol a potential feedstock for biotechnological processes. *Trends in Biotechnology*, 3(10): 262-267.

Doronina NV, Darnaeva TD, Trotsenko YA. 2003. *Methylophaga alcalica* sp. Nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1): 223-229.

Duque E, García V, De la Torre J, Godoy P, Bernal P, Ramos JL. 2004. Plasmolysis induced by toluene in a cyo β mutant of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 6(10): 1021-1031.

Evans PJ, Mang DT, Young LY. 1991. Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2): 450-454.

Fass RJ. 1983. Statistical comparison of the antibacterial activities of broad-spectrum penicillins against Gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24(2): 156-162.

Fassihiani A, Nedaeinia R. 2008. Characterization of Iranian *Pectobacterium carotovorum* strains from sugar beet by phenotypic tests and whole-cell proteins profile. *Journal of Phytopathology*, 156(5): 281-286.

Fernandes M. 2002. Atenuação natural de aquífer contaminado por derramament de gasoline. Tesis doctoral. Universidad Federal de Santa Catarina Departamento de Química. Pós-graduação em Química analica. Pp. 233.

Flores-Encarnación M, Sánchez-Cuevas M, Ortiz-Gutiérrez F. 2004. Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1-2): 47-59.

Fontes FJE, Aparecida GE, Teixeira GC, Gomes PLU, Aparecida TM, Corrêa LGV, Bressan W. 2009. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolate from tropical maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(3): 522-534.

- Fuchs LY, Chihu L, Conde C, González VM, Noguez AH, Calderón E, Avonce N, Ovando C. 1994. Mecanismos moleculares de resistencia bacteriana. *Salud Pública de México. Departamento de Biología Molecular*, 36:428-438.
- Gallego V, García MT, Ventosa A. 2005. *Methylobacterium hispanicum* sp. Nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. Nov., isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1): 281-287.
- Gallardo AA, Risso S, Fajardo MA, Belchior SE. 2004. Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum*, wittrock. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(3): 337-345.
- Gary GJW, Chanton JP. 2001. Greenhouse carbon balance of wetlands: methane emission versus carbon sequestration. *Journal International Meteorological Institute in Stockholm*, 53(5): 521-528.
- Gavini F, Mergaert J, Beji A, Mielcarek C, Izard D, Kersters K, De Ley J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. Nov., as *Pantoea agglomerans* comb. Nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(3): 337-345.
- Glagolev MV, Shnyrev NA. 2007. Dynamics of methane emission from natural wetlands in the summer and fall seasons (case study in the South of Tomsk Oblast). *Genesis and Geography of Soils*, 62(1): 7-14.
- Gómez-Manzo S, Arreguín-Espinosa R, Contreras-Zentella M, Escamilla-Marván E. 2005. Las quinoproteínas alcohol deshidrogenasas en los sistemas bacterianos: distribución, clasificación, estructura y función. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8(1): 28-37.
- González-Ávalos E, Longoria-Ramírez R. 2005. Variación del pH durante los procesos anaerobios de emisión de metano por el secado y la fermentación de excretas de ganado bovino en el centro de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21(4): 159-170.
- Goodwin PM, Anthony C. 1995. The biosynthesis of periplasmic electron transport proteins in methylotrophic bacteria. *Microbiology*, 141(5): 105-1064.

- Goulet P, Picard B. 1997. An epidemiological study of *Serratia marcescens* isolates from nosocomial infections by enzyme electrophoresis. *Journal of Medical Microbiology*, 46(12): 1019-1028.
- Green-Ruiz C, Rodriguez-Tirado V, Gomez-Gil B. 2008. Cadmium and Zinc removal from aqueous solutions by *Bacillus jeotgali*: pH, salinity and temperature effects. *Bioresource Technology*, 99(9): 3864-3870.
- Gyaneshwar P, Parekh LJ, Archana G, Poole PS, Collins MD, Hutson RA, Kumar GN. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 171(2): 223-229.
- Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B, Ladha JK. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 183(8): 2634-2645.
- Halda-Alija L. 2004. Incidence of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* species in freshwater wetlands. *Letters in Applied Microbiology*, 39(5): 445-450.
- Halda-Alija L. 2003. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(12): 781-787.
- Hanada S, Wen-Tso L, Shintani T, Kamagata Y, Kazunori N. 2002. *Tetrasphaera elongata* sp. Nov., a polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3): 883-887.
- Hans-Curt F, Neu TR, Wozniak DJ. 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*, 189(22): 7945-7947.
- Hanson RS, Hanson TE. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 60(2): 439-471.
- Heinz-Ulrich N. 1993. Methane emission from rice fields. *BioScience*, 43(7): 466-473.
- Hejazi A, Falkiner FR. 1997. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*, 46(11): 903-912.

- Hennessey TD. 1967. Inducible β -lactamase in *Enterobacter*. *Journal of General Microbiology*, 49(2): 277-285.
- Hormaeche E, Edwards PR. 1960. A proposed genus *Enterobacter*. *International Bulletin of Bacteriology Nomenclature and Taxonomy*, 10(2): 71-74.
- Hou CT, Patel RN, Laskin AI, Barnabe N, Barist I. 1983. Purification and properties of a NAD-linked 1, 2-propanediol dehydrogenase from propane-grown *Pseudomonas fluorescens* NRRL B-1244. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 223(1): 297-308.
- Hou CT. 1984. Propylene oxide production from propylene by immobilized whole cells of *Methylosinus* sp. CLR 31 in a gas-solid bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(1): 1-4.
- Jang-Young L, Kwan-Hye J, Ho CS, Hak-Sung K. 1995. Combination of the tod and the tol pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene and *p*-xylene mixture. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6): 2211-2217.
- Jean-Pierre A, Arvin E. 1995. Modelling of cometabolic transformation of ortho-xylene in a denitrifying biofilm system. *Biodegradation*, 6(1): 29-38.
- Jenkins O, Byrom D, Jones D. 1987. *Methylophilus*: a new genus of methanol-utilizing bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4): 446-448.
- Jung-Hoon Y, Seok-Sung K, Keun-Chul L, Hee KY, Hyun CS, Hee KK, Yong-Ha P. 2001. *Bacillus jeotgali* sp. Nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3): 1087-1092.
- Kageyama B, Nakae M, Yagi S, Sonoyama T. 1992. *Pantoea punctata* sp. Nov., *Pantoea citrae* sp. Nov., and *Pantoea terrae* sp. Nov., isolated from fruit and soil samples. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2): 203-210.
- Kalyuzhnaya MG, Hristova KR, Lidstrom ME, Chistoserdova L. 2008. Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. *Journal of Bacteriology*, 190(11): 3817-3823.

- Kanggs AR. 2000. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 17(4): 269-292.
- Kolb S. 2009. Aerobic methanol-oxidizing bacteria in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 300(1): 1-10.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. 2003. Diagnóstico microbiológico. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana Buenos Aires. pp. 1432.
- Kourtev PS, Nakatsu CH, Konopka A. 2009. Inhibition of nitrate reduction by chromium (VI) in anaerobic soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19): 6249-6257.
- Kumar PJ and Shekhar TI. 2007. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading *Serratia marcescens* from alkalophilic bacterial consortium of the chemostat. *Current Microbiology*, 55(5): 447-454.
- Kusler JA, Mitsch WJ, Larson JS. 1994. Humedales, *Investigación y Ciencia*, 210: 6-13.
- Labbé N, Juteau P, Parent S, Villemur R. 2003. Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal Biodome, Canada. *Microbial Ecology*, 46(1): 12-21.
- Lang E. 1996. Diversity of bacterial capabilities in utilizing alkylated benzenes and other aromatic compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 23(4): 257-260.
- Leedjäv A, Ivask A, Virta M. 2008. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology*, 190(8): 2680-2689.
- Lelieveld J, Crutzen PJ, Dentener FJ. 1998. Changing concentration lifetime and climate forcing of atmospheric methane. *Journal International Meteorological Institute in Stockholm*, 50(2): 128-150.
- León E, Seignez C, Adler N, Peringer P. 1999. Growth inhibition of biomass adapted to the degradation of toluene and xylenes in mixture in a batch reactor with substrates supplied by pulses. *Biodegradation*, 10(4): 245-250.

- Lidstrom ME, Chistoserdova L. 2002. Plants in the pink: cytokinin production by *Methylobacterium*. *Journal of Bacteriology*, 184(7): 1818.
- Lidstrom ME. 2006. Aerobic methylotrophic Prokaryotes. En: Dworkin M, Rosenberg E, Schleifer KH. (Eds). *The Prokaryotes: Ecophysiology and Biochemistry*, Volume 2, Chapter 1:20. Springer, New York. Pp. 618-634.
- Littlejohns JV, Daugulis AJ. 2008. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. *Process Biochemistry*, 43(10): 1068-1076.
- Lotz CN. 2006. Sugar preferences in nectar and fruit-eating birds: behavioral patterns and physiological causes. *Biotropica*, 38(1): 3-15.
- Loubinoux J, Rio B, Mihaila L, Fols E, Le Fleche A, Grimont PAD, Jean-Pierre M, Bouvet A. 2005. Bacteremia caused by an undescribed species of *Janibacter*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7): 3564-3566.
- Lovanh N, Hunt CS, Alvarez PJJ. 2002. Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics: aerobic continuous culture experiments. *Water Research*, 36(5): 3739-3746.
- Machnicka A, Suschka J. 2001. Activity of selected microorganisms and mixture in BTX biodegradation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 10(5): 341-346.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J, Sa T. 2006. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta*, 224(2): 268-278.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum L.*). *Chemosphere*, 69(2): 220-228.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Soon-Wo K, Tong-Min S. 2009. *Methylophilus rhizosphaerae* sp. nov., a restricted facultative methylotroph isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(11): 2904-2908.
- Maliyekkal SM, Rene ER, Philip L, Swaminathan T. 2004. Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 109(1-3): 201-211.

- Mancinelli RL, Shulls WA, McKay CP. 1981. Methanol-oxidizing bacteria used as an index of soil methane content. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(1): 70-73.
- Marco PD, Pacheco CC, Figueiredo AR, Moradas-Ferreira P. 2004. Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1): 75-80.
- Maszenan AM, Seviour RJ, Patel BKC, Schumann P, Burghardt J, Tokiwa Y, Stratton HM. 2000. Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. Nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. Nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2): 593-603.
- McKenzie CM, Seviour EM, Schumann P, Maszenan AM, Liu JR, Webb RI, Monis P, Saint CP, Steiner U, Seviour RJ. 2006. Isolates of '*Candidatus Nostocoida limicola*' blackall *et al.* 2000 should be described as three novel species of the genus *Tetrasphaera*, as *Tetrasphaera jenkinsii* sp. Nov., *Tetrasphaera vanveenii* sp. Nov. and *Tetrasphaera veronensis* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(10): 2279-2290.
- Mikesell MD, Kukor JJ, Olsen RH. 1993. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation*, 4(4): 249-259.
- Miller JA, Kalyuzhnaya MG, Noyes E, Lara JC, Lidstrom ME, Chistoserdova L. 2005. *Labrys methylaminiphilus* sp. Nov., a novel facultatively methylotrophic bacterium from a freshwater lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3): 1247-1253.
- Millet DB, Jacob DJ, Custer TG, De Gouw JA, Goldstein AH, Karl T, Singh HB, Sive BC, Talbot RW, Warneke C, Williams J. 2008. New constraints on terrestrial and oceanic sources of atmospheric methanol. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 8(23): 6887-6905.
- Morlett-Chávez JA, Ascacio-Martínez JA, Rivas-Estilla AM, Velázquez-Vadillo JF, Haskins WE, Barrera-Saldaña HA, Acuña-Askar K. 2010. Kinetics of BTEX biodegradation by a Microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and

bacterial strains isolated from it. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(7): 581-587.

Mukerjee-Dhar G, Shimura M, Miyazawa D, Kimbara K, Hatta T. 2005. bph genes of the thermophilic PCB degrader, *Bacillus* sp. JF8: characterization of the divergent ring-hydroxylating dioxygenase and hydrolase genes upstream of the Mn-dependent BphC. *Microbiology*, 151(4): 4139-4151.

Mutzel A, Reinscheid UM, Antranikian G, Müller R. 1996. Isolation and characterization of a *Thermophilic bacillus* strain, that degrades phenol and cresols as sole carbon source at 70°C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5-6): 593-596.

Nakamura K, Haruta S, Lan NH, Ishii M, Igarashi Y. 2004. Enzyme production-based approach for determining the functions of microorganisms within a community. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3329-3337.

Nakatsu CH, Hristova K, Hanada S, Xian-Ying M, Hanson JR, Scow KM, Kamagata Y. 2006. *Methylibium petroleiphilum* gen. Nov., sp. Nov., a novel methyl tert-butyl ether-degrading methylotroph of the betaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5): 983-989.

Nemec A, Musilek M, Sedo O, De Baere T, Maixnerová M, Vander Reijden TJK, Zdráhal Z, Vanechoutte M, Dijkshoorn L. 2010. *Acinetobacter bereziniae* sp. Nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. Nov., to accommodate *Acinetobacter genomic* species 10 and 11, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4): 896-903.

Nielsen DR, Leonard E, Sang-Hwal Y, Hsien-Chung T, Yuan C, Jones PKL. 2009. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metabolic Engineering*, 11(4-5): 262-273.

Núñez-Cardona MT, Correa-Basurto A, Esquivel-Herrera A, García-Mena J. 2008. El estudio de las bacterias oxidadoras de metano en la zona anegadiza de la Mixtequilla (Veracruz), un proyecto de investigación. Mem. IV Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. 21-23 de mayo 2008, León Guanajuato, México. 1-3.

- Núñez-Cardona MT, Correa-Basurto A, García-Mena J. 2009. Diseño de un medio de cultivo para el aislamiento de bacterias oxidadoras de metanol. VI encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. 19 al 21 de agosto de 2009, León Guanajuato. 1p.
- Orden GJA, De la Fuente LR. 2001. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Revista Española de Salud Pública*, 75(4): 313-320.
- Ortiz-Hernández ML, Monterrosas-Brisson M, Yáñez-Ocampo G, Sánchez-Salinas E. 2001. Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 17(3): 147-155.
- Osvaldo LC. 2007. La tinción de Gram como herramienta de uso diario en el diagnóstico precoz de algunos patógenos. *Revista del Hospital del Niño*, 23(2): 140-146.
- Otenio MH, Lopes Da Silva MT, Oliveira MML, Roseiro JC, Bidoia ED. 2005. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3): 258-261.
- Pacheco JA, Pat CR, Cabrera SA. 2002. Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. *Ingeniería*, 6(3): 73-81.
- Patel RN, Hou CT, Felix A. 1978. Microbial oxidation of methane and methanol: crystallization of methanol dehydrogenase and properties of holo- and apo methanol dehydrogenases from *Methylomonas methanica*. *Journal of Bacteriology*, 133(2): 641-649.
- Peinador MV, Prieto JCS, Cuevas MG, Macías AG, Herrero JA, García FU, De Zárate MMO. 1999. Intoxicación mortal por metanol. *Emergencias*, 11(4): 315-319.
- Pesaro M, Widmer F. 2002. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(1): 89-98.
- Phelps CD, Young LY. 1999. Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation*, 10(1): 15-25.

- Pinto MA, Clayton TR, Di MC, Beraldo ME, Maciel FR, Regali SMH, Contiero J, Tauk TSM, De Franceschi AD. 2010. Aerobic biodegradation of butanol and diesel oil blends. *African Journal of Biotechnology*, 9(42): 7094-7101.
- Press CM, Wilson M, Tuzun S, Kloepper JW. 1997. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systematic resistance in cucumber or tobacco. *The American Phytopathological Society*, 10(6): 761-768.
- Putman M, Veen HW, Degener JE, Konings WN, Koning WN. 2001. The lactococcal secondary multidrug transporter LmrP confers resistance to lincosamides, macrolides, streptogramins and tetracyclines. *Microbiology*, 147(10): 2873-2880.
- Radajewski S, Webster G, Reay DS, Morris SA, Ineson P, Nedwell DB, Prosser JI, Murrell C. 2002. Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable isotope probing. *Microbiology*, 148(8): 2331-2342.
- Rajasekar A, Ganesh BT, Karutha PST, Maruthamuthu S, Palaniswamy N, Rajendran A. 2007. Role of *Serratia marcescens* ACE2 on diesel degradation and its influence on corrosion. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 34(9): 589-598.
- Radjchenberg-Ceceña E, Rodríguez-Ruíz JA, Juárez LK, Martínez JA, Morales AS. 2009. Producción microbiológica de butanol. *Biotecnología*, 13(3): 26-38.
- Ranganathan S, Maranas CD. 2010. Microbial 1-butanol production: identification of non-native production routes and in silico engineering Interventions. *Biotechnology Journal*, 5(7): 716-725.
- Reva ON, Smirnov VV, Pettersson B, Priest FG. 2002. *Bacillus endophyticus* sp. Nov. isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1): 101-107.
- Ritchie DA, Edwards C, McDonald IR, Murrell JC. 1997. Detection of methanogens and methanotrophs in natural environments. *Global Change Biology*, 3(4): 339-350.
- Rivera-Becerril F, Signoret-Poillon M, Ayala-Zermeño MA, Castilla-Hernández P, García-Mena J, Mier T, Núñez-Cardona MT, Romero-Martínez N, Sánchez-Santillán N, Torres-Corona NC, Viccon-Pale JA. 2008. Algunos aspectos ambientales y biológicos de dos Potrereros inundables de la Mixtequilla. *ContactoS*, 70: 31-39.

- Shivaji S, Chaturvedi P, Suresh K, Reddy GSN, Dutt CBS, Wainwright M, Narlikar JV, Bhargava PM. 2006. *Bacillus aerius* sp. Nov., *Bacillus stratosphericus* sp. Nov. and *Bacillus altitudinis* sp. Nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7): 1465-1473.
- Signoret M, Viccon PJA, Torres CNC, Yépez G. 2005. Producción de pulpa de recullillas en la Mixtequilla, Veracruz, México. Centro de conservación y biología. Primer Congreso Internacional de Casos Exitosos de Desarrollo Sostenible del Trópico. 2-4 de mayo de 2005. Boca de Río, Veracruz, México, 10 pp.
- Song J, Jang-Cheon C. 2007. *Methylibium aquaticum* sp. Nov., a betaproteobacterium isolated from a eutrophic freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(9): 2125-2128.
- Stackebrandt E, Schumann P. 2006. Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH y Stackebrandt E. *The Prokaryotes*, 3^ª Ed., volume 3. part. B. Springer New-York. p. 297-321.
- Starkenburger SR, Arp DJ, Bottomley PJ. 2008. D-lactate metabolism and the obligate requirement for CO₂ during growth on nitrite by the facultative lithoautotroph *Nitrobacter hamburgensis*. *Microbiology*, 154(8): 2473-2481.
- Steffan JR, McClay K, Vainberg S, Condee CW y Zhang D. 1997. Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether, and tert-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11): 4216-4222.
- Stock I, Wiedemann B. 2001. Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. *Journal Medical of Microbiology*, 50(5): 396-406.
- Sung-Ho Y, Young-Je Y. 2002. Analysis of microbial adaptation at enzyme level for enhancing biodegradation rate of BTX. *Korean Journal Chemical Engineering*, 19(5): 780-782.
- Swain MR, Ray RC. 2009. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research*, 164(2): 121-130.

- Ten LN, Sang-Hun B, Wan-Taek I, Larina LL, Jung-Sook L, Hee-Mock Oh, Sung-Taik L. 2007. *Bacillus pocheonensis* sp. Nov., a moderately halotolerant, aerobic bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(11): 2532-2537.
- Tian T, Xiao-Gang W, Hui-Mei D, Li-Qun Z. 2010. The resistance-nodulation-division efflux pump EmhABC influences the production of 2, 4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Microbiology*, 156(1): 39-48.
- Torres-Alvarado R, Ramírez-Vives F, Fernández FJ, Barriga-Sosa I. 2005. Methanogenesis and methane oxidation in wetlands. Implications in the global carbon cycle. *Hidrobiologica*, 15(3): 327-349.
- Torres AMR, Fernández PF, Barrigas SIA, Ramírez VF. 2006. Dinámica de las bacterias anaeróbicas en las fases terminales de la mineralización de la materia orgánica en el sedimento de los ecosistemas Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola. *Hidrobiologica*, 16(2): 183-196.
- Torres AR, Gutiérrez MF, Contreras EF. 2002. Calentamiento atmosférico: la importancia de la metanogénesis y los humedales. *ContactoS*, 43: 19-31.
- Torres RD. 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas. Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, 2: 1-5.
- Towner KJ. 1977. Clinical Importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 46(9): 721-746.
- Townsend SM, Hurrell E, Caubilla-Barron J, Loc-Carillo C, Forsythe SJ. 2008. Characterization of an extended-spectrum beta-lactamase *Enterobacter hormaechei* nosocomial outbreak, and other *Enterobacter hormaechei* misidentified as *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. *Microbiology*, 154(12): 3659-3667.
- Tsao CW, Song HG, Bartha R. 1998. Metabolism of benzene, toluene and xylene hydrocarbons in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12): 4924-4929.
- van Aken B, Peres CM, Lafferty SD, Moon JY, Schnoor JL. 2004. *Methylobacterium populi* sp. Nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra*

- DN34). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1191-1196.
- van den Bogaard AE, Stobberingh EE. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(4): 327-335.
- van Dien SJ, Lidstrom ME. 2001. Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C₃ and C₄ metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(3): 298-310.
- van-Niel CB. 1971. Techniques for the enrichment, isolation and maintenance of the photosynthetic bacteria. *Methods in Enzymology*, 23: 3-28.
- Vanzzini VR, Alcantara-Castro M, Flores V. 2009. Susceptibilidad a netilmicina en 400 cepas bacterianas aisladas de infecciones oculares. *Revista Mexicana Oftalmológica*, 83(1): 1-5.
- Vila J, López Z, Sabaté J, Minguillón C, Solanas AM, Grifoll M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain API: actions of the isolate on two-and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12): 5497-5505.
- Vorob'ev AV, Boer W, Folman LB, Bodelier PLE, Doronina NV, Suzina NE, Trotsenko YA, Dedysh SN. 2009. *Methylovirgula ligni* gen. Nov., sp. Nov., an obligately acidophilic, facultatively methylotrophic bacterium with a highly divergent *mxhF* gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10): 2538-2545.
- Wai-Ching H, McKay GA, Thompson PR, Sweet RM, Yang DSC, Wright GD, Berghuis AM. 1997. Structure of an enzyme required for Aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. *NCBI*, 89(6): 887-895.
- Wilches FAM. 2004. Caracterización preliminar de enzimas relacionadas con la síntesis de exopolisacáridos producidos por *Raoultella terrigena* y *Pseudomonas fluorescens*. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, 28(109): 1-8.

- Worm J, Gustavson K, Garde K, Henrik BN, Sondergaard M. 2001. Functional similarity of attached and free-living bacteria during freshwater phytoplankton blooms. *Aquatic Microbial Ecology*, 25(2): 103-111.
- Wright AL, Reddy KR. 2001. Phosphorus loading effects on extracellular enzyme activity in Everglades wetland soils. *Soil Science Society of America Journal*, 65(2): 588-595.
- Yamamura S, Yamashita M, Fujimoto N, Kuroda M, Kashiwa M, Sei K, Fujita M, Ike, M. 2007. *Bacillus selenatarsenatis* sp. Nov., a selenate and arsenate-reducing bacterium isolated from the effluent drain of a glass-manufacturing plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5): 1060-1064.
- Yang SW, Aeen-Lin C, Hsiu-Hui C. 2000. *Vibrio aerogenes* sp. Nov., a facultatively anaerobic marine bacterium that ferments glucose with gas production. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1): 321-329.
- Yu-Qin Z, Wen-Jun L, Kroppenstedt RM, Chang-Jin K, Guo-Zhong C, Dong-Jin P, Li-Hua X, Cheng-Lin J. 2005. *Rhodococcus yunnanensis* sp. Nov., a mesophilic actinobacterium isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3): 1133-1137.
- Zilli M, Palazzi E, Sene L, Converti A, Del Borghi M. 2001. Toluene and styrene removal from air in biofilters. *Process Biochemistry*, 37(4): 423-429.

ANEXO I

MEDIOS DE CULTIVO Y TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS BACTERIANOS.

Anexo IA

Solución salina para hacer las diluciones de los aislados

1000.0 mL Agua destilada

0.8 g NaCl

Agar nutritivo

1000.0 mL Agua destilada

15.0 g Agar bacteriológico (BIOXON)

8.0 g Caldo nutritivo (BIOXON)

Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 20 minutos. Enfriar de 45-50 °C y vaciar en cajas Petri. Este medio de cultivo se utilizó para hacer crecer los cultivos bacterianos puros y para su conservación en viales de 5.0 mL inclinado.

Técnica para la tinción de Gram (Carballo-Cruz, 1985)

Cristal violeta-oxalato de amonio.

Solución A

200.0 mL Alcohol etílico 96%

0.2 g Cristal violeta.

Solución B

80.0 mL Agua destilada

0.8 g Oxalato de amonio

Combinar ambas soluciones y filtrar, dejar reposar durante 24 h.

Lugol

Solución A

240.0 mL Agua destilada

1.0 g Yodo (cristales).

1.0 g Yoduro de potasio

Solución B.

60.0 mL NaHCO₃. al 5%

Combinar las soluciones A y B; filtrar con papel filtro y dejar reposar durante 24 h de oscuridad antes de ser utilizado.

Safranina

100.0 mL Alcohol etílico (96%)

1.0 g Polvo de safranina

Agitar hasta que se disuelva y dejar reposar durante 24 h antes de ser utilizado.

Preparación de las muestras (hacer frotis de los cultivos bacterianos en solución salina para fijarlos en el portaobjetos) y aplicación de la tinción de Gram (Carballo-Cruz, 1985).

Cubrir con Lugol para fijar el cristal violeta, dejar reposar durante un minuto y retirarlo con agua corriente.

Cubrir con alcohol (para romper las membranas celulares), dejar reposar durante un minuto y lavar con agua corriente.

Finalmente cubrir con safranina y retirar la safranina completamente con agua corriente.

Dejar secar al portaobjetos con el frotis.

Posteriormente, se hacen observaciones al microscopio óptico con tamaño de objetivo de 100X con el fin de conocer las formas celulares de los aislados bacterianos y su respuesta a la tinción de Gram. Si las células bacterianas presentan color rosa su respuesta a la tinción de Gram es negativa y si son moradas es positiva. Por último, se toman fotografías de algunas de las formas celulares bacterianas.

Anexo I B

Medios de cultivo para las pruebas fisiológicas

- 1.0 g Extracto de levadura
- 1.0 g Peptona bacteriológica
- 1.0 mL Cloruro férrico (1.2 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y 1000 mL de agua destilada)
- 1000.0 mL Agua destilada
- 0.5%, 1.0%, 1.5% NaCl por separado
- Ajustar el pH a 7.5
- 15.0 g Agar bacteriológico

Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión a 121°C durante 20 minutos, dejar enfriar, después de 24 h inocular los aislados bacterianos e incubar durante 24-48 h a 28°C, después de ese tiempo, se realizaron las lecturas al observar mayor crecimiento que en el testigo sin NaCl.

Anexo I C

Técnicas utilizadas para las pruebas bioquímicas

Para caracterizar catabólicamente los cultivos bacterianos se prepararon medios de cultivo conteniendo caldo rojo de fenol con sustratos diferentes que incluyeron: glucosa, lactosa, manosa, sacarosa, manitol, maltosa y fructosa.

1000.0 mL Agua destilada
16.0 g Base rojo fenol (base de caldo rojo-fenol BIOXON)
5.0 g Sustrato

Esterilizar en autoclave a 15 libras a presión de 121°C durante 20 minutos y dejar enfriar, después de 24 h inocular los cultivos bacterianos puros, dejar incubar durante 24-48 h a 28 °C. Se considera como positivo el cambio del medio de cultivo de color rojo a amarillo.

Medio SIM, es útil para observar la producción de indol, H₂S y la movilidad de los aislados bacterianos

1000.0 mL Agua destilada
30.0 g Medio SIM (BIOXON)

Esterilizar en autoclave a 15 libras a presión a 121°C durante 20 minutos y dejar enfriar durante 24 h, inocular los cultivos bacterianos puros e incubar durante 24-48 horas a 28 °C. La producción de H₂S se evidencia por la presencia de color negro en el cultivo. Para observar la producción de indol se adicionaron 3 gotas de reactivo de Kovacs con el cual se observa la presencia de color rojo en la superficie del medio de cultivo bacteriano que indica la producción de indol y la movilidad es observada cuando el cultivo migra alrededor de inóculo.

Preparación del reactivo Kovacs el cual es utilizado para observar la producción de Indol en los cultivos.

Reactivo Kovacs

150.0 ml Alcohol amílico o isoamílico (puede sustituirse por alcohol butílico)
1.0g p-dimetilamino-benzaldehído
50.0 mL HCl concentrado

Óxido-fermentación en glucosa, sacarosa y fructosa

- 1000.0 mL Agua destilada
- 16.0 g Caldo base rojo de fenol (BIOXON)
- 5.0 g Sustrato
- 0.3 g Agar bacteriológico (BIOXON)

Hervir hasta disolverse y servir en tubos de ensaye con tapones de algodón, esterilizar en autoclave a 15 libras a presión (121°C) durante 20 minutos, después de 24 h, se inoculan los aislados por duplicado y se coloca cera a uno de ellos; se incuban durante 24-48 h a 28 °C. El cambio de color rojo a amarillo en ambos cultivos indica respuesta positiva a la anaerobiosis facultativa. Cuando hay cambio de color en un solo tubo quiere decir que es aerobio estricto. Descrito en Carballo-Cruz (1985).

Reducción de nitratos y nitritos (Carballo-Cruz, 1985)

- 1000.0 mL Agua destilada
- 8.0 g Caldo nutritivo
- 1.0 g Nitrato de potasio

Ajustar el pH a 7.5

Distribuir 9.0 mL en cada tubo de ensaye con capacidad de 15.0 mL y para observar la producción de gas, se colocó una campana Durhan.

Esterilizar en autoclave a 15 libras a presión (121°C) durante 20 minutos, después de 24 h se inoculan los cultivos e incubar durante 24-48 h a 28 °C

Para determinar la reducción de nitratos a nitritos agregar la reactivos Griess A y B (3 gotas de cada uno). Si al agregarlos se observa el color rojo la reducción de nitratos es positiva y de nitritos es negativa. Si no cambia de color se agrega un poco de polvo zinc, si con este no cambia de color quiere decir que hubo reducción de nitratos y nitritos y si los cultivos viran a rojo, la reducción de nitratos a nitritos es negativa.

Desnitrificación (Carballo-Cruz, 1985)

- 1000.0 mL Agua destilada
- 1.0 g Nitrato de potasio (Fermont)
- 5.0 g Extracto de levadura
- 1.0 mL Glicerol
- 9.1 g Bacto-peptona

Ajustar el pH a 7.5 (Antes de agregar la Bacto-peptona)

Esterilizar en autoclave a 15 libras a presión (121°C) durante 20 minutos, después de 24 h se inoculan los cultivos bacterianos y se coloca cera para simular condiciones anaerobias, se incuban (24-48 h a 28 °C), es positivo cuando hay presencia de gas.

Agar-Citrato de Simmons

- 1000.0 mL Agua destilada
- 22.0 g Citrato de Simmons (BIOXON)

Hervir para disolver y vaciar (3.0 mL) en tubos de ensaye, esterilizar en autoclave a 15 libras a presión (121°C) durante 20 minutos, después de 24 h, inocular los cultivos bacterianos e incubar de 24-48 h a 28 °C después de este tiempo, el cambio de color verde a azul del medio de cultivo muestra respuesta positiva como única fuente de carbono.

Lisina descarboxilasa

- 1000.0 mL Agua destilada
- 14.0 g Caldo de lisina descarboxilasa (BIOXON)

Vaciar 4.0 mL en tubos de ensaye esterilizar en autoclave a 15 libras (121°C) durante 20 minutos. Dejar enfriar durante 24 h, inocular los aislados bacterianos e incubarlos durante 24-48 h a 28 °C, el cambio de color café claro indica respuesta positiva a la producción de la enzima lisina descarboxilasa.

Anexo I D

Técnicas para la producción de enzimas extracelulares.

Los aislados bacterianos antes de ser inoculados en los medios de cultivo que contienen sustratos para la producción de enzimas extracelulares, fueron inoculados en tubos de ensayo con 3.0 mL de caldo nutritivo.

Amilasa

1000.0 mL	Agua destilada
23.0 g	Agar nutritivo
1.5 g	Almidón soluble
5.0 g	Cloruro de sodio

Ajustar el pH a 7.5

Esterilizar en autoclave a 15 libras (121°C) durante 20 minutos. Dejar enfriar a 40-45°C, servir en cajas de Petri, después de 24 h inocular los cultivos bacterianos e incubarlos (24-48 h a 28 °C), crecido el cultivo cubrir la caja de Petri con lugol. La presencia de un halo color transparente (amarillo) alrededor de los cultivos muestra una respuesta positiva para la producción de amilasa.

Gelatinasa

1000.0 mL	Agua destilada
23.0 g	Agar nutritivo
4.0 g	Gelatina bacteriológica

Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 20 minutos. Dejar enfriar de 40-45 °C. Servir en cajas Petri después de 24 h inocular los cultivos e incubarlos de 24-48 h a 28 °C, con los cultivos crecidos, al cubrir la placa con solución de cloruro mercúrico se observó respuesta positiva a la producción de la gelatinasa al presentar un halo de degradación transparente en torno al crecimiento.

ADNasa

1000.0 mL Agua destilada

42.0 g Agar para prueba de ADNasa (BIOXON)

Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 20 minutos. Dejarlo enfriar de 40-45°C y servir en cajas de Petri, después de 24 h inocular los aislados bacterianos e incubar durante 24-48 h a 28°C, crecidos los cultivos cubrir la placa con HCl 1.0 N, un halo de degradación blanquecino en el contorno del cultivo muestra la prueba positiva a la producción de ADNasa.

Ureasa

1000.0 mL Agua destilada

15.0 g Agar bacteriológico

29.0 g Base de agar urea (BIOXON)

Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C), durante 20 minutos. Dejar enfriar hasta 40-45°C y colocar la base de agar urea estéril con el agar bacteriológico, mezclarlos y vaciar en tubos de ensaye, después de 24 h inocular los aislados bacterianos e incubar durante 24-48 h a 28°C la presencia del color rosa en los cultivos indica respuesta positiva a la producción de la ureasa.

Esculinasa

15.0 mL Agua destilada

1.0 g Peptona bacteriológica

1.0 g Esculina

1.0 g FeSO₄

Ajustar el pH a 7.5

15.0 g Agar bacteriológico (después de medir el pH).

Esterilizar en autoclave a 15 libras (121°C), durante 20 minutos. Dejar enfriar de 40-45°C y servir en cajas Petri, después de 24 h inocular los cultivos bacterianos e incubar (24-48 h a 28°C). La respuesta positiva a la producción de esculinasa se evidencia por la presencia de un halo oscuro alrededor del cultivo.

Polisacárido de Levana

1000.0 mL Agua destilada
8.0 g Caldo nutritivo (BIOXON)
15.0 g Agar bacteriológico (BIOXON)
40.0 g Sacarosa

Ajustar pH a 7.5

Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C), durante 20 minutos. Dejar enfriar de 40-45°C y servir en cajas Petri, después de 24 h inocular los aislados bacterianos e incubar de 24-48 h a 28°C, hacer las lecturas. El resultado es positivo para la producción del polisacárido de Levana cuando las colonias presentan un aspecto viscoso.

Tween 80 (lipasa)

1000.0 mL Agua destilada
38.0 g Müeller-Hinton (Merck)
2.0 mL Tween 80

Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C), durante 20 minutos. Dejarlo enfriar de 40-45°C y servir en cajas Petri, después de 24 h inocular los cultivos e incubar (24-48 h a 28°C). La respuesta positiva a la producción de la lipasa al presentar alrededor del cultivo se forman estructuras pequeñas como si parecieran cristales.

ANEXO II

Secuencias parciales del gen 16S ARNr de las especies y géneros bacterianos localizados en el BLAST del NCBI

Secuencias de los géneros y especies localizadas en el BLAST. Las letras marcadas en negro, representan los iniciadores localizados; al principio de la secuencia (*forward*) y al final de ésta (*reverse*).

>EU977654-*Janibacter terrae* strain 1P10AC

TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGA
CGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAG
GGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGCT
CTGCTGTGAAAATCCGGGGCTCAACCCCGGACTTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAG
TGTGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG
AACACCGATGGCGAAGGC

>GQ344405-*Phycoccus* sp. L1b-b9

TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGA
CGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAG
GGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGCT
CTGCTGTGAAAATCCGGGGCTCAACCCCGGACTTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAG
TGTGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG
AACACCGATGGCGAAGGC

>EU741152-*Terrabacter* sp. 13648C

TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGA
CGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAG
GGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGCT
CTGCTGTGAAAATCCGGGGCTCAACCCCGGACTTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAG
TGTGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG
AACACCGATGGCGAAGGC

>AF409018-*Tetrasphaera* sp. Ellin176

TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGA
CGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAG
GGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGCT
CTGCTGTGAAAATCCGGGGCTCAACCCCGGACTTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAG
TGTGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG
AACACCGATGGCGAAGGC

>AB242711-*Knoellia* sp. 52NP10

TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGGAAAAGTGAC
GGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGG
GTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGCTC
TGCTGTGAAAATCCGGGGCTCAACCCCGGACTTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGT
GTGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG
ACACCGATGGCGAAGGC

>FJ527483-*Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum strain Ecc3-7

TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGG
TTAATAACCTTGTGCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATT
CGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC

>*Endophytic bacterium* Y03-FJ644569

AGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGTAGCTTAATACGCT
CATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG
TTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAACTGGC
AAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATCTGGAGGAATACCG

>FJ655996-*Klebsiella pneumoniae* strain TJW-1

TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAG
GTTAATAACCTTGTGCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
ACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
TCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC

>FJ655784-*Klebsiella* sp. L3

TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGAG
GTTAATAACCTTGTGCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
ACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
TCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC

>*Bacillus pumilus* strain JS-43-GQ280113

AGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTC
GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGG
AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATGTGGAGGAACACCA

>GQ480484-*Bacillus stratosphericus* strain xfru13G

TGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGA
GTAACCTGCTTGACCTTACCGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTC
GCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
GAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC

>GQ465935-*Bacillus subtilis* strain N43

TGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGA
GTAACCTGCTTGACCTTACCGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTC
GCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
GAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC

>FJ609706-*Bacillus jeotgali* strain LN4

**TGAGCGATGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTTGT CAGGGAAGAACAAGTACCGG
AGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT
TGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC**

>EU660347-*Bacillus boroniphilus* strain CM25

**TGAGCGATGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTTGT CAGGGAAGAACAAGTACCGG
AGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT
TGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC**

>GQ420687-*Enterobacter asburiae* strain AIMST SW002

**TGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTT CAGCGGGGAGGAAGGTGCTGAGG
TTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
CGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC**

>EF446895-*Acinetobacter radioresistens* strain Philippines-11

**TGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTT CAGCGGGGAGGAAGGTGTTGAGG
TTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
CGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC**

>FJ646656-*Pantoea* sp. IPPW-25

**TGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTT CAGCGGGGAGGAAGGTGTTGAGG
TTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
CGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC**

>EU302852.1-*Serratia marcescens* strain DAP27

**TGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTT CAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGC
TTAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
TGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC**

>FJ652595-*Pseudomonas fluorescens* strain PSY-11

**TGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTT CAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGC
TTAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
GAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC**