



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METANOTROFOS
A PARTIR DE AGUA ESTANCADA EN EL SECTOR DE NANEGAL”**

Realizado por:

Juan Martín Vásquez Vaca

Director de proyecto:

Lino Arisqueta Herranz, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 10 Abril de 2023

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, VASCONEZ VACA JUAN MARTIN, con cédula de identidad # 1720663812, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Vasquez', with a large, sweeping flourish underneath.**FIRMA**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
METANOTROFOS A PARTIR DE AGUA ESTANCADA EN EL SECTOR DE
NANEGAL”**

Realizado por:

JUAN MARTIN VÁSCONEZ VACA

Como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Ha sido dirigido por el profesor

PhD. Lino Arisqueta Herranz

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lino Arisqueta', is centered on the page.

FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

SUSANA ELIZABETH CHAMORRO ARIAS

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

DEDICATORIA

“Un guerrero no renuncia a lo que ama, encuentra el amor en lo que hace; un guerrero no busca la perfección, la victoria ni ser invulnerable, busca ser absolutamente vulnerable, ese es el auténtico coraje”

Agradezco a Dios por ser mi guía y cuidar a las personas que más amo.

A mis padres por su apoyo y sus lecciones de vida, a mis hermanos por sus ideas y risas,
a mis amigos del laboratorio por su paciencia y consejos.

A mi pareja, Elizabeth, por enseñarme a nunca rendirme y dar un paso adelante sin
mirar atrás.

Artículo de tesis

Aislamiento, identificación y caracterización de Metanotrofos a partir de zonas estancadas en el Sector de Nanegal

Martín Vásconez Vaca¹, Lino Arisqueta Herranz²

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas; jvasconez.amb@uisek.edu.ec

² Universidad Internacional SEK; Facultad de Ciencias de la Salud; lino.arisqueta@uisek.edu.ec

Resumen: (1) Los metanotrofos y las bacterias oxidadoras de hidrocarburos son organismos únicos del filo Proteobacteria capaces de emplear metano e hidrocarburos de distintos ambientes como fuente de carbono y energía. Estas cumplen un rol importante en la recirculación global de carbono; (2) Se recolectaron muestras de agua suelo y heces de 3 puntos distintos (Nanegal, Pomasqui y Quito) las cuales fueron incubadas en medio AMS y NMS modificado con metanol como fuente de carbono hasta la obtención de aislados puros. Se caracterizó morfológicamente cada aislado mediante tinción Gram, así como su capacidad de usar citrato. Posteriormente, se extrajo DNA de cada aislado obtenido (9 en total) para su identificación por secuenciación Sanger y se determinó si estos pueden degradar y tolerar tanto xileno como tolueno; (3) Los aislados fueron identificados como *Serratia liquefaciens*, *Rhanella, aqualitis*, *E. coli* (cepas D6, AAK y NF36) y *Acinetobacter iwoffii* S14 con identidades mayores al 99% y coberturas mayores al 96%. Se detectaron 2 cepas problema que requieren identificación posterior (*Sinployea atiensis* y *Paludibacterium denitrificans*). Las cepas respondieron a la tinción como Gram (-), de los cuales *R. aqualitis*, *E.coli NF36*, *A. iwoffii* como la cepas problema mostraron crecimiento en presencia de xileno o tolueno ; (4) Se aislaron bacterias oxidadoras de hidrocarburos, indicando que el uso de metanol como sustituto de metano no permitió el aislamiento de metanotrofos, pero permitió aislar bacterias oxidadoras de hidrocarburos tanto de suelo como heces y agua.

Palabras clave: Metanol, hidrocarburos, xileno, tolueno, Proteobacteria.

Abstract: (1) Methanotrophs and hydrocarbon oxidizing bacteria are unique organisms of the phylum Proteobacteria capable of employing methane and hydrocarbons from different environments as a source of carbon and energy. These play an important role in global carbon recirculation; (2) Soil, water and feces samples were collected from 3 different points (Nanegal, Pomasqui and Quito) which were incubated in methanol-modified AMS and NMS medium as a carbon source until pure isolates were obtained. Each isolate was morphologically characterized by Gram staining, as well as its ability to use citrate. Subsequently, DNA was extracted from each isolate obtained (9 in total) for identification by Sanger sequencing. The ability of each isolate to degrade and tolerate both xylene and toluene was tested. (3) The isolates were identified as *Serratia liquefaciens*, *Rhanella, aqualitis*, *E. coli* (strains D6, AAK and NF36) and *Acinetobacter iwoffii* S14 with identities greater than 99% and coverages greater than 96%. 2 problem strains that need further identification were detected (*Sinployea atiensis* and *Paludibacterium denitrificans*). The strains responded to the staining as Gram (-), of which *R. aqualitis*, *E.coli NF36* and *A. iwoffii* showed growth in the presence of xylene or toluene ; (4) Hydrocarbon oxidizing bacteria were isolated, indicating that the use of methanol as a methane substitute did not allow the isolation of methanotrophs, but allowed the isolation of hydrocarbon oxidizing bacteria from soil, feces and water.

Keywords: Methanol, hydrocarbons, xylene, toluene, Proteobacteria.

1. Introducción

Bacterias que emplean compuestos C1

El superfilo Proteobacteria comprende una de las divisiones más largas de los organismos procariotas, no solo por el hecho de albergar organismos de interés sanitario como es el caso de las enterobacterias (*E.coli*, *R. aqualitis*), sino que además, incluye a aquellos ejemplares capaces de desarrollarse en ambientes extremos, como es el caso de las bacterias fotosintéticas púrpuras y verdes del azufre, las cuales son comúnmente encontradas en fuentes hidrotermales, lagos alcalinos y sumideros, donde las concentraciones de nitratos, carbonatos y metano (CH_4) sean elevadas y con flujos constantes (Madigan; Martinko; Stahl; Clark, 2012). Todos los organismos pertenecientes a Proteobacteria son Gram negativos, presentando una morfología celular variada (Gupta, 2000).

Dentro de este superfilo, existen organismos capaces de emplear compuestos monocarbonados como única fuente de carbono para su crecimiento celular, entre las cuales se encuentran las bacterias fotosintéticas, que emplean la forma más oxidada del carbono (CO_2) para la síntesis de materia orgánica. Existen organismos termofílicos capaces de asimilar CO y H_2 , las bacterias del hidrógeno, siendo estas Gram positivas. Por último, tenemos las bacterias metilótrofas, que oxidan CH_4 o metanol para su crecimiento (Hanson & Hanson, 1996; Madigan; Martinko; Stahl; Clark, 2012). En la presente investigación, se estudiará más detalladamente a este último grupo.

Ciclo del carbono y metanotrofia

Dentro del ciclo global de recirculación del carbono, el metano (CH_4) es un intermediario importante ya que limita el flujo de carbono entre ambientes óxicos y anóxicos (**figura 1**). Éste es generado por comunidades microbianas en un proceso denominado metanogénesis, y oxidado por arqueas, bacterias reductoras de sulfato, y metanótrofos (grupo de interés del trabajo) que emplean metano como donador de electrones. Adicionalmente, el ciclo oceánico del metano aporta emisiones llevadas a cabo por procesos geológicos y biogeoquímicos (fuentes hidrotermales, emanaciones frías, actividades volcánicas) contribuyendo a la emisión de este gas a la atmósfera por medio de las columnas de agua (Inostroza et al., 2011).

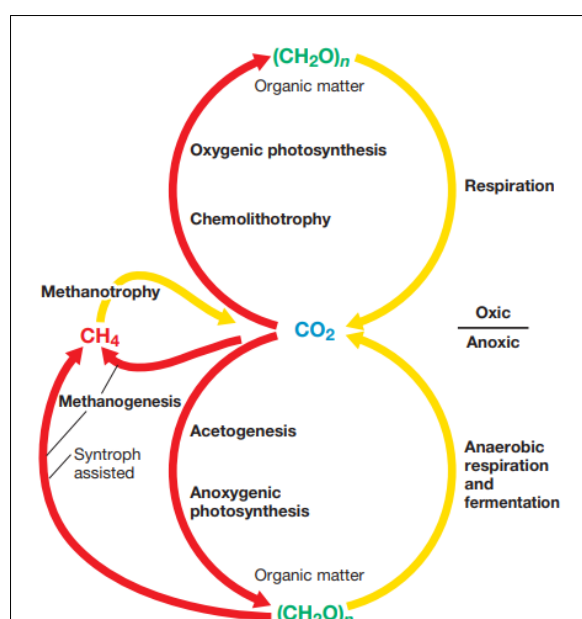


Figura 1. Ciclo redox del carbono donde resaltan procesos tanto autótrofos (fijación de CO_2) como heterótrofos (generación de biomasa).

Obtenida de: 13^{va} edición

El carbono en forma de CO₂ es fijado por las bacterias fotótrofas, cianobacterias y plantas produciendo biomasa, la cual será empleada en la respiración como fuente de carbono y electrones por los organismos heterótrofos en la fase óxica del ciclo, como se muestra en la figura 1. Esta biomasa es oxidada nuevamente a CO₂ en la fase anóxica por medio de fermentadores secundarios generando metabolitos y subproductos de la fermentación. El metano es producido en la fase anóxica directamente a partir de CO₂, o por medio de bacterias sintróficas.

Sumado a lo anterior, fuentes como humedales naturales, arrozales, cría de animales, quema de biomasa, carbón del permafrost y fuentes fósiles contribuyen a la concentración de metano en la atmósfera (Meruvu et al., 2020). De acuerdo con la ONU, el 32% de las emisiones anuales de metano son de fuentes antropogénicas, concretamente de origen bovino y ganadero, las cuales provienen del estiércol y la fermentación entérica por la microbiota de los rumiantes (ONU, 2022). Según las estadísticas de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, se estima que estas emisiones son de aproximadamente 55 kg CH₄ /año por animal en países en vías de desarrollo (Mogollón, 2020). El metano es un potente gas de efecto invernadero que posee un poder 60 veces más fuerte que el CO₂ para calentar la tierra en un periodo más corto (Shindell et al., 2009). En los recientes años la demanda de productos cárnicos dentro de la población ha acarreado un aumento significativo de las emisiones de gases de efecto invernadero, como lo es el metano (Mogollón, 2020). Se han estudiado y aplicado distintas alternativas para menguar esta problemática, entre las cuales se encuentra el uso de los metanotrofos para este fin. En el Ecuador existen estudios referentes al tratamiento de agua y suelo con fines de biorremediación empleando comunidades bacterianas, pero no se ha visto el uso de alguna cepa metanotrofa.

Bacterias metanotrofas

Como se ha mencionado, en la última década se han estudiado e implementado diferentes estrategias para mitigar o en el mejor de los casos reducir la concentración de CH₄ en la atmósfera. Una de ellas es el uso de bacterias especializadas en la oxidación de este compuesto, por lo que el uso de comunidades metanotrofas es hasta la fecha una alternativa llamativa (M. Kwon et al., 2019). Las bacterias metanotrofas o MOB (*Methane Oxidizing Bacteria* por sus siglas en inglés) son un subgrupo de los organismos metilótrofos, microorganismos capaces de emplear compuestos de un solo átomo de carbono (CH₄, CH₃OH, HCOO, CH₃NH₂, entre otros) como única fuente de carbono y energía. Como se expuso, pertenecen al filo Proteobacteria, son Gram negativos, móviles, aerobios, en forma de cocos o bacilos agrupados en *clusters* o eslabones y presentan tamaños de 3-5 μm (Hanson & Hanson, 1996; Hur et al., 2017). Históricamente, el primer metanotrofo fue aislado en 1906 por el microbiólogo alemán Söhngen en sus estudios acerca de la recirculación del carbono (Söhngen, 1906), pero no fue hasta 90 años después que Hanson y col. recopilaron toda información referente a estos organismos (Hanson & Hanson, 1996).

Asimilación de metano y clasificación de bacterias metanotrofas

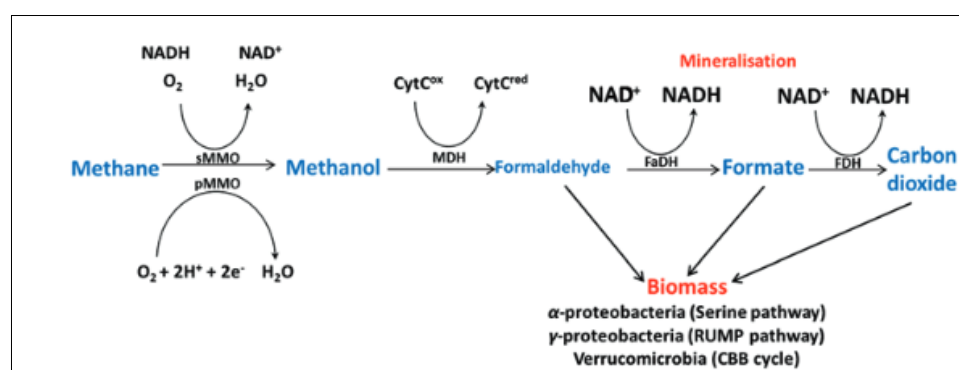


Figura 2. Principales reacciones involucradas en la asimilación de formaldehído en biomasa celular y oxidación de CH₄ a CO₂. (pMMO) metano monooxigenasa particulada; (sMMO) metano monooxigenasa soluble; (MDH) metanol deshidrogenasa; (FaDH) formaldehído deshidrogenasa; (FDH) formiato deshidrogenasa. Obtenido de: (Boudh et al., 2017)

La oxidación de CH₄ a CO₂ ocurre en 4 reacciones. El primer paso para la oxidación de CH₄ es llevado a cabo por la metano monooxigenasa (MMO) presente en dos formas, una unida a la membrana (pMMO) y otra soluble en el citoplasma (sMMO) (Hanson & Hanson, 1996). Estas enzimas emplean dos equivalentes O-O para hidroxilar la molécula de metano, generando metanol (figura 2). Luego, este metanol es oxidado a formaldehído por la metanol deshidrogenasa (MDH) que es una alcohol deshidrogenasa clásica dependiente de PQQ (pirroloquinonina quinona,

como donador de electrones) y del ion Ca^{2+} (Culpepper & Rosenzweig, 2014; Lau et al., 2013). Adicionalmente, existen organismos que poseen la MDH para la oxidación de metanol, los cuales son sintróficos con los metanotrofos (*Pseudomonas veronii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, entre otras más) al emplearlo como fuente de carbono y son conocidas como bacterias oxidadoras de metanol (Tshikhudo et al., 2023).

El formaldehído es a su vez oxidado a formiato por la formaldehído deshidrogenasa (FaDH), y finalmente el formiato es oxidado a CO_2 por la formiato deshidrogenasa (FDH), usando una molécula de NAD^+ como aceptor terminal de electrones, como se indica en la figura (Park & Kim, 2019; Taylor, 1993).

La manera de asimilar el carbono (mineralización) en el material celular permite clasificar a las bacterias metanotrofas. Aquellas cepas que asimilan el carbono usando la ruta Ribulosa monofosfato o RuMP, son los metanotrofos de tipo I (Gammaproteobacteria), mientras que las cepas que emplean la ruta Serina son aquellos de tipo II (Alfaproteobacteria). Las cepas que fijan carbono en forma de CO_2 por medio del Ciclo de Calvin Benson son los metanotrofos de tipo III (anteriormente tipo X).

Métodos de aislamiento de MOB y aplicaciones

La obtención de colonias axénicas es el primer paso para el análisis e identificación de organismos puros, es decir, bacterias de un solo tipo. Para llevar a cabo esta tarea, el uso de medios de crecimiento selectivos es imperativo, ya que de esta manera se limita el crecimiento de organismos competidores de nuestra bacteria de interés (Dedysh & Dunfield, 2011). Existen más de 11 medios de cultivo distintos para el aislamiento de cepas metanotrofas. Los 3 más empleados son: el medio de sales minerales de nitrato o amonio (NMS o AMS), empleados para el aislamiento de metanotrofos neutrofílicos (pH 6.8-7.2) de muestras de agua o suelo; el medio M2 es un medio diseñado para aislar MOB de suelo ácidos (pH ≤ 5); el medio DNMS, es empleado para metanotrofos de lugares medianamente alcalinos, y la lista sigue (Dedysh & Dunfield, 2011; M. Kwon et al., 2019; Meruvu et al., 2020). De igual manera, la inyección de CH_4 como única fuente de carbono aumenta la presión selectiva, limitando el crecimiento de bacterias heterótrofas contaminantes y asegurando comunidades metanotrofas puras (Meruvu et al., 2020). El crecimiento en estos medios suele tardar hasta 12 días, presentando colonias de pigmentación variada: colonias rojas, cafés, amarillas, crema e incoloras (Hanson & Hanson, 1996).

En contraste con los métodos tradicionales de aislamiento e identificación bioquímica, el uso de marcadores moleculares como lo son el 16S rRNA y 16S DNA, así como primers que codifiquen regiones conservadas de genes funcionales, como la pMMO y sMMO han permitido identificar a estos organismos en una gran gama de hábitats: arrozales, lagos, ríos, lodo, sedimentos así como en rellenos sanitarios en distintas partes del mundo (Costello & Lidstrom, 1999; Horz et al., 2001; Hur et al., 2017; Islam et al., 2016; Juan & Verdejo, n.d.; Khmelenina et al., 1997).

El uso de organismos tan especializados y versátiles como lo son los metanotrofos ha ido incrementando ampliamente desde inicios de los 2000, siendo estos microorganismos empleados para biorremediación de aguas y suelos con altas concentraciones de CH_4 (Inostroza et al., 2011; Jiang et al., 2011). Además, pueden degradar de otros hidrocarburos como de compuestos aromáticos (BTX) por medio del co-metabolismo de la sMMO, que oxida una gran variedad de componentes contaminantes (Park & Kim, 2019; Taylor, 1993; Walter et al., 1997). De igual forma, han sido utilizados para la producción de polihidroxibutirato (PHB), un polímero de uso farmacéutico que sirve como reserva de carbono de estas. También, se han cultivado en biorreactores de tamaño industrial para la extracción de carotenoides para su uso alimentario (M. Kwon et al., 2019).

El uso de gas metano para el aislamiento de metanotrofos es lo más común y recomendado, sin embargo, hay que tomar en cuenta que la pureza de metano para este propósito debe ser mayor al 95% (para evitar contaminación con hidrocarburos traza en el ambiente) y debe ser trabajado en un establecimiento apartado del laboratorio para evitar fugas, ya que es tóxico y explosivo, o que éste se mezcle con otros gases, según la AESQ (Agencia Europea de Sustancias Químicas, 2022).

Dedysh y col. explican que se puede emplear metanol como sustituto de metano para aislar estas bacterias, siempre y cuando se mantengan un ambiente axénico entre cultivos. Por ello, la presente investigación tiene como objetivo aislar e identificar bacterias metanotrofas de muestras de agua usando metanol como fuente de carbono en los medios NMS y AMS como alternativa al CH_4 para así establecer un protocolo a escala laboratorio que permita aislar organismos de este tipo y así evaluar su habilidad de degradar contaminantes, como xileno y tolueno.

2. Materiales y Métodos

Área de Estudio:

Se seleccionaron 3 localidades para la colecta de las muestras: la primera, fue la finca “La cinco” ubicada en la parroquia de Nanegal, Palmitopamba (78° 40' 05" y 0° 10' 10" N); la segunda fue en el parque Metropolitano Guanguiltagua ubicado al norte de Quito (0°13'23"S y 78°30'45"O); y la tercera fue en la granja “Tío Mario” ubicada en la Parroquia de Pomasqui, Mitad del Mundo. Las fechas de recolección de las muestras, en las 3 localidades, fueron el 6 de enero, 15 y 18 de mayo de 2022, respectivamente. Cabe mencionar que las áreas de estudio se basan en trabajos similares referentes al aislamiento de bacterias metanotrofas de lugares húmedos, como se indican en los estudios de (Chen et al., 2007; Inostroza et al., 2011; McDonald et al., 2008; Rusmana & Akhdiya, 2009; Wise et al., 1999).

Recolección de las muestras:

Se siguió el mismo procedimiento descrito por (Rusmana & Akhdiya, 2009) e (Inostroza et al., 2011) para la finca ubicada en Palmitopamba. Se recolectó una muestra de un establo habitado por rumiantes que contenía agua estancada. Se usó una jeringa de 50 mL para extraer una muestra de agua a una profundidad de 1 centímetro. Posteriormente la muestra se depositó en un frasco estéril de 50 mL y se almacenó a 5 °C. El agua del establo llevaba estancada 4 meses.

Para las localidades de Quito, se siguieron las recomendaciones de (Wise et al., 1999) y (Chen et al., 2007) para la recolección de muestras sólidas ambientales: en el parque, se recolectaron aproximadamente 15 gramos de suelo húmedo a una profundidad de 3,5 cm, los cuales se depositaron en un frasco estéril y almacenados a 5 °C. En el caso de la muestra de la granja ubicada en Pomasqui, se tomaron alrededor de 50 gramos de heces bovinas. De igual manera éstas fueron almacenadas a 5 °C en frascos estériles. Es importante señalar que previo a la recolección, se midió el pH de los sitios empleando tiras de pH. Las mediciones de pH de la muestra de agua del establo (Palmitopamba), la muestra de suelo del parque metropolitano, y la muestra fecal de la granja fueron de 6.5, 6.8 y 7.2, respectivamente.

Preparación de medios, condiciones de crecimiento y obtención de colonias axénicas

Debido a que las muestras tenían un pH en torno al neutro se escogieron los medios NMS y AMS. Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo con lo descrito por (Dedsyh et al., 2011) y modificados agregando metanol en sustitución de metano (**tabla 1**) como lo indica (De Marco et al., 2004) en su revisión. Para 1L contenía: NaCl, 1 gr; KNO₃, 1 gr (o 0,5 g de NH₄Cl para el medio AMS); MgSO₄*7H₂O, 1 gr ; KH₂PO₄, 0.23 g; CaCl₂*6H₂O, 0.2 g; CH₃OH, 5 mL; solución de FeCl₃ 0,12%, 1 mL; solución de elementos traza (ZnSO₄*7H₂O (0,01 g), MnCl₂*4H₂O (0,003 g), H₃BO₃ (0,003 g), CoCl₂*6H₂O (0,002 g), CuCl₂*2H₂O (0,001 g), NiCl₂*6H₂O (0,002 g), Na₂MoO₄*2H₂O (0,003 g). Mezclar todo en 1000 mL de agua estéril hasta disolver (De Marco et al., 2004; Dedysh & Dunfield, 2011).

Tabla 1. Composición de los medios salinos empleados y condiciones de crecimiento para el aislamiento de bacterias provenientes de muestras de agua estancada, suelo húmedo y heces bovinas.

Medios usados			
Sales Minerales de Nitrato (NMS)		Sales Minerales de Amonio (AMS)	
Sustancia	Cantidad	Sustancia	Cantidad
NaCl	1 g	NaCl	1 g
KNO ₃	1 g	NH ₄ Cl ¹	0.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	1g	MgSO ₄ *7H ₂ O	1 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.2 g	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0.23 g	KH ₂ PO ₄	0.23 g
Metanol	5 mL	Metanol	5 mL
FeCl ₃ *6H ₂ O	1 mL	FeCl ₃ *6H ₂ O	1 mL
Elementos traza	1 mL	Elementos traza	1 mL
Agar	15 g	Agar	15 g
pH	6,8	pH	6,8
Temperatura	37°C	Temperatura	37°C

¹: Se agregaron 0.5 g de NH₄Cl en lugar de 1 g de KNO₃ como fuente de nitrógeno. Explicado en la sección de discusión.

Ambos medios minerales fueron autoclavados a 121 °C a 1,5 atmósferas de presión por 15 minutos y vertidos en placas Petri. Se realizaron diluciones seriadas de para las 3 muestras recolectadas. Se prepararon diluciones seriadas para la muestra de agua de Palmitopamba de 10⁻¹ hasta 10⁻⁴, tomando 1 mL de la muestra de agua en 9 mL de agua estéril (solución madre), posteriormente se tomó 1mL de la solución madre que se agregó en 9 mL (10⁻¹) y se repitió el proceso hasta la última dilución. Se realizó un procedimiento similar para las muestras sólidas, tomando 1 gramo de muestra en 9 mL de agua estéril hasta llegar a una dilución final de 10⁻⁸. Se sembraron en placas de Petri con la técnica de estriado y se incubaron a 37 °C de 5 a 7 días. Del último cuadrante de estriado se replicó una, repitiendo la siembra cada semana en medio sólido mineral fresco hasta la obtención de 9 cultivos axénicos.

Tinción Gram de aislados

Se realizó esta técnica de tinción para la confirmación de que se trataba de Proteobacterias de acuerdo con el protocolo descrito por (Tripathi & Sapra, 2022), sustituyendo la mezcla de decoloración alcohol:acetona (1:1) por metanol.

Prueba de citrato

El ensayo de Citrato de Simmons fue llevado a cabo en 9 tubos de 5 mL cada uno, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las cepas son citrato positivas si hay cambio de color verde a azul en el medio.

Extracción de DNA genómico

Se realizó un cultivo sólido-líquido seleccionando una colonia de cada uno los 9 cultivos axénicos obtenidos, que fueron cultivadas en falcón de 50 mL conteniendo 45 mL de medio LB Miller líquido. Las células se incubaron por 24 horas hasta observar turbidez en los tubos. Se hizo uso del kit FastDNA Spin de MP Biomedicals para la extracción de DNA genómico siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de DNA utilizando el quipo Qubit 2.0, añadiendo 3 µL de ADN de los aislados a 197 µL de solución de trabajo Qubit™ 1X dsDNA HS.

Amplificación del gen 16S rRNA y verificación de amplicones

Se llevó a cabo PCR de punto final usando los primers **515F** (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y **907R** (CCGTC AATTCCTTTGAGTTT) para la amplificación de la región V₄-V₅ del gen 16S rRNA. Los reactivos empleados para la PCR se detallan en la **tabla 2**. La PCR incluyó por duplicado: 9 muestras (de 9 cultivos axénicos) + control positivo + control negativo + volumen muerto.

El número de ciclos, así como los tiempos de cada fase de la PCR se indican en la **tabla 3**. Finalizados los 25 ciclos, los amplicones fueron cargados en geles de agarosa al 1.5% con 1 μL de *SYBR Safe*TM. Se cargó cada pocillo con 12 μL de cada muestra, 12 μL del control negativo y 3 μL del marcador de peso molecular de 1kb, y se corrió el gel a 100 V por un tiempo de 45 minutos.

Tabla 2. Cálculos y cantidades de reactivos empleados para la amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR de punto final.

Cálculos para PCR de punto final									
Para 6 reacciones					Para 9 reacciones				
Componente	[] _o	[] _{rx}	V _{tubo} (μL)	V _{rx} (μL)	Componente	[] _o	[] _{rx}	V _{tubo} (μL)	V _{rx} (μL)
DNA			1		DNA			1	
DreamTaq	5 U/ μL	0,625 U/ μL	0,125	0,75	DreamTaq	5 U/ μL	0,625 U/ μL	0,125	1,125
dNTPS	10mM	0,2 mM	0,5	3	dNTPS	10mM	0,2 mM	0,5	4,5
Primer Forward	10 μM	0,4 μM	1	6	Primer Forward	10 μM	0,4 μM	1	9
Primer Reverse	10 μM	0,4 μM	1	6	Primer Reverse	10 μM	0,4 μM	1	9
Buffer/w 2mMg	10X	1X	2,5	15	Buffer/w 2mMg	10X	1X	2,5	22,5
H ₂ O	-	-	18,875	113,25	H ₂ O	-	-	18,875	169,875
Vf			25	150	Vf			25	225

Tabla 3. Parámetros de temperatura, tiempo y número de ciclos ajustados en el termociclador para la amplificación del gen 16S rRNA

Estado	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	3 min.	1X
Desnaturalización	98	15 seg.	
Hidridación	48	30 seg.	25X
Extención	72	30 seg.	
Extensión final	72	5 min.	1X

Cuantificación de DNA de los amplicones generado por PCR de punto final

Se ejecutó el mismo procedimiento llevado a cabo para la extracción y cuantificación de ADN genómico que se describe más arriba.

Identificación de cepas obtenidas por secuenciación tipo Sanger

La reacción de secuenciación por el método Sanger fue llevada a cabo por la empresa Macrogen, Corea, para lo cual se prepararon alícuotas de los *primers* empleados en la PCR (**515F-907R** región **V₄-V₅**). Los resultados fueron entregados 3 semanas después de la fecha de envío.

Análisis de resultados de secuenciación tipo Sanger

Las secuencias generadas tanto *Forward* como *Reverse* de cada cepa analizada fueron alineadas usando el programa BLAST, comparándolos con el resto de las secuencias disponibles en la base de datos *Standard Sequences* (nr).

Pruebas de asimilación de compuestos aromáticos

Se emplearon colonias de 24 h cultivadas en medio LB sólido. Se siguió el procedimiento empleado por (De Marco et al., 2004): se colocaron 160 μL de xileno o tolueno por cada 30 mL de medio AMS sin fuente de carbono y se solidificó en placas Petri. Se inocularon y se incubaron a 28 °C por 72 horas. Para el control se empleó una placa Petri con medio sólido sin fuente de carbono. El ensayo es positivo si hay presencia de colonias o de turbidez.

3. Resultados

3.1 Obtención de aislados bacterianos a partir de muestras ambientales

En la **tabla 4**, se indican y describen los 9 aislados obtenidos de las distintas muestras, tal y como se explica en el apartado de Materiales y Métodos. Para la obtención de estos cultivos axénicos, se seleccionaron aquellas placas que presentaron mayor crecimiento y colonias individuales reconocibles y se repicaron aquellas que presentaban coloración blanca, rosa o roja, basándonos en la bibliografía disponible (Hanson & Hanson, 1996). En total se obtuvieron 9 aislados: dos aislados de PP en aguas estancadas (EC1 y EC2); cinco aislados de la Granja Tío Mario en Pomasqui de heces de vaca (HV1, HV2, HV3, HV5 Y HV6); y dos colonias de PM de suelo (PM1 y PM2).

Las figuras 3, 4 y 5 muestran el aspecto de estos aislados cultivados en placa Petri. Como puede observarse, las muestras EC (**Fig. 3**), fueron ovaladas y presentaron coloración rosada. La **figura 4** muestra los aislados HV que presentaron varias gamas de pigmentación: blancas, crema, rosa pálido (HV2 y HV6) e incluso algunas no presentaron pigmentación (HV5). En cuanto a los aislados PM (**Fig. 5**), estos presentaron coloración blanca y crema.

Estos cultivos axénicos fueron preservados en medio LB:glicerol en una proporción 80:20 a -20 °C.

Tabla 4. Características morfológicas de los 9 aislados obtenidos de las 3 muestras seleccionadas

Lugar de muestreo	Tipo de muestra	Nombre de aislado	Pigmentación colonias	Tinción Gram	Morfología
Palmitopamba, Nanegal (PP)	Agua estancada	EC1	Rosadas	-	Estreptococos
		EC2	Rosadas	-	Bacilos agrupados
Granja Tío Mario, Pomasqui (HV)	Heces de vaca	HV1	Crema y blancas	-	Cocos individuales
		HV2	Blancas y rosa pálido	-	Bacilos agrupados
		HV3	Crema y blancas	-	Estafilococos
		HV5	Crema y no pigmentadas	-	Estafilococos
		HV6	Crema y rosa pálido	-	Cocos individuales
Parque Guangüiltagua, Quito (PM)	Suelo	PM1	Blancas	-	Estafilococos
		PM2	Crema	-	Estreptococos

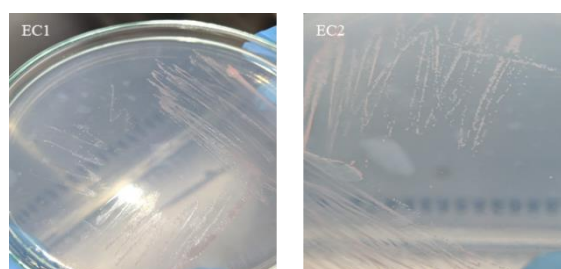


Figura 3. Colonias aisladas a partir de la muestra de agua de Palmitopamba(PP)

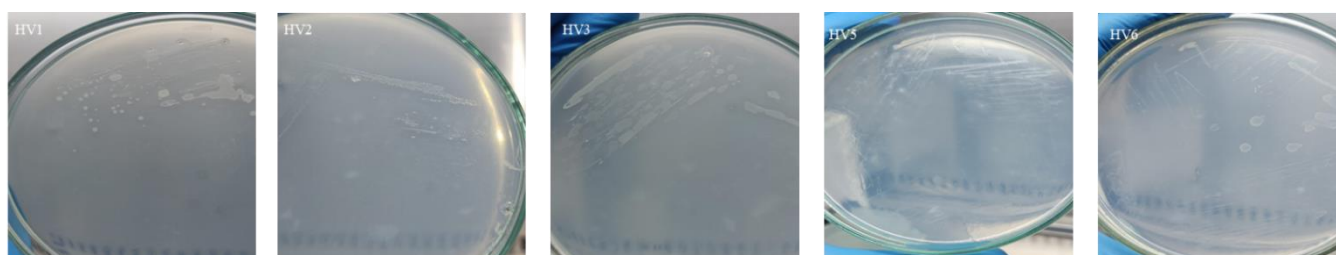


Figura 4. Colonias aisladas a partir de la muestra de heces de bovinos (HV)

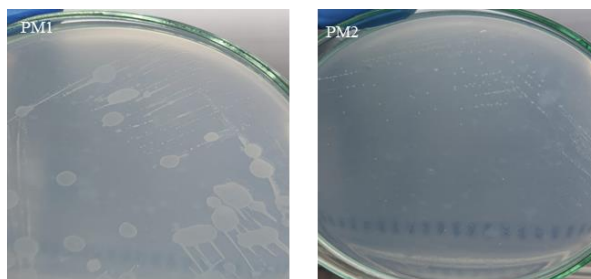


Figura 5. Colonias aisladas a partir de la muestra de suelo del parque metropolitano (PM)

3.2. Respuesta a tinción Gram de aislados y descripción morfológica

Como ya se mencionó antes, todas las Proteobacterias, grupo al que pertenecen las bacterias de nuestro interés, son Gram (-). Por eso, y antes de proceder a la identificación molecular, se realizó una tinción Gram para descartar bacterias competidoras. En la **figura 6**, se muestran dos tinciones representativas, correspondientes a EC1 y EC2. Los 9 aislados fueron Gram (-). La morfología (coco o bacilo, individual o encadenado) se indica en la **tabla 4**. La morfología de las bacterias aisladas es acorde a lo esperable para metanotrofos (Dedysh & Dunfield, 2011; Hanson & Hanson, 1996; Rusmana & Akhdiya, 2009).

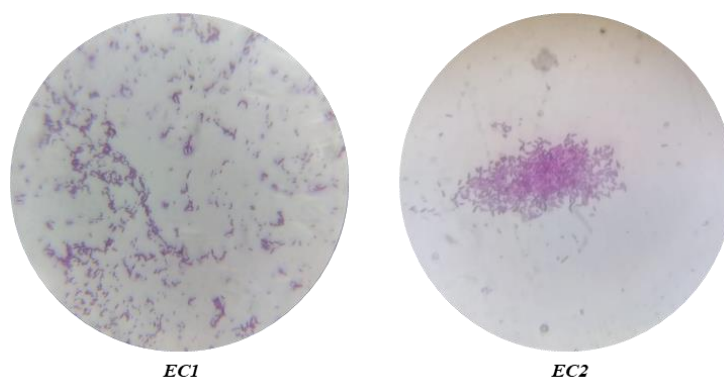


Figura 6. Visualización de la respuesta a la tinción de 2 aislados representativos. Vistos en el microscopio óptico en el lente 100X y aceite de inmersión.

3.3. Identificación molecular de los aislados mediante secuenciación Sanger de 16S rRNA

Para la identificación molecular de nuestros aislados se realizó una PCR y secuenciación Sanger del gen 16S. Una vez realizada la PCR tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, se visualizaron los productos en un gel de agarosa. La **figura 7** muestra dos geles en que se pueden observar los productos de PCR correspondientes a los 9 aislados, con un tamaño aproximado de 400 pb que se corresponde con lo esperado. La muestra PM1 mostró una banda muy tenue que no aumentó tras la repetición del procedimiento.

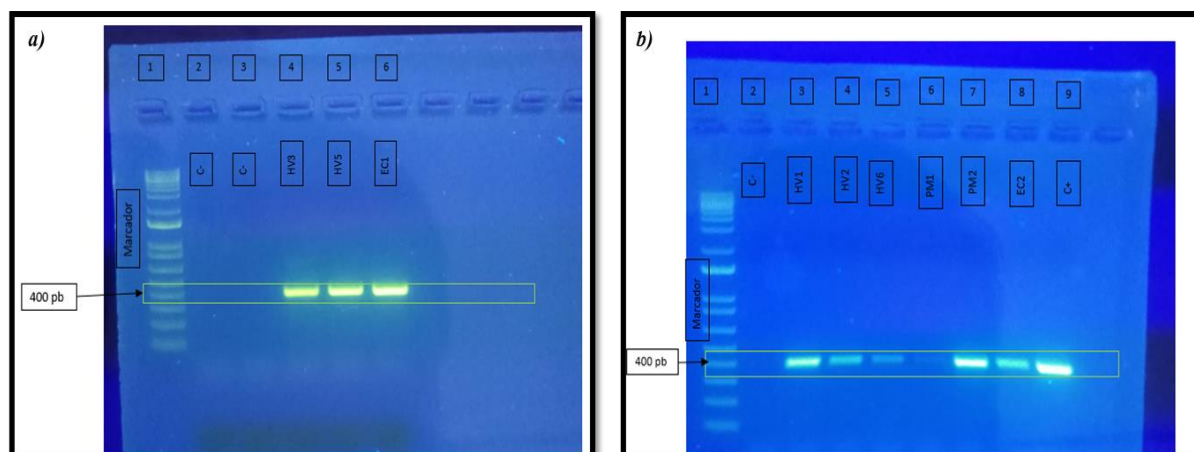


Figura 7. Geles de agarosa al 1.5% revelando las bandas de amplificación del gen 16S rRNA. a) Muestras HV3, HV5 y EC1. b) HV1, HV2, HV6, PM1, PM2 y EC2.

Una vez secuenciados los productos en Macrogen, Corea, se obtuvieron 18 secuencias correspondientes a FW (*forward*) y RV (*reverse*) de los 9 aislados. La longitud tanto para las secuencias FW como para las RV estuvo comprendida en un rango entre 385-389 pb, para las cepas EC1 a HV6 (**Tabla 4**). Las cepas PM1 y PM2 presentaron longitudes más altas en comparación, con valores que iban desde los 559 hasta los 573 pb. En la **tabla 5**, se indican los resultados de la identificación molecular arrojados por el BLAST, con los porcentajes de identidad y cobertura logrados.

Tabla 5. Identidad de las cepas pertenecientes a las 9 muestras obtenidas de los 3 sitios de recolección.

Nombre cepa	Organismo	% Identidad	% Cobertura
EC1	<i>Serratia liquefaciens</i>	99,19	97
EC2	<i>Rhanella aqualitit</i>	99,96	98
HV1	<i>E. coli</i> D6	99,47	98
HV2	<i>E. coli</i> AAK	99,48	98
HV3	<i>Acinetobacter Iwoffii</i> S14	99,47	97
HV5	<i>E. coli</i> NF36	99,2	98
HV6	<i>Acinetobacter Iwoffii</i> S14	99,48	98
PM1	<i>Sinployea atiensis</i>	84,86	55
PM2	<i>Paludibacterium denitrificans</i>	98,68	65

Todos los aislados menos PM1 y PM2 presentaron porcentajes de identidad superiores al 99%, con coberturas del 100%, indicando que la identificación a nivel de género y especie fue positiva. La muestra PM1 fue identificada como *Sinployea atiensis* (un caracol), con solo un 84,86% de identidad y un 55% de cobertura. Su identificación, obviamente, se consideró negativa. Por último, la muestra PM2 fue identificada como *Paludibacterium denitrificans*, con un 98,68 de identidad y un 65% de cobertura, haciendo su identificación cuando menos dudosa. Tal y como se indicó más arriba, las secuencias correspondientes a estos aislados (PM1 y PM2) fueron las únicas con una longitud diferente. Todo ello sugiere que la identificación de las muestras EC y HV fueron correctas, pero no así las de PM.

3.4. Asimilación de citrato, xileno y tolueno

Tabla 6. Respuesta de aislados a crecimiento en metanol, citrato y tolerancia a compuestos aromáticos.

Nombre cepa	Metanol	Citrato	Tolueno	Xileno
EC1	+	-	-	-
EC2	+	+	+	-
HV1	+	-	-	-
HV2	+	+	-	-
HV3	+	-	-	-
HV5	+	-	-	+
HV6	+	+	+	-
PM1	+	+	+	-
PM2	+	-	±	+

Basándonos en lo descrito por (De Marco et al., 2004) se evaluó la capacidad de las cepas para asimilar compuestos carbonados, distintos del metanol presente en los medios selectivos, como única fuente de carbono y energía: citrato, xileno y tolueno. Lógicamente, todas fueron capaces de emplear metanol como fuente de carbono y energía ya que este era la única fuente de carbono presente en los medios selectivos empleados. De los 9 aislados, 4 fueron capaces de emplear el citrato para su crecimiento (EC2, HV2, HV6 y PM1), haciéndose visibles 24h tras su inoculación en medio agar citrato de Simmons (Tabla 6). El crecimiento en tolueno fue observable 72h después de la inoculación en medios sólido AMS para cuatro cepas (EC2, HV6, PM1 y PM2). En el caso de PM2, únicamente aparecieron 4 colonias tras 72h, de manera que se identificaron como positivos/negativos con relación a su tolerancia al tolueno. Las otras 3 cepas presentaron un crecimiento notablemente superior. En cuanto al xileno, solo dos cepas fueron capaces de asimilarlo: HV5 y PM2.

4. Discusión

4.1. Identificación de aislados en base a secuenciación Sanger de 16S rRNA

En este trabajo, empleando un medio selectivo que contenía metanol como única fuente de carbono, se lograron aislar 9 bacterias de fuentes como agua estancada, heces de vaca y suelo. A través de PCR y secuenciación Sanger del gen 16S fue posible identificar de manera fehaciente 7 de los 9 aislados (Tabla 5). Sorprendentemente, ninguna de las bacterias identificadas perteneció al grupo de las metanotrofas.

EC1 fue identificada como *Serratia liquefaciens*, una bacteria Gram (-) perteneciente a la familia de las Enterobacterias. Estos organismos habitan una gran variedad de ambientes: acuáticos, edáficos y como flora bacteriana de plantas. También tienen importancia médica al considerarse patógenos del tracto digestivo y respiratorio en humanos (Khalifa, 2022). EC2, por su parte, fue identificada como *Rhanella aqualitris*, una Enterobacteria Gram (-) de interés médico comúnmente encontrada en agua y suelo (Gaitán & Bronze, 2010).

De acuerdo con (Pacwa-Plóciniczak, y otros, 2016), las bacterias pertenecientes a los géneros *Serratia*, *Rhanella*, *Proteus* y *Rodobacter* han sido identificadas en otros estudios y clasificadas como bacterias oxidadoras de hidrocarburos, esto debido a su habilidad de aumentar la biodisponibilidad de hidrocarburos (diesel, aceite de petróleo, etc.) para su posterior oxidación gracias a que estos producen biosurfactantes que aumentan la solubilidad de estos compuestos (Ma et al., 2006; Zhukov et al., 2007; Anyanwu et al., 2011).

HV1, HV2 y HV5 fueron identificadas como *E. coli* de distintas cepas, D6, AAK y NF36 respectivamente. Se ha demostrado que tanto factores ambientales como la presencia de agentes contaminantes permiten la activación de genes que codifican proteínas de membrana, así como enzimas capaces de oxidar hidrocarburos de cadena larga mediante la activación del citocromo P450 alcano hidroxilasa, la cual permite la oxidación de compuestos exógenos, como pesticidas, alcoholes e hidrocarburos (Ji et al., 2013; Zhang et al., 2019).

Las cepas HV3 y HV6 tuvieron una identidad de más del 99% con *Acinetobacter iwoffii* S14. Se trata de un bacilo Gram (-) que forma parte de la microbiota de la piel, y suele ser causante de problemas de gastritis al interactuar con *H. pylori* (Rathinavelu et al., 2003). En general, *Acinetobacter sp.* cuenta con una batería de enzimas pertenecientes a las n-alcanos monooxigenasas y alcano hidroxilasas, las cuales catalizan la conversión de hidrocarburos a alcoholes y a peróxidos. *A. haemolyticus* DSM como *A. iwoffii* S14 contiene en su genoma los genes *alkM* y *almaA*, los cuales

son genes putativos responsables de la oxidación de hidrocarburos C₅-C₁₀ hasta aquellos >C₃₂ (Ji et al., 2013; Madigan; Martinko; Stahl; Clark, 2012).

Por último, los aislados PM1 y PM2 no fueron correctamente identificados (PM1) o su identificación fue dudosa. PM2 fue identificada como *Paludibacterium denitrificans*, una bacteria Gram (-) móvil en forma de bacilo reductora de nitratos aislada de humedales (S. W. Kwon et al., 2008). Como ya se mencionó, la cobertura para este aislado fue únicamente de 65%. Según (S. W. Kwon et al., 2008), *P. denitrificans* como *P. yonheupense* presentan morfología en forma de bacilos agrupados, lo cual no corresponde con lo obtenido en el presente trabajo, esto sumado a la baja cobertura del genoma indica que la identidad de esta cepa aun es desconocida (S. W. Kwon et al., 2008).

Dedysh y col. como Hanson & Hanson explican que, si bien es cierto el uso de metanol como fuente de carbono como sustituto de metano es válido para la obtención de colonias metanotrofas, su uso debe ser considerado como última alternativa, ya que, como se explicó, existe más de un microorganismo (a parte de los metanotrofos) que emplean metanol por medio de la MDH. Así mismo, comentan que su uso aumenta considerablemente la ventaja de otros organismos competidores, limitando así la presencia de metanotrofos. De igual manera, al momento de realizar los repiques, deben seleccionarse colonias pequeñas, ya que esto permitiría aumentar la probabilidad de obtener colonias metanotrofas (Meruvu et al., 2020). Sin embargo, este último punto no garantiza al cien por ciento la obtención de metanotrofos ya que esta característica la comparte tanto *S. marcersens*, como *R. aqualitis* y *P. hauseris*, al ser estas oxidadoras de metanol.

A pesar de los medios empleados, y de que la morfología sí es acorde con metanotrofos, los análisis moleculares indican que las cepas corresponden a *Enterobacterias*. Tanto *Serratia liquefaciens*, *Rhanella aqualitis*, *E. coli* y *Acinetobacter Iwoffii* pertenecen al grupo de las *Gammaproteobacterias* del mismo modo que los metanotrofos de tipo I (*Methylobacter*, *Methylomonas*) por lo que no se encontrarían tan distantes en ese sentido. Por otra parte *P. denitrificans* es la que más difiere de este grupo, al ser del orden de las *Betaproteobacterias* (S. W. Kwon et al., 2008). Aun así, queda la interrogante del porqué se obtuvieron estos géneros de bacterias, tomando en consideración que los medios selectivos seleccionados (NMS y AMS) poseen metanol, el cual ha sido empleado para el aislamiento de bacterias metanotrofas (Dedysh & Dunfield, 2011; M. Kwon et al., 2019; Rusmana & Akhdiya, 2009).

Por una parte, Wise et al., y Horz et al. explican que el uso de *primers* para amplificar el gen 16S rRNA como 16S DNA deben ser preferentemente diseñados para la identificación de metanotrofos cultivados a partir de muestras ambientales. Esto debido a que los sets de *primers* empleados comúnmente para la identificación de otros organismos (ejemplo; 27F-1492R) poseen una o dos bases que generan un error al momento de la PCR, limitando así la identificación apropiada de bacterias metanotrofas. Aunque esta opción no es obligatoria, permite obtener resultados más fidedignos (Horz et al., 2001; Wise et al., 1999). Así mismo, Chen y col. en su estudio de niveles de expresión del gen 16S en metanotrofos, demuestran que el uso de *primers* diseñados exclusivamente para la detección de géneros de bacterias metanotrofas facilita mucho la identificación de metanotrofos tanto de tipo I como de tipo II, a diferencia de los *primers* convencionales utilizados convencionalmente (Chen et al., 2007). Adicionalmente, se ha encontrado que tanto *S. liquefaciens*, *A. Iwoffii* son capaces de crecer en una amplia gama de fuentes de carbono, como pesticidas y antibióticos, por lo que su presencia no es atípica (Rathinavelu et al., 2003). La presencia de *P. denitrificans* en PM2 puede deberse que este género de bacterias puede degradar nitratos para emplearlo como nitrógeno molecular, por lo que podrían emplear NH₄Cl (presente en el medio AMS usado en las muestras HV y PM) para su crecimiento, así lo explica Kwon y col. (S. W. Kwon et al., 2008).

4.2. Asimilación de otras fuentes de carbono

Se determinó que no todas los aislados fueron capaces de emplear citrato (citrato negativas) probablemente debido a la ausencia de la enzima citrato permeasa o la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, ambas enzimas pertenecientes al ciclo TCA (MacFaddin, 2000). Las bacterias carentes de una de estas enzimas no podrán emplear citrato para su crecimiento.

La habilidad de la cepa EC2 (*Rhanella aqualitis*) para emplear y tolerar tolueno (3mM en 30 mL de medio) fue similar al estudio de (Pacwa-Plóciniczak, y otros, 2016), donde aislaron y caracterizaron 42 cepas de muestras de suelo y agua contaminados por hidrocarburos, obteniendo cepas de *Rhanella aqualitis* (CD110 y CD156) con alta tolerancia a tolueno y un 33% de índice de emulsificación (capacidad para aumentar la solubilidad de compuestos no solubles en medio acuoso). La cepa HV5, que corresponde a *E. coli* NF36 presentó crecimiento en xileno, esto puede deberse a la capacidad de ciertas cepas de *E. coli* para adaptarse a ambientes que poseen hidrocarburos u otro tipo de contaminante, según lo explica (Zhang et al., 2019), quien aisló cepas de esta bacteria de ambientes con alta concentración de contaminantes, entre ellos, diesel. Allí, demostró la presencia de proteínas de membrana que permitían el paso hacia el interior de la célula, así como la presencia de alcano hidroxilasas para la degradación de los hidrocarburos presentes en el aire. De igual manera, explica que estos pueden ser o bien activados en respuesta al

estrés ambiental, o conferidos por transferencia horizontal de genes, y esto podría explicar la presencia de *E. coli* en los cultivos.

HV6, correspondiente a *A. iwoffii* presentó también crecimiento, esto probablemente debido a la presencia de alcano hidroxilasas como alcano monooxigenasas, enzimas presentes en ciertos géneros de *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, las cuales pueden oxidar hidrocarburos, como se explicó anteriormente (Ji et al., 2013). Siendo esta la explicación de su habilidad para degradar elementos xenobióticos. Para el caso de las cepas PM1 y PM2, no está claro todavía a que tipo de organismos pertenecen debido a su bajo porcentaje de identidad y poca exactitud del alineamiento, por tal motivo serán requeridas pruebas adicionales para la identificación molecular de estas cepas.

En general, las cepas EC2, HV5 y HV6 (*R. aqualitis*, *E. coli* NF36 y *A. iwoffii* S14) arrojaron resultados similares a los estudios correspondientes a (De Marco et al., 2004; Madigan; Martinko; Stahl; Clark, 2012; Tshikhudo et al., 2023; Zhang et al., 2019), en donde demostraron la habilidad de estos organismos de degradar hidrocarburos tanto de largo como de corta cadena (incluyendo xileno y tolueno) e incorporarlos en su metabolismo celular, como una posible adaptación a las condiciones ambientales (HV5). EC1, HV1, HV2 y HV3 (*S. liquefaciens*, *E. coli* D6, *E. coli* AAK y *A. iwoffii* S14) no fueron capaces de degradar ningún hidrocarburo, posiblemente a que estos requerían un mayor tiempo de incubación, o a la concentración de los hidrocarburos fue muy elevada para estas cepas. PM1 y PM2, pese a crecer en estos compuestos, requieren una confirmación de su identidad.

5. Conclusiones

- El empleo de medios selectivos conteniendo únicamente metanol no sirvió para aislar metanotrofos de fuentes ambientales
- Sin embargo, sí fue útil para aislar bacterias con capacidad de emplear compuestos de un único carbono y otros hidrocarburos orgánicos
- Las cepas aisladas EC2, HV5, HV6, PM1 y PM2 fueron las únicas cepas citrato positivas y con tolerancia a xileno y tolueno. Por lo que su uso en conjunto podría ser empleado para tratamientos tanto *in situ* como *ex situ* de suelos contaminados por compuestos BTX. Adicionalmente, su uso a escala de laboratorio para el estudio sobre la capacidad de degradación de hidrocarburos (diésel, aceite de petróleo, entre otros) es factible.
- Se requieren pruebas adicionales para una segunda identificación molecular de las cepas, PM1 y PM2

6. REFERENCIAS CITADAS

- Agencia Europea de Sustancias Químicas. (2022, June 5). *Tarjeta informativa sobre sustancias*.
- Boudh, S., Tiwari, S., & Singh, J. S. (2017). Microbial-mediated lindane bioremediation. In *Agro-Environmental Sustainability* (Vol. 2). https://doi.org/10.1007/978-3-319-49727-3_11
- Chen, Y., Dumont, M. G., Cébron, A., & Murrell, J. C. (2007). Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes. *Environmental Microbiology*, 9(11), 2855–2869. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01401.x>
- Costello, A. M., & Lidstrom, M. E. (1999). Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5066–5074. <https://doi.org/10.1128/aem.65.11.5066-5074.1999>
- Culpepper, M. A., & Rosenzweig, A. C. (2014). Structure and protein-protein interactions of methanol dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochemistry*, 53(39), 6211–6219. <https://doi.org/10.1021/bi500850j>

-
- De Marco, P., Pacheco, C. C., Figueiredo, A. R., & Moradas-Ferreira, P. (2004). Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.010>
 - Dedysh, S. N., & Dunfield, P. F. (2011). Facultative and obligate methanotrophs: How to identify and differentiate Them. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 495). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386905-0.00003-6>
 - Gaitán, J. I., & Bronze, M. S. (2010). Infection caused By *Rahnella aquatilis*. *American Journal of the Medical Sciences*, 339(6), 577–579. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181dd0cca>
 - Gupta, R. S. (n.d.). *The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes*. www.fems-microbiology.org
 - Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 60(2), 439–471. <https://doi.org/10.1128/membr.60.2.439-471.1996>
 - Horz, H. P., Yimga, M. T., & Liesack, W. (2001). Detection of Methanotroph Diversity on Roots of Submerged Rice Plants by Molecular Retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxzA*, 16S rRNA and Ribosomal DNA, Including *pmoA*-Based Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4177–4185. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4177-4185.2001>
 - Hur, D. H., Na, J. G., & Lee, E. Y. (2017). Highly efficient bioconversion of methane to methanol using a novel type I *Methylomonas* sp. DH-1 newly isolated from brewery waste sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(2), 311–318. <https://doi.org/10.1002/jctb.5007>
 - Inostroza, A. A., Pantoja, S., & González, R. R. (2011). Actividad enzimática de metanótrofos marinos y su uso potencial en biorremediación. *Gayana*, 75(2), 138–145. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382011000200002>
 - Islam, T., Torsvik, V., Larsen, Ø., Bodrossy, L., Øvreås, L., & Birkeland, N. K. (2016). Acid-tolerant moderately thermophilic methanotrophs of the class Gammaproteobacteria isolated from tropical topsoil with methane seeps. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00851>
 - Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., & Bartlam, M. (2013). Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00058>
 - Jiang, H., Chen, Y., Murrell, J. C., Jiang, P., Zhang, C., Xing, X. H., & Smith, T. J. (2011). Methanotrophs: Multifunctional Bacteria with Promising Applications in Environmental Bioengineering. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 6). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00374-3>
 - Juan, D., & Verdejo, G. (n.d.). *AISLAMIENTO DE BACTERIAS METANÓTROFAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)*.
 - Khmelenina, V. N., Kalyuzhnaya, M. G., Starostina, N. G., Suzina, N. E., & Trotsenko, Y. A. (1997). Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from Tuva soda lakes. *Current Microbiology*, 35(5), 257–261. <https://doi.org/10.1007/s002849900249>
 - Kwon, M., Ho, A., & Yoon, S. (2019). Novel approaches and reasons to isolate methanotrophic bacteria with biotechnological potentials: recent achievements and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9435-1>
 - Kwon, S. W., Kim, B. Y., Kim, W. G., Yoo, K. H., Yoo, S. H., Son, J. A., & Weon, H. Y. (2008). *Paludibacterium yonneupense* gen. nov., sp. nov., isolated from a wetland, Yongneup, in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 190–194. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64831-0>
 - Lau, E., Fisher, M. C., Steudler, P. A., & Cavanaugh, C. M. (2013). The Methanol Dehydrogenase Gene, *mxzA*, as a Functional and Phylogenetic Marker for Proteobacterial Methanotrophs in Natural Environments. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056993>
 - MacFaddin. (2000). Simmons Citrate Agar. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-maintenance of Medical Bacteria*, 1.

- Madigan; Martinko; Stahl; Clark. (2012). *Biology of Microorganisms* (13th ed., Vol. 1). Pearson.
- McDonald, I. R., Bodrossy, L., Chen, Y., & Murrell, J. C. (2008). Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 74, Issue 5, pp. 1305–1315). <https://doi.org/10.1128/AEM.02233-07>
- Meruvu, H., Wu, H., Jiao, Z., Wang, L., & Fei, Q. (2020). From nature to nurture: Essence and methods to isolate robust methanotrophic bacteria. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(3), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.06.007>
- Mogollon, L. (2020). Cuantificación de emisiones de gas metano entérico en ganado bovino de carne y leche. *Conversatorios Sobre Ganadería Sostenible*.
- ONU. (2022, May 12). *Emisiones de Metano*. ONU Programa Para Medio Ambiente.
- Park, S. yeong, & Kim, C. gyun. (2019). Application and development of methanotrophs in environmental engineering. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 21(3), 415–422. <https://doi.org/10.1007/s10163-018-00826-w>
- Rathinavelu, S., Zavros, Y., & Merchant, J. L. (2003). *Acinetobacter lwoffii* infection and gastritis. www.elsevier.com/locate/micinf
- Rusmana, I., & Akhdiya, A. (2009). Isolation and characterization of methanotrophic bacteria from rice fields. *Biotropia*, 16(2), 71–78. <https://doi.org/10.11598/btb.2009.16.2.53>
- Shindell, D. T., Faluvegi, G., Koch, D. M., Schmidt, G. a, Unger, N., & Bauer, S. E. (2009). Forcing to Emissions. *Interactions*, 326(x), 716–718.
- Söhnngen, N. L. (1906). Über bakterien, welche methan als kohlenstoffnahrung und energiequelle gebrauchen. *Zentrabl Bakteriöl Parasitenk Infektionskr*, 15, 513–517.
- Taylor, R. T. (1993). In situ bioremediation of trichloroethylene-contaminated water by a resting-cell methanotrophic microbial filter. *Hydrological Sciences Journal/Journal Des Sciences Hydrologiques*, 38(4), 323–342. <https://doi.org/10.1080/02626669309492678>
- Tripathi, Ni., & Sapra, A. (2022, August 8). *Gram Staining*. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Tshikhudo, P. P., Ntushelo, K., & Mudau, F. N. (2023). Sustainable Applications of Endophytic Bacteria and Their Physiological/Biochemical Roles on Medicinal and Herbal Plants: Review. *Microorganisms*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020453>
- Walter, G. A., Strand, S. E., Herwig, R. P., Treat, T. P., & Stensel, D. H. (1997). Trichloroethylene and methane feeding strategies to sustain degradation by methanotrophic enrichments. *Water Environment Research*, 69(6), 1066–1074. <https://doi.org/10.2175/106143097x125786>
- Wise, M. G., McArthur, J. V., & Shimkets, L. J. (1999). Methanotroph diversity in landfill soil: Isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4887–4897. <https://doi.org/10.1128/aem.65.11.4887-4897.1999>
- Zhang, T., Shi, X. C., Xia, Y., Mai, L., & Tremblay, P. L. (2019). *Escherichia coli* adaptation and response to exposure to heavy atmospheric pollution. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47427-7>