

Capacidad para crecer en alcoholes y compuestos aromáticos de bacterias metilotróficas aisladas del humedal La Mixtequilla, Veracruz

Antonia Correa Basurto,¹ María Teresa Núñez-Cardona, Jaime García Mena y Alfonso Esquivel Herrera

Resumen. Se evaluó la capacidad de bacterias metilotróficas acuáticas del humedal La Mixtequilla (Veracruz), para crecer en alcoholes y compuestos aromáticos. Para aislarlas se utilizó un medio con metanol y se observó su crecimiento a concentraciones diferentes de metanol, etanol, 1-butanol, 2-propanol, tolueno y xileno (0.5-4 mL/L). Los cultivos fueron caracterizados e identificados genéticamente. Se obtuvieron 38 cultivos de bacterias metilotróficas que crecieron en todas las concentraciones de alcoholes y compuestos aromáticos ensayados. Nueve aislados fueron identificados genéticamente y sólo cinco de éstos fueron caracterizados catabólicamente, el análisis de su 16S rDNA reveló que fueron similares a *Tetrasphaera* sp., *Bacillus pumilus*, *B. jeotgali*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*. Estos cultivos podrían ser útiles para biorremediar ambientes impactados negativamente por actividades humanas.

¹ Departamento El Hombre y su Ambiente, Laboratorio de Ecología Microbiana, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, e-mail: basurtona@gmail.com.

Palabras clave: bacterias metilotróficas, humedal, metanol, alcoholes, compuestos aromáticos.

Abstract. The growth capability on alcohols and aromatic compounds was assessed for bacteria isolated from water samples of the wetland La Mixtequilla (Veracruz). Methylo-trophic activity of bacterial isolates was detected through their ability to grow on a culture medium with methanol as sole carbon and energy source. Isolates were purified before testing their ability to grow on methanol, ethanol, 1-butanol, 2-propanol, toluene and xylene as sole carbon sources. These isolates were catabolically characterized and genetically identified; bacterial growth was detected in all the alcohols and aromatic compounds, at all concentrations which they were assayed; nine of the isolates were genetically identified and five of them were catabolically characterized. The 16S rDNA analysis revealed that they were similar to *Tetrasphaera* sp., *Bacillus pumilus*, *B. jeotgali*, *Enterobacter asburiae* *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*. These isolates could be useful for bioremediation of environments negatively impacted by human activities

Key words: methylo-tropic bacteria, wetland, methanol, alcohols, aromatic compounds.

INTRODUCCIÓN

El metanol (CH₃OH) es un alcohol de bajo peso molecular que puede encontrarse en el suelo a concentraciones no detectables y es liberado a la atmósfera, lo cual ha contribuido a la formación de ozono troposférico (Kolb, 2009), tóxico para los seres vivos cuando se acumula (Peinador *et al.*, 1999).

Este compuesto puede ser utilizado como única fuente de carbono y energía por bacterias metilotróficas que lo oxidan mediante la producción de enzimas alcohol deshidrogenasas, en especial la metanol deshidroge-

nasa (Bellion y Wu, 1978; Radajewski *et al.*, 2002) puede ser sintetizada al adicionar metanol como sucede en *Pseudomonas dinitrificans* y miembros del género *Methylobacterium* (Goodwin y Anthony, 1995).

La diversidad de bacterias metilotróficas es muy amplia y puede incluir a los taxa α , β y γ Proteobacteria, además de Firmicutes (Kolb, 2009); se ha observado que un gran número de ellas son benéficas para el crecimiento de plantas al producir fitohormonas, controlar a patógenos y eliminar compuestos tóxicos como los polifosfatos (Madhaiyan *et al.*, 2007).

Además de participar en el ciclo del carbono, las bacterias metilotróficas crecen sobre una gran diversidad de sustratos como metilaminas y formiato; son capaces de tolerar la presencia de diferentes metales pesados, así como atmósferas saturadas con compuestos volátiles como benceno, xilenos, estireno y naftaleno, es decir, co-oxidan un número importante de hidrocarburos y sus derivados provenientes del petróleo y de otras actividades industriales y humanas (Marco *et al.*, 2004).

Las bacterias metilotróficas en los humedales oxidan al metano y evitan que concentraciones elevadas de este gas (de efecto invernadero) lleguen a la atmósfera y, como se indicó anteriormente, también son capaces de asimilar o tolerar diferentes contaminantes que incluyen a derivados de hidrocarburos, alcoholes y metales pesados. De esta forma, los beneficios ambientales que ofrecen estas bacterias son muy amplios, y en los humedales no son la excepción.

El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar bacterias metilotróficas del humedal La Mixtequilla para conocer su capacidad de crecimiento en alcoholes y compuestos aromáticos.

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA, MÉTODOS Y TÉCNICAS

La zona de estudio está ubicada en el Municipio Ignacio de la Llave, en una región conocida como Mixtequilla, localizada entre las coordenadas 18° 32.084' Norte y 95° 57.538' Oeste, a 25 msnm. En épocas de

inundación, sus habitantes se dedican a recolectar al acocil *Procambarus acanthophorus* (reculilla), que es una fuente importante de ingresos económicos para sus habitantes; al igual que en otros humedales; en época de secas, esta región es destinada para la crianza de ganado (Signoret *et al.*, 2005)

Recolecta y análisis de las muestras

A finales de la época de secas (18 de noviembre de 2008), se recolectaron muestras de agua (con frascos de vidrio estériles) en dos puntos anegados, uno conocido como El Llanete y otro como Potrero de Don Rufino. En ambos se tomaron registros de temperatura, pH y salinidad en el agua; asimismo se registró la geoposición de la zona. Las muestras recolectadas fueron transportadas a un laboratorio provisional, acondicionado para trabajar *in situ*.

Con las muestras de agua se hicieron diluciones en solución salina (NaCl 0.08%) y 0.1 ml de éstas fueron utilizadas para inocular cajas Petri con medio de cultivo conteniendo metanol (5.0 ml/1000) como única fuente de carbono y energía, de acuerdo con lo propuesto por Núñez-Cardona *et al.* (2009).

Obtención y conservación de los cultivos puros

Se seleccionaron colonias al azar y obtuvieron cultivos puros (técnica de siembra y resiembra); su especificidad se verificó mediante observaciones directas de la morfología colonial y la celular al observarlas con un microscopio óptico (objetivo 100 X), previa tinción de Gram. Los cultivos puros fueron conservados a 4 °C en viales con agar nutritivo.

Exposición de los cultivos puros a alcoholes y compuestos aromáticos

Con base en Marco *et al.* (2004), al medio base descrito por Núñez-Cardona *et al.* (2009) se le adicionaron, separadamente, compuestos aromáticos (xileno y tolueno), alcoholes primarios (metanol, etanol y 1-butanol) y un alcohol secundario (2-propanol) a concentraciones de: 5, 10, 15, 20, 30, 40 ml por litro de medio base. Para inocular los medios de cultivo, las bacterias se hicieron crecer en caldo nutritivo y se incubaron durante 30 minutos; pasado este tiempo, con un asa de punta plana, se sembraron en los medios de cultivo con los sustratos e incubaron a 28 °C durante 72 horas. Para hacer las lecturas se utilizó como blanco medio base sin alguna fuente de carbono. Se consideró como respuesta positiva cuando la biomasa bacteriana fue mayor en los medios de cultivo con los compuestos de interés que en el blanco.

Identificación molecular de los aislados de Mixtequilla

El análisis molecular se realizó con base en lo propuesto por Garibay-Origel (2005), para ello se extrajo el ADN total mediante la técnica del fenol-cloroformo, se amplificó por PCR un fragmento del gen 16S ADN_r de 1371 pb, utilizando iniciadores universales para bacterias FBac 5'ATCCTGGCTCAATTGA3'(forward) y CGO605R.3' CCGTGAATACG-TTCCCGGG 5' (reverse) (Invitrogen N° catálogo: 11615-010).

Las reacciones se colocaron en un termociclador a 25 ciclos; las bandas resultantes de la PCR conformadas por 1371 pb fueron observadas en un gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio, con la ayuda de un marcador lambda (λ BstE II).

Los productos de la PCR se purificaron con acetato de sodio (CH₃COONa 3M y pH 5.3); 200 μ L de etanol absoluto, 250 μ L de etanol al 70% y se amplificó un fragmento de 465 pb para una posterior secuenciación;

se utilizaron iniciadores universales: CGO *forward* 465 5'CTCCTACGG-GAGGCAGCAG3' y CGO *reverse* 465 3'CAGGATTAGATACCCTGG-TAG5', las reacciones se depuraron y precipitaron con 5 μ L de EDTA 125 mM, pH 8 y 60 μ L de etanol absoluto (CH₃-CH₂-OH), finalmente se secuenciaron en la Unidad de Ácidos Nucleicos del Cinvestav-Zacatenco.

Para abrir las secuencias (*forward* y *reverse*) se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, donde fueron copiadas y enviadas al programa Vector NTI versión 6.0. Para alinear las secuencias (*forward* y *reverse*) se crearon en molécula nueva, se depuraron y sometieron a la base de datos del Genbank del programa NCBI BLAST, en las que se localizaron especies y géneros bacterianos diferentes. Finalmente, todas las secuencias fueron localizadas en el BLAST, se alinearon con el programa Vector NTI versión 6.0 y se enviaron al programa MEGA 4; se elaboró el árbol filogenético eligiendo la opción bootstrap, en la cual se utilizó el método Neighbor-joining (UPGMA), ahí se seleccionó la opción de 500 réplicas para encontrar el árbol más parsimonioso (mejor árbol de un promedio de 500 réplicas).

Características fenotípicas de los aislados bacterianos

Para conocer las características fenotípicas de los cultivos bacterianos se aplicaron pruebas bioquímicas convencionales como: utilización de sustratos como únicas fuentes de carbono y energía carbohidratos (glucosa, lactosa, manitol, manosa, sacarosa, maltosa y fructosa y al citrato de Simmons); producción de lisina descarboxilasa, indol y sulfhídrico (los dos últimos en SIM), la reducción de nitratos y nitritos, la óxido-fermentación de la glucosa y la producción de enzimas extracelulares (ADNasa, gelatinasa, esculinasa, ureasa, lipasa y amilasa). Se utilizó medio de cultivo base para conocer su tolerancia al cloruro de sodio (NaCl al 5, 10 y 15 g/L de NaCl), todo ello de acuerdo con lo descrito por Carballo-Cruz (1985).

RESULTADOS

En los dos puntos de muestreo, El Llanete (localizado a 18° 32.507' N y 95° 57.200' O) y Don Rufino (localizado a 18° 32.623' N y 95°56.554' O), la temperatura del agua fue de 21 y 24 °C, respectivamente; en ambos puntos el pH fue de 7 y se observaron diferencias mínimas en su salinidad así, en el potrero Don Rufino fue de 0.7 y en El Llanete de 0.2 ppm.

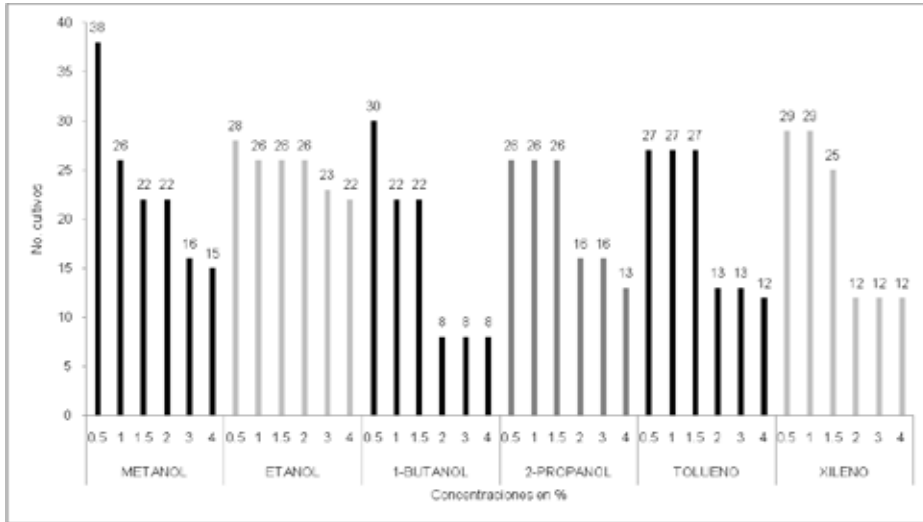
A partir del medio a base con metanol, se aislaron 68 colonias, de las cuales sólo 38 fueron viables y conservadas como cultivos puros; las observaciones al microscopio revelaron que 22 de ellos presentaron formas bacilares, 11 de cocos y cinco de cocobacilos; 34 de ellos mostraron respuesta negativa a la tinción de Gram.

Los 38 cultivos puros fueron expuestos a compuestos aromáticos y alcoholes (Figura 1); como puede observarse, el crecimiento de las bacterias metiltróficas en éstos fue similar a concentraciones de 0.5-1.5%; es evidente que en etanol crecieron bien aún al 4 por ciento.

El número de cultivos que crecieron entre 0.5-1.5% de etanol, 2-propanol, tolueno y xileno fue bueno, y en butanol el mayor número de cultivos fue favorecido sólo al 0.5 por ciento.

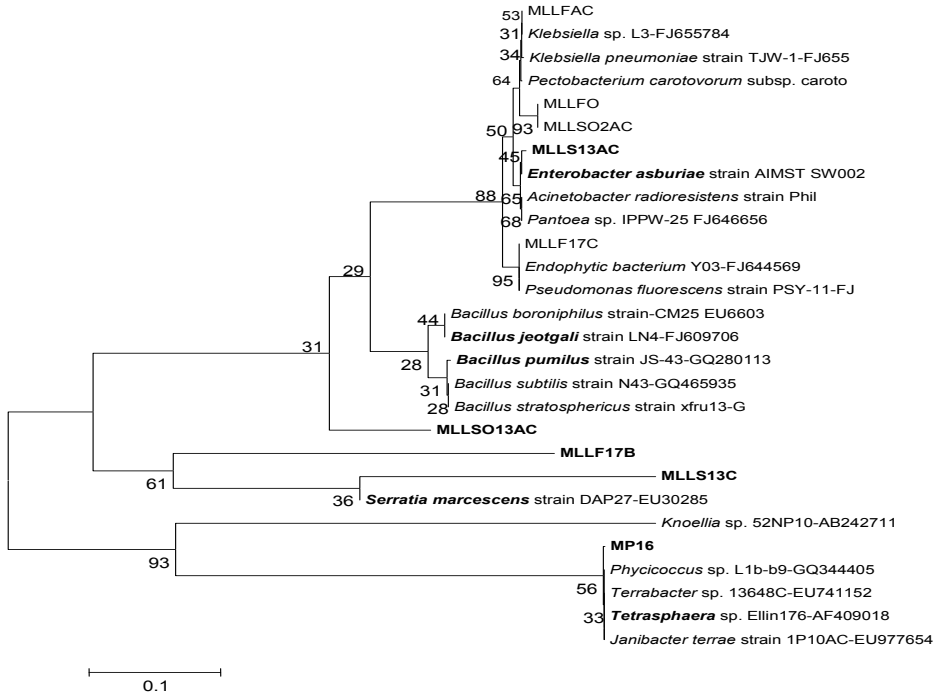
En general, el número de bacterias metiltróficas que crecen en los compuestos aromáticos y alcoholes sigue un patrón definido, esto se debe a que cuando aumenta su concentración en el medio de cultivo, disminuye el número de bacterias que los toleran, aunque es importante señalar que en etanol se observó el mayor número de cultivos bacterianos crecidos, independientemente del sustrato y su concentración.

Figura 1. Número de cultivos de bacterias metiltróficas que crecieron en los alcoholes y compuestos aromáticos



De los 38 cultivos del humedal La Mixtequilla, sólo nueve fueron identificados a través del análisis de su 16S ADN_r; a partir de éste se obtuvo el árbol filogenético que se presenta en la figura 2, mismo que fue construido con 28 secuencias; nueve corresponden al gen de 16S ADN_r de los cultivos del humedal La Mixtequilla, y 19 son secuencias parciales del gen 16S ARN_r, de las especies y géneros localizados en el BLAST del NCBI, de un fragmento de 310 pb. Para la obtención de este árbol se utilizó el método Neighbour-joining, los valores en cada nodo son representados en porcentajes y corresponden al promedio de 500 réplicas, lo cual significa que es el árbol con parsimonia de máxima probabilidad (el mejor árbol). Con base en lo anterior, las bacterias metiltróficas aisladas de los dos potreros se relacionaron con *Tetrasphaera* sp., *Bacillus pumilus*, *Bacillus jeogali*, *Enterobacter asburiae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* y con una bacteria no cultivable.

Figura 2. Árbol filogenético que muestra la relación de las bacterias metiltróficas aislados del humedal Mixtequilla con especies de la base de datos del Gene Bank



En la tabla 1 se presenta la lista de nueve cultivos identificados genéticamente y las especies con las que se relacionaron. La tabla 3 contiene las características fenotípicas de las bacterias metiltróficas y su respuesta a concentraciones diferentes de alcoholes y compuestos aromáticos.

Tabla 1. Características morfológicas de las bacterias metiltróficas aisladas del humedal de Mixtequilla, y su relación con especies de la base de datos del GenBank

Aislado y clave de acceso	Especie. Cepa	Forma celular y Gram	Familia y Phylum	% de máxima identidad
MP16 (ACB05F y ACB06R)		Cocos (-)		98
AF409018.1	<i>Tetrasphaera</i> sp. Ellin176	Cocos (+/-)	Intrasporangiaceae Actinomycetes	98
MLLFO (ACB 09F y ACB 10R)		Bacilos (-)		97
GU594298	<i>Klebsiella pneumoniae</i> B16	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae γ-Proteobacteria	97
MLLFAC (ACB 11F y ACB12R)		Bacilos (-)		99
FJ655996	<i>Klebsiella pneumoniae</i> TJW1	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae γ-Proteobacteria	99
MLLSO13AC (ACB13F y ACB14R)		Bacilos (+)		99
G0280113	<i>Bacillus pumilus</i> JS-43	Bacilos (+)	Bacillaceae Firmicute	99
MLLF17B (ACB17F y ACB18)		Bacilos (-)		94
FJ609706	<i>Bacillus jeotgali</i> LN4	Bacilos (-/+)	Bacillaceae Firmicute	94
MLLS13AC (ACB21F y ACB22R)		Bacilos (-)		97
GQ420687	<i>Enterobacter asburiae</i> AIMSTSW002	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae γ-Proteobacteria	97
MLLF17C (ACB23F y ACB24R)		Bacilos (-)		99
GU220796	<i>Serratia marcescens</i> CI	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae γ-Proteobacteria	99
MLLS13C (ACB 25F y ACB26R)		Bacilos (-)		99
EU302852.1	<i>Serratia marcescens</i> DAP-27	Bacilos (-)	Enterobacteriaceae γ-Proteobacteria	99
MLLSO2AC (ACB33F y ACB34R)	Bacteria no cultivable	Cocos (-)	No clasificada	93

Tabla 2. Características fenotípicas de las bacterias metiltróficas aisladas del humedal La Mixtequilla, y de las especies localizadas en el BLAST

Prueba	1	Tp	4	Bp	5	Bj	6	Ea	8	Sm
Movilidad	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
Gelatinasa	-		+	+	+	+	-		-	
Esculinasa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
Ureasa	+		+	+	+		+	+	+	
Glucosa	-		+	+	+	+	+		+	+
Lactosa	+		+		-	-	+	+	-	-
Manitol	-		+	+	+	-	+	+	+	
Manosa	-	-	+		-	-	+		+	+
Sacarosa	-		+	+	-	-	+		+	
Maltosa	-	-	+		-		+	+	+	
Fructosa	-	-	+		+	+	+		+	
Nitratos	+	+	-	-	-	+	-		+	+
Nitritos	-	+	-		-		-	+	+	+
Lisina	+		-	+	+		-	-	-	-
0.5% NaCl	-		-		+		-			
1.0% NaCl	-		+		+		+			
1.5% NaCl	-		+		+		-			
0.5% Metanol	+		+		-		-			
1.0% Metanol	+		-		-		+			
0.5% Etanol	+		-		+		+			
1.0% Etanol	+		-		+		+			
1.5% Etanol	+		-		-		+			
0.5% 1-butanol	-		+		-		+			
1.0% 1-butanol	-		-		-		+			
1.5% 1-butanol	-		-		+		+			
2.0% 1-butanol	-		-		+		+			
3.0% 1-butanol	-		-		-		+			
4.0% 1-butanol	-		-		-		+			
0.5% 2-propanol	+		-		-		+			
1.0% 2-propanol	+		-		+		+			
1.5% 2-propanol	+		-		+		+			
2.0% 2-propanol	-		+		-		-			
3.0% 2-propanol	-		+		-		+			
4.0% 2-propanol	-		+		-		-			
0.5% Tolueno	+		-		+		+			
1.0% Tolueno	+		+		+		+			
1.5% Tolueno	+		+		-		+			
4.0% Tolueno	-		-		+		-			
0.5% Xileno	+		-		+		+			
1.0% Xileno	+		-		+		+			
1.5% Xileno	+		-		-		+			
4.0% Xileno	-		-		+		-			

Tp=*Tetrasphaera* sp. (Maszenan *et al.*, 2000), Bp=*Bacillus pumilus* (Reva *et al.*, 2002), Bj=*Bacillus jeotgali* (Ten *et al.*, 2007; Jung-Hoon *et al.*, 2001; Yamamura *et al.*, 2007), Ea=*Enterobacter asburiae* (Brenner *et al.*, 1986), Sm=*Serratia marcescens* (Rajasekar *et al.*, 2007), .1=MP16, 4=MLLSO13AC, 5=MLLF17B, 6=MLLS13AC y 8=MLLS13C. Espacio vacío=no disponible y en el caso del cultivo 8, los espacios en blanco indican que no se aplicó la prueba.

DISCUSIÓN

Las variables ambientales registradas en la zona de estudio son parecidas a las que reportan Rivera-Becerril *et al.* (2008). Se sabe que las bacterias que habitan en los humedales están adaptadas a la desecación debido a que en estos sistemas se dan variaciones de temperatura y en los niveles de agua, por lo que en ocasiones se da la pérdida total de ésta.

En los humedales, el metanol y otros compuestos con un carbono son productos del metabolismo de las plantas; los metiltrofos, al utilizarlos como fuente de carbono y / o energía, son habitats típicos de la filósfera de las plantas y la rizósfera, donde compiten eficientemente con otros microorganismos que son inhibidos por alcoholes.

Aquí las bacterias aerobias dependen del transporte intenso y la producción de oxígeno de las raíces, así como de la capacidad de transporte de oxígeno de las macrófitas. En estos casos, las bacterias no sólo colonizan a las plantas, sino que están relacionadas simbióticamente con ellas (Trotsenko *et al.*, 2001), esto último depende de la habilidad de las bacterias metiltróficas para fijar nitrógeno, se sabe, además, que poseen propiedades antibacterianas, producen hormonas como las citoquinonas (intervienen en la división celular de las plantas), inducen la germinación de semillas, y, entre otras cosas, les dan resistencia contra factores adversos (temperatura, infecciones virales, daño mecánico y contaminantes químicos). Este es el caso de *Bacillus pumilus*, que promueve el crecimiento de plantas, la elongación de raíces, y otras cosas más; produce antibióticos que protegen a las plantas (Reva *et al.*, 2002); también acumula metales pesados y es muy resistente a la desecación, así como a la luz ultravioleta, por lo que tolera sequías y el aumento de temperatura (Núñez-Cardona *et al.*, 2008). Con esta especie fue relacionada el cultivo MLLSO13AC aislado del potrero El Llanete y, que a pesar de que toleró concentraciones bajas de metanol, butanol (0.5%, ambas) y tolueno (1 y 1.5%), por los antecedentes de la especie con la que está relacionada, este cultivo podría considerarse benéfico para el ambiente, y en especial para la agricultura.

Como muestran los resultados, además del metanol las bacterias metiltróficas aisladas de Mixtequilla utilizan bien, como fuentes de carbono y energía, al etanol, 1-butanol y 2-propanol, los cuales, de acuerdo con Shen y Liao (2008), son producto de la degradación anaerobia de carbohidratos por *E. coli* y *Clostridium*, pero que, cuando son producidos y comercializados (Ej. etanol y propanol), contaminan el suelo y agua (Pinto *et al.*, 2010), de esta forma, los microorganismos metiltróficos, aprovechándolos como fuentes de carbono, resultan ser útiles para la biorremediación de ambientes impactados por estos compuestos.

En butanol (0.2%) se han aislado bacterias pertenecientes a *Enterobacter* (Pinto *et al.*, 2010), género al que pertenece el cultivo MP16 (relacionado con *E. asburiae*), el cual, de los cinco cultivos identificados genéticamente, creció en casi todos los compuestos aromáticos y alcoholes ensayados, además, mostró una gran actividad metabólica sobre los carbohidratos. Probablemente, gracias esta versatilidad metabólica, es común encontrar a *E. asburiae* en cualquier tipo de ambiente, también ha sido aislada de orina, vías respiratorias y exudados de humanos (Brenner *et al.*, 1986).

En las raíces de *Juncus effusus*, que es común en los humedales, se han encontrado bacterias que producen ácido indol acético (AIA) y la familia Enterobacteriaceae está bien representada dentro de las bacterias asociadas a esta macrófita (Halda-Alija, 2003). Los miembros de esta familia como *Enterobacter asburiae* y *Klebsiella pneumoniae* llegan a los humedales a través las actividades agropecuarias, sus habitantes y visitantes, ambas pasan a los humanos a través de los alimentos; recientemente han sido consideradas como responsables de infecciones nosocomiales, en especial, *K. pneumoniae* ha ocupado el lugar ocho entre los agentes patógenos causantes de meningitis en humanos y, al igual que *E. asburiae*, ha sido aislada de sedimentos y la rizósfera de plantas en diversos humedales (Halda-Alija, 2004).

K. pneumoniae es una de las especies bacterianas patógenas aisladas de la rata de agua que habita en los humedales Vembanadu-Kol, los

cuales, como el humedal La Mixtequilla, son utilizados para actividades agropecuarias; de acuerdo con Thomas *et al.* (2012), el contacto inevitable de la rata con el agua, y la presencia de *K. pneumoniae* en ésta, es algo que debe tomarse en cuenta.

El 2-propanol y el etanol también alcanzan los ambientes naturales gracias a las actividades humanas, ya que son utilizados como aditivos en la gasolina y son degradados en el suelo y agua por actividades microbianas; se sabe que el butanol es biodegradado en suelos agrícolas (Pinto *et al.*, 2010). Se ha reportado que la degradación bacteriana del 2-propanol (alcohol secundario) pasa al ciclo de Krebs (Steffan *et al.*, 1997) y el etanol a acetil-CoA (Ranganathan y Maranas, 2010).

El xileno y tolueno son dos de los compuestos que conforman los llamados BTEX (benceno, tolueno, ethylbenceno y xileno), los cuales se producen en el suelo y agua, causando daños considerables al ambiente; debido a que son solubles en agua, tienen efectos genotóxicos, sin embargo, en condiciones favorables pueden ser degradados por numerosos microorganismos (Morlett-Chávez *et al.*, 2010). Como puede observarse en la figura 1, tanto el xileno como el tolueno fueron utilizados como fuente de carbono y energía por un amplio rango de bacterias aisladas de La Mixtequilla, en especial a concentraciones de entre 0.5-1.5%, y por los cultivos MP16 (*Tetrasphaera* sp.), MLLF17B (*Bacillus jeotgali*) y MLLS13AC (*Enterobacter asburiae*).

Ambos, el xileno y tolueno, están presentes en el petróleo crudo y la gasolina; su degradación, junto con la del benceno, realizada por actividades bacterianas generan bencil-alcoholes, los cuales a su vez son transformados a ácidos benzoicos, y éstos a catecoles, para finalmente entrar al ciclo de los ácidos tricarbónicos (Jang-Young *et al.*, 1995) como formas no tóxicas para los organismos vivos (Tsao *et al.*, 1998).

Como ha podido observarse, en los humedales habitan bacterias responsables de la degradación de compuestos tóxicos como los ensayados en el presente estudio, indudablemente los beneficios que proporcionan estos sistemas dependen en gran medida de su microbiota.

CONCLUSIONES

Mediante el uso de medio de cultivo con metanol se aislaron bacterias metiltróficas, su actividad sobre los alcoholes y compuestos aromáticos disminuyó a medida que aumentó la concentración de éstos.

El etanol fue el compuesto donde creció el mayor número de bacterias metilotróficas en todas las concentraciones ensayadas.

Las bacterias metilotróficas aisladas del humedal Mixtequilla fueron identificadas como *Tetrasphaera* sp., *Bacillus pumilus*, *B. jeotgali*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*, las tres últimas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Elizabeth Santamaría Hernández, a la Bióloga Magdalena Chávez Hernández y al Biólogo Diego Ramos Herrera, por su apoyo técnico. A la Universidad Autónoma Metropolitana y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU/becario 241887/2225186) por las becas otorgadas durante el primer y segundo año del posgrado, respectivamente. A la M. en C. María Guadalupe Aguilar González, del Cinvestav-Zacatenco, quien realizó la secuenciación del ADN de los cultivos trabajados en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Bellion, E. y Wu, G. T. S., 1978, "Alcohol dehydrogenases from a facultative methylotrophic bacterium", en *Journal of Bacteriology* 135(1): 251-258.
- Brenner, J. et al., 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.", en *Journal of Clinical Microbiology* 23(6): 1114-1120.
- Carballo, R., 1985, *Caracterización de bacterias heterótrofas en los aportes de la laguna de Términos a la sonda de Campeche*, Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Química, UNAM, México.
- Garibay, C., 2005, *Caracterización bioquímica y microbiológica de un reactor de lecho fluidizado que trata compuestos fenólicos clorados*, Tesis de Doctorado en biotecnología, Cinvestav-Zacatenco, México.
- Goodwin, M. y Anthony, C., 1995, "The biosynthesis of periplasmic electron transport proteins in methylotrophic bacteria", en *Microbiology* 141(5): 1051-1064.
- Halda, L., 2003, "Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L." en *Canadian Journal of Microbiology* 49(12): 781-787.
- Halda, L., 2004, "Incidence of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* species in freshwater wetlands", en *Letters in Applied Microbiology* 39: 445-450.
- Jang, L. et al., 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", en *Applied and Environmental Microbiology* 61(6): 2211-2217.
- Jung, Y. et al., 2001, "*Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood", en *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(3): 1087-1092.
- Kolb, S., 2009, "Aerobic methanol-oxidizing bacteria in soil", en *FEMS Microbiology Letters* 300(1): 1-10.
- Madhaiyan, M. et al., 2007, "Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L)", en *Chemosphere* 69(2): 220-228.
- Marco, D. et al., 2004, "Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. FEMS", en *Microbiology Letters* 234(1): 75-80.

- Maszenan, M. *et al.*, 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.", en *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(2): 593-603.
- Morlett, J. *et al.*, 2010, "Kinetics of BTEX biodegradation by a Microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it", en *International Biodeterioration & Biodegradation* 64(7): 581-587.
- Núñez, M. *et al.*, 2008, Caracterización de una comunidad bacteriana de un humedal de la Mixtequilla por su huella genómica 16S rDNA., V Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia, 21-23 de mayo de 2008, León, Guanajuato.
- Núñez, M. *et al.*, 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.
- Peinador, V. *et al.*, 1999, "Intoxicación mortal por metanol", en *Emergencias* 11(4): 315-319.
- Pinto, A. *et al.*, 2010, "Aerobic biodegradation of butanol and diesel oil blends", en *African Journal of Biotechnology* 9(42): 7094-7101.
- Rajasekar, A. *et al.*, 2007, "Role of *Serratia marcescens* ACE2 on diesel degradation and its influence on corrosion", en *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34(9): 589-598.
- Radajewski, S. *et al.*, 2002, "Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing", en *Microbiology* 148(8): 2331-2342.
- Ranganathan, S. y Maranas, D., 2010, "Microbial 1-butanol production: identification of non-native production routes and in silico engineering Interventions", en *Biotechnology Journal* 5(7): 716-725.
- Reva, N. *et al.*, 2002, "*Bacillus endophyticus* sp. nov. isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.)", en *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(1): 101-107.

- Rivera, F. *et al.*, 2008, "Algunos aspectos ambientales y biológicos de dos potreros inundables de la Mixtequilla", en *ContactoS* 70: 31-39.
- Shen, R. y Liao, C., 2008, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways", en *Metabolic Engineering* 10(6): 312-320.
- Signoret, M. *et al.*, 2005, "Producción de pulpa de reculillas 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 del Río, Veracruz, México.
- Steffan, J. *et al.*, 1997, "Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether, and tert-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria", en *Applied and Environmental Microbiology* 63(11): 4216-4222.
- Ten, N. *et al.*, 2007, "*Bacillus pocheonensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic bacterium isolated from soil of a ginseng field", en *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(11): 2532-2537.
- Thomas, M. *et al.*, 2012, "Rattus norvegicus Berkenhout and aonoses: A preliminary study from Vembanadu wetlands", en *Journal of Pure and Applied Microbiology* 6(1): 417-421.
- Torres, M. *et al.*, 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", en *Hidrobiologica* 16(2): 183-196.
- Trotsenko, A. *et al.*, 2001, "Aerobic Metylotrophic Bacteria as Phytosymbionts", en *Microbiology* 70(2): 623-632.
- Tsao, W. *et al.*, 1998, "Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil", en *Applied and Environmental Microbiology* 64(12): 4924-4929.
- Yamamura, S. *et al.*, 2007, "*Bacillus selenatarsenatis* sp. nov., a selenate-and arsenate-reducing bacterium isolated from the effluent drain of a glass-manufacturing plant.", en *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(5): 1060-1064.