

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Biológicas

**“Caracterización de *Methylobacterium* sp. (*Methylobacterium* sp.) como Bacteria Promotora de Crecimiento Vegetal (PGPB) con capacidad de biorremediación”**

Tesis para obtener título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Renata María Corona Reyes

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Dalia Molina Romero

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María del Rocío Bustillos Cristales



Enero 2024

## Índice

<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
Taxonomía .....	7
Bioquímica .....	10
Genética .....	10
Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) .....	11
Ácido Indolacético .....	11
Solubilización de fosfato inorgánico .....	12
Sideróforos .....	13
Biorremediación .....	13
<b>ANTECEDENTES</b> .....	14
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>MATERIAL &amp; MÉTODOS</b> .....	19
Capacidades bioquímicas tipo PGPR .....	19
Determinación de indoles .....	19
Solubilización de Fosfatos .....	20
Producción de sideróforos .....	20
Capacidad para biorremediación de hidrocarburos .....	21
Supervivencia a hidrocarburos <i>in vitro</i> .....	21
Búsqueda <i>in silico</i> del gen <i>amiE</i> .....	22
Diseño de oligonucleótidos .....	22
Extracción de DNA .....	23
Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR) .....	23
Purificación de producto de PCR .....	23
Secuenciación del gen <i>amiE</i> .....	24
Análisis estadístico .....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	25
Capacidades bioquímicas tipo PGPR .....	25
Supervivencia a hidrocarburos .....	27
Oligonucleótidos .....	32
Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR) del gen <i>amiE</i> .....	34
<b>DISCUSIÓN</b> .....	40
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	44
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	44

REFERENCIAS ..... 45

## **Caracterización de *Methylobacterium* sp. (*Methylorubrum* sp.) como Bacteria Promotora de Crecimiento Vegetal (PGPB) con capacidad de biorremediación**

### **RESUMEN**

El género *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) está compuesto por bacterias gramnegativas, metilotróficas facultativas, capaces de metabolizar compuestos de un solo carbono como el metanol (C1) y compuestos de múltiples carbonos, por lo que se ha evidenciado que pueden adaptarse a suelos contaminados y con deficiencia de nutrientes. Se ha demostrado que las bacterias metilotróficas muestran atributos funcionales como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR); tolerancia al estrés abiótico, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, disminución de la toxicidad a metales y la síntesis de fitohormonas. Por las características mencionadas anteriormente las bacterias metilotróficas son de gran interés para la industria agrícola y para la biorremediación. En este trabajo se determinaron características de interés agrícola; y de biorremediación, a las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23, aislada de la rizosfera de *Neobuxbaumia macrocephala* presente en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán y la cepa tipo *Methylobacterium extorquens* JCM2802. Los ensayos incluyeron potencial PGPR por la solubilización de fosfatos y la producción de indoles y sideróforos, el uso de gasolina y diesel y la presencia del locus *amiE*, involucrado en la degradación de hidrocarburos. Ambas cepas mostraron actividad solubilizadora de fosfatos en el medio de cultivo NBRIP. La determinación de indoles mediante la técnica de Salkowski fue positiva en ambas cepas, con un promedio de 6.366 µg/ml AIA para la cepa *M. UAPS01-23* y 0.554 µg/ml AIA para la cepa *M. extorquens* JMC2802. No detectamos producción de sideróforos determinada mediante el ensayo O-CAS en ninguna de las dos cepas. Se observó que tanto *M. UAPS01-23* como *M. extorquens* JCM2802 fueron capaces de sobrevivir en medio de cultivo con gasolina o diesel a una concentración de 300 ppm. Ambas cepas presentaron mayor crecimiento en condiciones no metilotróficas; en medio con gasolina *Methylobacterium* UAPS01-23 presentó una población de 8.73 UFC/ml y *M. extorquens* JMC2802 con 8.09 UFC/ml; en medio de cultivo con diesel 7.76 UFC/ml y 7.67 UFC/ ml respectivamente y en metanol 8.48 UFC/ml y 7.83 (condiciones metilotróficas). Se amplificó parcialmente el gen *amiE*, lo que corroboró la presencia de este gen en el genoma de las cepas *Metylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802. El gen *amiE* codifica la enzima acilamida amidohidrolasa (amidasa alifática) capaz de

hidrolizar las amidas de los anillos de compuestos aromáticos, componentes importantes de la gasolina y diesel, lo que sugiere que el gen *amiE* se está expresando cuando las cepas crecen en presencia de estos hidrocarburos. Concluimos que *Methylobacterium* UAPS01- 23 y *Methylobacterium extorquens* JCM2802 presentan propiedades bioquímicas que las perfila como un modelo potencial para la promoción del crecimiento vegetal y como posibles candidatas para la biorremediación de hidrocarburos.

## INTRODUCCIÓN

El género *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) está compuesto de bacilos gramnegativos, estrictamente aerobios, metilotróficos facultativos (Van Aken et al. 2004). El género *Methylobacterium* fue propuesto por Patt y colaboradores en 1976 como un género creado para albergar una única bacteria metilotrófica facultativa pigmentada de color rosa *Methylobacterium organophilum*. En años posteriores se identificaron y se incluyeron varias especies en este género; sin embargo, el porcentaje de similitud en la secuencia del gen 16S rRNA de las especies incluidas variaba del 92 al 100 %, lo que sitúa a varias cepas fuera del límite aceptado de similitud dentro de una misma especie (94 y 95 %) (Kelly et al. 2014; Green et al. 2018).

Distintos análisis filogenéticos (análisis del gen 16S rRNA, análisis de genes de mantenimiento y genes de proteína ribosómica, análisis de los genes *mxoF* y *xoxF* involucrados en el metabolismo metilotrófico y del gen *sga* involucrado en ciclo de la serina) realizados por Green y colaboradores (2018) mostraron un árbol filogenético donde se dividió al género *Methylobacterium* en tres clados. El clado A contenía a *Methylobacterium* spp. *sensu stricto*, incluyendo a la cepa tipo *M. organophilum*; el clado B incluyó a la cepa *Methylobacterium extorquens* y el clado C comprendió especies en su mayoría no metilotróficas.

Además, en el mismo estudio se probaron distintas fuentes de carbono como medio fenotípico. Se concluyó que el género *Methylobacterium* comprendería a las especies presentes en el clado A, con *M. organophilum* como cepa tipo; describiendo a las cepas dentro del género como especies metilotróficas facultativas (capaces de utilizar metanol como fuente de carbono), en su mayoría de pigmentación rosada. Por otro lado, las especies dentro del clado B se asignaron al nuevo género *Methylorubrum*, con *M. extorquens* como especie tipo e incluyendo especies metilotróficas facultativas (capaces de utilizar metanol y metilamina como fuente de carbono) de pigmentación rosada (Green et al. 2018).

Las colonias de *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) son generalmente rosadas debido a la síntesis de carotenoides, aunque pueden ir desde el rosa pálido al naranja brillante, tanto en medio con sales y metanol como fuente de carbono, así como en medios formulados con compuestos orgánicos más complejos (Patt et al. 1976; Van Dien et al. 2003; Green et al. 2018). *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) son organismos catalasa,

oxidasa y ureasa positivos (Green & Bousfield 1983; Green et al 2018).

El género *Methylobacterium* se distribuye en una amplia variedad de entornos naturales y artificiales, que incluyen suelo, aire, polvo, agua dulce y marina, sedimentos, suministros de agua, sistemas de aire acondicionado y mampostería (Van Aken et al. 2004). Además, *Methylobacterium* (*Methylobacterium*) establece diferentes asociaciones con plantas hospederas, que incluyen ectosimbiosis y endosimbiosis (Dourado et al. 2015). Se ha reportado al género como parte del microbioma de la filósfera y rizósfera de plantas, participando en el mantenimiento de la salud de su huésped y aumentando el crecimiento al complementar los nutrientes (Kumar et al. 2019; Pandiyan et al. 2021). Diferentes especies de *Methylobacterium* (*Methylobacterium*) presentan diversas funciones ecológicas como mantener el equilibrio en el ciclo del carbono entre la planta y el medio ambiente, aumentar la eficacia en la fijación de nitrógeno, mejorar la eficacia en la adquisición de fosfato y mantener los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico, entre otros (Parasuraman et al. 2019).

### Taxonomía

*Methylobacterium* (*Methylobacterium*) se encuentra dentro del dominio *Bacteria*, en el filo *Proteobacteria*, clase *Alphaproteobacteria*, orden *Hyphomicrobiales*, dentro de la familia *Methylobacteriaceae* (NCBI, 2023).

Actualmente el género *Methylobacterium* consta de 50 especies con alrededor de 2260 cepas sin clasificar al nivel de especie (NCBI, 2023). El género *Methylobacterium* consta de 11 especies (NCBI, 2023).

<b><i>Methylobacterium</i></b>	
<i>Methylobacterium adhaesivum</i> Gallego et al. 2006	<i>Methylobacterium longum</i> Knief et al. 2012
<i>Methylobacterium aerolatum</i> Weon et al. 2008	<i>Methylobacterium marchantiae</i> Schauer et al. 2011
<i>Methylobacterium ajmalii</i> Bijlani et al. 2021	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> Austin and Goodfellow 1979
<i>Methylobacterium aquaticum</i> Gallego et al.	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> SR1.6/6
	<i>Methylobacterium nodulans</i> Jourand et al.

al. 2005	2004
<i>Methylobacterium brachiatum</i> Kato et al.	<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060
2008	<i>Methylobacterium organophilum</i> Patt et al.
<i>Methylobacterium brachytheticii</i> Tani	1976
and Sahin 2013	<i>Methylobacterium oryzae</i> Madhaiyan et al.
<i>Methylobacterium bullatum</i> Hoppe et al.	2007
2012	<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20
<i>Methylobacterium cerastii</i> Wellner et al	<i>Methylobacterium oxalidis</i> Tani et al. 2012
2012	<i>Methylobacterium persicinum</i> Kato et al.
<i>Methylobacterium crusticola</i> Jia et al.	2008
2020	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>
<i>Methylobacterium currus</i> Park et al. 2018	Madhaiyan et al. 2009
<i>Methylobacterium dankookense</i> Lee et al.	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> JCM
2013	16408
<i>Methylobacterium durans</i> Kim et al. 2020	<i>Methylobacterium phyllostachyos</i>
<i>Methylobacterium frigidaeris</i> Lee and Jeon	Madhaiyan and Poonguzhali 2014
2018	<i>Methylobacterium platani</i> Kang et al. 2007
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> Green et	<i>Methylobacterium platani</i> JCM 14648
al. 1988	<i>Methylobacterium pseudosasicola</i>
<i>Methylobacterium gnaphalii</i> Tani et al.	Madhaiyan and Poonguzhali 2014
2012	<i>Methylobacterium radiodurans</i> Maeng et
<i>Methylobacterium goesingense</i> Idris et al.	al. 2021
2012	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> corrig. (Ito
<i>Methylobacterium gossipiicola</i> Madhaiyan	and Iizuka 1971) Green and Bousfield 1983
et al. 2018	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831
<i>Methylobacterium gregans</i> Kato et al.	<i>Methylobacterium segetis</i> Ten et al. 2020
2008	<i>Methylobacterium soli</i> Cao et al. 2013
<i>Methylobacterium haplocladii</i> Tani and	<i>Methylobacterium specialis</i>
Sahin 2013	<i>Methylobacterium symbioticum</i> Pascual et
<i>Methylobacterium hispanicum</i> Gallego et	al. 2020
al. 2005	<i>Methylobacterium tardum</i> Kato et al. 2008



<i>Methylobacterium indicum</i> Chaudhry et al. 2016	<i>Methylobacterium tarhaniae</i> Veyisoglu et al. 2013
<i>Methylobacterium iners</i> Weon et al. 2008	<i>Methylobacterium terrae</i> Kim et al. 2019
<i>Methylobacterium isbiliense</i> Gallego et al. 2005	<i>Methylobacterium thebainfresser</i>
<i>Methylobacterium jeotgali</i> Aslam et al. 2007	<i>Methylobacterium thuringiense</i> Wellner et al. 2013
<i>Methylobacterium komagatae</i> Kato et al. 2008	<i>Methylobacterium trifolii</i> Wellner et al. 2013
<i>Methylobacterium komagatae</i> DSM 19563	<i>Methylobacterium variabile</i> Gallego et al. 2005

**Tabla 1.** Especies (50) que integran el género *Methylobacterium*.

<b><i>Methylobacterium</i></b>	
<i>Methylobacterium aminovorans</i> Green and Ardley 2018	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> Green and Ardley 2018
<i>Methylobacterium extorquens</i> (Urakami and Komagata 1984) Green and Ardley 2018	<i>Methylobacterium rhodium</i> Green and Ardley 2018
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	<i>Methylobacterium rhodium</i> JCM 2811
<i>Methylobacterium extorquens</i> CM4	<i>Methylobacterium salsuginis</i> (Wang et al. 2007) Green and Ardley 2018
<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4	<i>Methylobacterium suomiense</i> (Doronina et al. 2002) Green and Ardley 2018
<i>Methylobacterium extorquens</i> DSM 13060	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> ) Green and Ardley 2018
<i>Methylobacterium extorquens</i> PA1	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> JCM 10893
<i>Methylobacterium podarium</i> (Anesti et al. 2006) Green and Ardley 2018	<i>Methylobacterium zatmanii</i> (Green et al. 1988) Green and Ardley 2018
<i>Methylobacterium populi</i> (Van Aken et al. 2004) Green and Ardley 2018	
<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	
<i>Methylobacterium pseudosasa</i> (Madhaiyan and Poonguzhali 2016) Green and Ardley 2018	

**Tabla 2.** Especies (11) que integran el género *Methylobacterium*.

## Bioquímica

Las bacterias metilotróficas utilizan sustratos de carbono reducido que no contienen enlaces carbono-carbono (como metanol y otros compuestos metilados) como única fuente de carbono y energía (Chistoserdova et al. 2009). *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) pertenece a este grupo siendo bacterias metilotróficas facultativas capaces de utilizar fuentes de carbono comunes como carbohidratos, u oxidar una variedad de compuestos de un solo carbono, incluidos el metanol y el formaldehído o compuestos de múltiples carbonos como el acetato, el etanol y la etilamina (C<sub>2</sub>), el piruvato (C<sub>3</sub>), el succinato (C<sub>4</sub>), como fuentes de carbono y energía. Cabe resaltar que *Methylorubrum* se diferencia de *Methylobacterium* por la capacidad de utilizar la metilamina como fuente de carbono (Smejkalová et al. 2010; Kumar et al. 2016; Green et al. 2018). Por lo tanto, mientras *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) estimula el crecimiento de la planta huésped, puede recibir y utilizar compuestos de un solo carbono (metanol) como fuente de carbono estable. En contraste, muchos otros microorganismos tienen requisitos de hábitat más complejos y dependen de fuentes de nutrientes más complejas (C<sub>6</sub>), sujetos a una mayor competencia. Este atributo puede resultar ventajoso para las metilobacterias en regiones con un clima desafiante, baja fertilidad del suelo y con recursos limitados (Abanda-Nkpwatt et al. 2009; Palberg et al. 2022). Algunas bacterias incluido el género *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) (Morohoshi et al. 2016) pueden utilizar amidas alifáticas de cadena corta para degradar compuestos orgánicos y obtener la fuente de nitrógeno y de carbono, en virtud de su capacidad para hidrolizar amidas a amoníaco y al ácido orgánico correspondiente (Skouloubris et al., 2001).

## Genética

Las bacterias metilotróficas presentan los genes *mox* que codifican proteínas responsables de la oxidación del metanol (Zhang et al. 2005). El gen *mxoF* está altamente conservado entre las especies metilotróficas lejanamente relacionadas, ya que los cambios en la secuencia de *mxoF* pueden resultar en una disminución de la eficiencia de

la enzima metanol deshidrogenasa (MHD) necesaria para oxidar el metanol (Lau et al. 2013; Dourado et al. 2015). Así mismo, el gen *xoxF* codifica una enzima metanol deshidrogenasa alternativa, que cataliza la oxidación del metanol a formaldehído (Chu et al. 2016). Por lo que la secuencia del gen *mxoF* y el gen *xoxF* puede usarse como herramienta genética para caracterizar especies de *Methylobacterium* a partir de muestras ambientales (Kist et al. 2013).

### Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

La microbiota vegetal se compone de comunidades de microorganismos diversos, estos microorganismos colonizan todos los tejidos vegetales accesibles. Las Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a las plantas les confieren ventajas como el incremento del crecimiento vegetal, la absorción de nutrientes, la tolerancia al estrés y la resistencia a los patógenos (Trivedi et al. 2020). Las PGPR forman parte de la microbiota vegetal y pueden colonizar y proliferar dentro del entorno de la rizosfera. La rizosfera se define como el área del suelo que rodea inmediatamente a la raíz, que está directamente influenciada por los exudados de la raíz de la planta (Santoyo et al. 2021; Berendsen et al. 2012).

### Ácido Indolacético

Las fitohormonas son moléculas pequeñas derivadas del metabolismo secundario de las plantas, que influyen en sus procesos fisiológicos en concentraciones muy bajas. Son responsables de su adaptación a los estímulos ambientales y se encargan de regular el crecimiento, desarrollo, procesos reproductivos, longevidad e incluso la muerte de las plantas (Su et al. 2017).

Las hormonas vegetales más estudiadas son las auxinas, el ácido abscísico, las citoquininas, la giberelina de etileno y los brasinoesteroides (Dilworth et al 2017). Las auxinas actúan principalmente en la elongación del tallo al promover el crecimiento celular y son reguladores claves en las vías de respuesta de las plantas ante diversos estímulos ambientales (Jiang et al. 2017). Los miembros naturales del grupo de las auxinas incluyen al ácido indol-3-acético (AIA), el ácido indol-3-butírico (IBA) y el ácido 4-cloro-indol-3-acético (4-Cl-IAA) (Dilworth et al. 2017; Yamaguchi et al 2010).

La producción de ácido-3-acético (AIA) no está limitada a las plantas, diversos géneros bacterianos son capaces de sintetizar este compuesto, incluidas bacterias del suelo, epífitas y colonizadoras de tejidos. Inclusive, se ha propuesto que el 80 % de las bacterias de la rizosfera son capaces de producir AIA (Patten et al. 1996; Vega-Celedón et al. 2016). En las bacterias se han descrito cinco vías de síntesis del AIA dependientes de triptófano, como la vía de la indol-3-acetamida (IAM), triptamina (TAM), oxidasa de cadena lateral de Trp (TSCO), ácido indol-3-pirúvico (IPyA) e indol-3-acetonitrilo (IAN); y la vía fosfato de indol-3 glicerol o indol independiente del triptófano (Hernández-Mendoza et al. 2021).

### Solubilización de fosfato inorgánico

El fósforo (P) es un macronutriente necesario para el crecimiento y desarrollo de las plantas. A nivel celular el fósforo se ve involucrado en una amplia gama de procesos metabólicos, específicamente, la síntesis de ácidos nucleicos y la generación de ATP, también constituyen el esqueleto estructural de otras biomoléculas como NADPH, fosfolípidos y azúcar-fosfatos para el metabolismo primario y secundario de las plantas. (Bechtaoui et al. 2021). El P no solo cumple un papel estructural, sino que también tiene una función reguladora en el metabolismo del carbono vegetal, la transferencia de energía, la transformación de azúcares y almidones; así como el movimiento de nutrientes (Thuynsma et al. 2016).

El suelo posee fósforo total en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos que en su mayoría no están disponibles para las plantas (Kalayu, 2019). La solubilización de fosfato inorgánico es uno de los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de las PGPR asociadas a plantas (Oteino et al. 2015). Los microorganismos solubilizadores de fosfato liberan enzimas fosfatasas y ácidos orgánicos, reduciendo el pH del suelo y aumentando las actividades de quelación en sitios de absorción de fósforo, así las bacterias son capaces de solubilizar los complejos de fosfato inorgánico insolubles como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxapatita y fosfato de roca, convirtiéndolos en ortofosfato que está disponible para la absorción y utilización de las plantas (principalmente  $PO_4^{3-}$ ,  $HPO_4^{2-}$  y  $H_2PO_4^-$ ) (Tian et al. 2021).

## Sideróforos

Los sideróforos son metabolitos secundarios producidos por microorganismos en condiciones de limitación de hierro que mejoran su capacidad de absorción, en el medio ambiente la forma férrica del hierro es insoluble y no disponible a pH fisiológico (Saha et al. 2016). En estas condiciones, los microorganismos sintetizan sideróforos que tienen una gran afinidad por el hierro férrico, estos complejos hierro férrico-sideróforo son transportados al citosol, donde el hierro férrico (Fe (III)) se reduce a hierro ferroso (Fe (II)), que es la forma accesible de Fe para los microorganismos (Saha et al. 2016; Prabhakar, 2020).

El hierro (Fe) es esencial para muchos procesos vegetales, incluida la fotosíntesis. El Fe forma parte del fotosistema I, del complejo citocromo b6f y del fotosistema II, y los iones Fe también son necesarios para la síntesis de clorofila y el funcionamiento general del aparato fotosintético (Ganz & Nemeth, 2015; Briat et al. 2015). Además, otras proteínas y complejos proteicos implicados en el transporte de electrones durante la fotosíntesis en cloroplastos y la fosforilación oxidativa en mitocondrias son Fe-dependientes. El Fe también sirve como cofactor en la síntesis de muchas hormonas vegetales, como el etileno y el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (Timofeeva et al 2022).

Algunas PGPR son capaces de producir sideróforos, que como ya se ha mencionado es un activo importante para proporcionar a la planta la cantidad necesaria de hierro (Shukla, 2019). Dependiendo de su naturaleza química, los sideróforos bacterianos se clasifican en catecolatos, fenolatos, hidroxamatos, carboxilatos y sideróforos de tipo mixto (su estructura se compone de dos o tres clases simultáneamente) (Ustiatik et al. 2021).

## Biorremediación

La biorremediación es una tecnología que utiliza procesos microbianos ecológicos, así como el metabolismo de algunas especies vegetales, para solventar el problema de la contaminación ambiental. En este proceso los microorganismos adaptados a los ambientes contaminados presentan la capacidad tolerar y crecer en presencia de éstos, que posteriormente convierten una amplia variedad de sustancias químicas tóxicas en formas no tóxicas (Singh et al. 2020).

La contaminación ambiental causada por hidrocarburos, pesticidas, especialmente el petróleo y sus derivados son motivo de gran preocupación porque son tóxicos para la mayoría de las formas de vida (Srivastava et al. 2019). Durante los procesos y las actividades que se realizan en la industria del petróleo, se puede generar contaminación ambiental en cualquiera de tres partes que integran este proceso industrial. La primera etapa, *Upstream* se refiere al origen del petróleo, su exploración y extracción. El proceso *Midstream* se refiere al transporte de petróleo crudo y *Downstream* describe los procesos de refinación para producir diferentes productos utilizables, como gasolina, diésel, combustible para aviones y otros productos petroquímicos (Hidalgo et al. 2020). Los hidrocarburos de petróleo se pueden dividir en cuatro categorías según su estructura química: saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas (Han et al. 2018). Estos hidrocarburos al contaminar diversos ambientes dañan a muchas formas de vida presentes en el sitio (Truskewycz et al. 2019).

## ANTECEDENTES

Los géneros bacterianos más estudiados como PGPR incluyen a *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*. Adicionalmente se han estudiado muchos otros géneros, entre ellos *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Rhodococcus*, y *Methylobacterium (Methylorubrum)* (Patel et al. 2021; Backer et al. 2018).

La cepa *Methylobacterium* sp. 2A aislada de plantas de papa *Solanum tuberosum* actúa como una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal bajo condiciones adversas, como la salinidad y es un agente de control biológico en contra de *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium graminearum*. *Methylobacterium* sp. 2A produce ácido indolacético (AIA), solubiliza el fosfato mineral y es capaz de crecer en un medio libre de nitrógeno (N<sub>2</sub>). En el genoma de *Methylobacterium* sp. 2A se encontraron genes atribuibles a los rasgos promotores de crecimiento vegetal (PGP). Se identificaron los genes *trpA-G* que codifican las cinco enzimas involucradas en la biosíntesis de L-triptófano; además se identificaron los genes que codifican los reguladores tipo sistema de dos componentes NtrBC y NtrXY, involucrados en la fijación de nitrógeno. También,

se identificaron los genes que expresan las enzimas de las dos vías de biosíntesis de IAA, la vía de indol-3-acetamida (IAM) y la de indol-3-acetonitrilo (IAN) (Grossi et al. 2020).

Cepas del género *Methylobacterium* spp., aisladas de muestras de hojas de *Cajanus cajan*, *Sachharum officinarum*, *Brassica juncea*, *Solanum tuberosum* y *Raphanus sativus* de campos agrícolas en Mau, India, mostraron ser promotoras del crecimiento vegetal en plantas de trigo (*Triticum aestivum*). Se probaron los filtrados del cultivo de estas cepas y se observó que mejoraron del 5 al 18% la germinación de semillas de *T. aestivum*. También se evaluó el índice de vigor de las semillas, se observó que los filtrados incrementaron este valor entre un 20% y 40% en comparación al control y los niveles de citoquinas producidos por las cepas bacterianas oscilaron entre 1,09 y 9,89 lg ml<sup>-1</sup> en el filtrado del cultivo (Meena et al. 2011).

La cepa *Methylobacterium* UAPS01-23 se aisló de la rizosfera de la cactácea *Neobuxbaumia macrocephala* presente en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Se identificó a *Methylobacterium* UAPS01-23 como bacteria metilotrófica, mediante la hibridación con los genes *mxoF* y *xoxF*, genes involucrados en el metabolismo metilotrófico (Bustillos-Cristales et al. 2017).

Las bacterias metilotróficas se asocian comúnmente con las plantas y ejercen efectos positivos. Estas respuestas se han atribuido a diferentes mecanismos como la solubilización de fosfato inorgánico, la disminución de la toxicidad de los metales, la activación de las defensas de las plantas, y la síntesis de moléculas que incluyen fitohormonas y sideróforos (Madhaiyan et al. 2010; Madhaiyan et al. 2009; Pigoleva et al. 2009).

Por otra parte, los géneros bacterianos más estudiados como biodegradadores de hidrocarburos aromáticos incluyen a *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp. y *Microbacterium* sp. (Abatenh et al. 2017). También, el género *Methylobacterium* es capaz de degradar hidrocarburos, como lo reporta Vasconcellos y colaboradores (2009), que aislaron e identificaron a una cepa de *Methylobacterium* sp. capaz de degradar dihidrofenantreno y fitano, estas bacterias son aerobias y se recuperaron de muestras de aceite de pozos de producción en la Plataforma Pampo, Cuenca de Campos (Macaé,

RJ, Brasil).

La cepa *Methylobacterium mesophilicum* RD1 aislada de una muestra de suelo de un taller de automóviles en Orile-Iganmu, Lagos (Nigeria) es capaz de utilizar el aceite de motor usado como única fuente de carbono y energía. Después de 12 días de incubación la cepa *M. mesophilicum* RDI eliminó el 61.2 % del contenido residual de aceite de motor usado y a los 21 días se eliminó el 89.5 % del mismo. También, degradó diversos hidrocarburos, incluidos los aromáticos policíclicos (Salam et al. 2015).

La cepa *Methylobacterium* sp. BJ001 aislada de *Populus deltoides x nigra* DN34, es capaz de degradar los explosivos tóxicos como trinitrotolueno (TNT), ciclotrimetilentrinitramina (RDX) y ciclotetrametilentrinitramina (HMX). *Methylobacterium* sp. BJ001 fue incubada por un periodo de 55 días y se observó la mineralización del RDX en un 58,0 % y el 61,4 % del HMX. La cepa BJ001 produjo derivados reducidos del ADNT y DANT, lo que indica que reduce los explosivos. Es importante destacar que *Methylobacterium* sp. BJ001 se aisló de tejidos de álamos no expuestos previamente a TNT, RDX o HMX. Por lo que, su capacidad para transformar explosivos no es el resultado de una presión selectiva proveniente de la exposición a contaminantes energéticos (Van Aken et al. 2004).

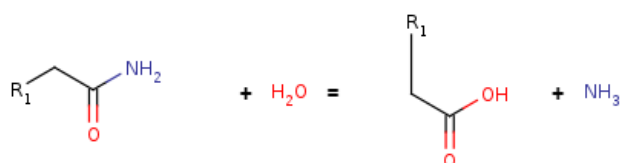
#### Amidasa Alifática (AmiE)

La enzima amidasa alifática pertenece a la superfamilia nitrilasa que generalmente forma homodímeros, esta superfamilia contiene hidrolasas que rompen los enlaces carbono-nitrógeno (Lu et al. 2020). Estas proteínas participan en el metabolismo de vitaminas y coenzimas, en la desintoxicación de moléculas pequeñas, en la síntesis de moléculas de señalización y en la modificación postraduccional de proteínas (Ham et al 2021; Fu et al. 2014). La aplicación biotecnológica de la familia de las nitrilasas incide en varias industrias entre ellas, la remediación de cianuro y el tratamiento de efluentes tóxicos (Lu et al. 2020).

La enzima *AmiE* forma parte de la superfamilia de las hidrolasas, y está relacionada con



el proceso de degradación de hidrocarburos aromáticos (Joshi et al. 2017; Luo et al. 2021). La enzima amidasa alifática cataliza la siguiente reacción (BRENDA: EC3.5.1.4):



**Figura 1.** Reacción catalizada por la enzima amidasa alifática. Una amida de ácido monocarboxílico + H<sub>2</sub>O = un monocarboxilato + NH<sub>3</sub>

La enzima amidasa alifática está involucrada en las siguientes vías: metabolismo de la arginina, prolina, fenilalanina y triptófano (BRENDA:EC3.5.1.4). También, esta enzima está involucrada en la degradación de compuestos aromáticos que contienen nitrógeno como aminobenzoatos, estireno y acrilonitrilo I, en diversos ambientes donde están presentes estos compuestos orgánicos aromáticos (KEGG DATABASE: EC 3.5.1.4). Y finalmente la amidasa alifática también participa en la biosíntesis ácido indolacético (AIA), de indol-3-acetato II, biosíntesis de indol-3-acetato III (bacterias), biosíntesis de indol-3-acetato IV (bacterias) (MetaCyc: EC 3.5.1.4).

## JUSTIFICACIÓN

La agricultura intensiva y las variedades vegetales de alto rendimiento utilizan una gran cantidad de fertilizantes químicos. Los fertilizantes sintéticos son costosos, dañinos para la salud y la nutrición del suelo, perjudicando la fertilidad y biodiversidad (Singh et al. 2021). Como alternativa a esta problemática se han tomado en cuenta a los biofertilizantes, que consisten en biomasa viva o células latentes de cepas microbianas eficaces, los cuales se activan a través de las interacciones con la rizosfera, aumentando así la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Ginni et al. 2020). Muchos de los microorganismos que se utilizan normalmente como biofertilizantes, incluyen a las cianobacterias fijadoras de nitrógeno (*Anabaena*), a las PGPR (*Rhizobium*, *Azotobacter*,

*Azospirillum*) y a las bacterias solubilizadoras de fosfatos (*Pseudomonas* spp.). Del mismo modo, los microorganismos celulolíticos y las bacterias productoras de fitohormonas (auxinas) también se utilizan en la formulación de biofertilizantes (Kaur, 2022).

Cabe resaltar que en México se usa indiscriminadamente los fertilizantes químicos en la práctica agrícola. Además, existen extensas áreas de suelos contaminados por hidrocarburos, debido a las tareas de exploración, refinación, falta de mantenimiento y robo de combustible. La tendencia de este tipo de desastres acontece principalmente en las zonas rurales, teniendo mayor efecto en las poblaciones dedicadas a la agricultura (Cavazos-Arroyo et al. 2014).

La introducción de hidrocarburos de petróleo en un entorno prístino cambia inmediatamente la naturaleza de ese entorno. Los hidrocarburos introducidos matan o inhiben muchas especies microbianas, las plantas expuestas a hidrocarburos se ven afectadas por la toxicidad directa, en consecuencia, se limita las formas de vida de orden superior en estos hábitats, alterando así el ecosistema (Truskewycz et al. 2019). Por lo que la biorremediación como método de recuperación para el tratamiento de ambientes contaminados con petróleo ha sido ampliamente adaptada y considerada como una de las mejores tecnologías (Singh & Chandra, 2014).

Debido a lo mencionado anteriormente, en este trabajo se plantea demostrar si *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) sp. posee capacidades bioquímicas promotoras del crecimiento vegetal y si es una bacteria capaz de tolerar la presencia de productos petrogénicos como lo es el diesel y la gasolina.

## OBJETIVOS

1. Evidenciar las capacidades bioquímicas tipo PGPR de *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) sp. mediante la producción ácido indol-3-acético (AIA) y sideróforos, así como la capacidad de solubilizar fosfatos.
2. Identificar *in silico* los genes que codifican las enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos y su amplificación.

3. Probar con ensayos en medio de cultivo la supervivencia de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *Methylobacterium extorquens* JCM2802 con hidrocarburos (gasolina y diesel) como única fuente de carbono.

## MATERIAL & MÉTODOS

Las cepas *Methylobacterium extorquens* JCM2802 y *Methylobacterium* UAPS01-23 fueron proporcionadas por el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Las cepas fueron sembradas en medio GP que contenía (1-L): peptona de caseína 10 g/litro, glicerol 10 g/litro y agar 16 g/litro y en medio mínimo MMS (1-L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.62 g, CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.05 g, MgSO<sub>4</sub> 0.20 g, NaCl 0.10 g, FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 1.0 µg, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 µg, CuSO<sub>4</sub> 5 µg, MnSO<sub>4</sub> 10 µg, NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 10 µg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 µg, CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 5 µg, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 70 µg, 0.5% metanol. Se incubaron a 30°C durante 5 días en el caso de ser utilizado el medio GP y por 7 días con medio mínimo. La cepa *Pseudomonas putida* KT2440 utilizada como control positivo fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Molecular Microbiana (BUAP). La cepa se sembró en medio Citrato de Simmons y se incubó a 30°C durante 24 horas.

### Capacidades bioquímicas tipo PGPR

#### Determinación de indoles

La determinación de indoles se realizó mediante la técnica de Salkowski (Gordon & Weber 1951; Glickmann & Deassaux 1995). Se realizaron tres experimentos independientes, por duplicado. Se estableció un pre-inóculo de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23, *M. extorquens* JCM2802 y *P. putida* KT2440 (control positivo) en tubos con 5 ml de medio líquido King B, utilizando como control negativo medio sin inocular, se incubaron en agitación a 150 rpm y 30°C durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la densidad óptica a 540 nm y se inocularon matraces con 25 ml de medio King B, con un volumen de pre-inóculo de 0.01 A (540 nm) utilizando la fórmula  $V1C1 = V2C2$  :

$$V1 = \frac{(25 \text{ ml})(0.01 A)}{\text{Densidad óptica}}$$

La determinación de indoles se realizó a las 72 y 96 horas de incubación. Se tomó una muestra de 1 ml del medio de cultivo en tubos eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se tomaron 500 microlitros de sobrenadante y se colocó en tubos de vidrio para agregar 500 microlitros de reactivo PC e incubar durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia de la reacción a una longitud de onda de 540 nm utilizando como blanco 500 microlitros de H<sub>2</sub>O y 500 microlitros de reactivo de PC. Para la determinación de la concentración se interpolaron las lecturas en una curva estándar de ácido indolacético.

La formulación del medio líquido King B en un litro fue la siguiente: Peptona de caseína 20g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15g, MgSO<sub>4</sub> 1.5g, Glicerol 1.5% y triptófano 0.1g.

La formulación del reactivo PC fue la siguiente: FeCl<sub>3</sub> 0.5 M y HClO<sub>4</sub> (37%).

#### Solubilización de Fosfatos

Para determinar la capacidad solubilizadora de fosfatos inorgánicos de las cepas de estudio, se utilizó el medio de crecimiento microbiológico NBRIP (Shekhar,1999). Se realizaron tres experimentos independientes, por duplicado. Las cepas *P. putida* KT2440 (control positivo), *M. extroquens* JCM2802 y *Methylobacterium* UAPS01-23 se cultivaron en medio líquido King B (en tubos Falcon con 5 ml de medio líquido) y se incubaron durante 24 horas en el caso de *P. putida* KT2440 y 48 horas para las cepas *Methylobacterium* en una incubadora orbital a 150 rpm y 30°C. Se tomaron 500 µl de cada muestra y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y los pallets se resuspendieron con 500 µl de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) 10 mM. Posteriormente se inocularon 20 microlitros de la suspensión celular en placas de medio sólido NBRIP (1L): MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 5g, MgSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 0.25g, KCL 0.2g, NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 0.1g, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 6g, Glucosa 9g, Azul de Bromotimol 6 ml a pH 7. Finalmente se midió la formación del halo a los 7 días de incubación con el programa IMAGEJ.

#### Producción de sideróforos

Para evaluar la producción de sideróforos se realizó el ensayo O-CAS modificado (Pérez-Miranda et al. 2007). Se realizaron tres experimentos independientes, por duplicado. *P. putida* KT2440 (control positivo), *M. extroquens* JCM2802 y *Methylobacterium* UAPS01-23 se cultivaron en medio líquido King B con H<sub>2</sub>O pisa (en tubos con 5 ml de medio

líquido) y se incubaron en agitación a 150 rpm y 30°C durante 72 horas. Para normalizar el inóculo en el medio sólido King B (con H<sub>2</sub>O pisa) se aplicó la fórmula  $V1C1 = V2C2$

$$V1 = \frac{(20 \text{ ul})(0.5 A)}{\text{Densidad óptica}}$$

El medio King B sólido inoculado se incubó a 30°C por 7 días. Para evidenciar la producción de sideróforos se realizó el protocolo de doble capa con el colorante cromo azurol, la formulación de la capa para superposición contiene (1L): Cromo azurol S (CAS) 60.5 mg, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) 72.9 mg, Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfónico) (PIPES) 30.24 g, agarosa 9 g (0.9 %, p/v) como agente gelificante y adicionar 10 ml de la solución FeCl<sub>3</sub> 1 mM · 6H<sub>2</sub>O (0.016 g) con HCl 10 mM (Perez-Miranda et al. 2007).

## Capacidad para biorremediación de hidrocarburos

### Supervivencia a hidrocarburos *in vitro*

Para determinar si las cepas eran capaces sobrevivir en presencia de hidrocarburos, el medio se formuló con los hidrocarburos como única fuente de carbono, se establecieron tres tratamientos: 1) Tratamiento con gasolina; 2) Tratamiento con diesel; 3) Tratamiento fuente de carbono óptima (TFCO); en el caso de *P. putida* KT2440 se utilizó glicerol y para las cepas del género *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) metanol. Se realizaron tres experimentos independientes, por triplicado. Con las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23, *M. extorquens* JCM2802 y *P. putida* KT2440 se estableció un pre-inóculo en tubos con 5 ml de medio líquido GP y se incubaron en agitación a 150 rpm y 30°C durante 72 horas. Se inocularon matraces con 25 ml de medio MMS (con la fuente de carbono correspondiente) con 300 ppm de gasolina para el tratamiento 1), 300 ppm de Diesel para el tratamiento 2) y para TFCO lo estipulado por la formulación del medio MMS. La concentración está en el rango típico utilizado en pruebas legales de biodegradación, por la Organización de Cooperación Económica y Desarrollo (OECD, 1992). Para igualar la población de los tres tratamientos se midió la densidad óptica a 540 nm, se empleó un volumen de pre-inóculo con una densidad óptica 0.005 A, aplicando la fórmula  $V1C1 = V2C2$

$$V1 = \frac{(25ml)(0.005)}{\text{Densidad óptica}}$$

Finalmente se cuantificó a la población a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas mediante la técnica Drop-Plate (Herigstad et al. 2001).

### Búsqueda *in silico* del gen *amiE*

Se buscó de forma bibliográfica los genes involucrados en la degradación bacteriana de hidrocarburos aromáticos. En la plataforma NCBI se buscó al gen *amiE*, involucrado en la degradación de hidrocarburos aromáticos, en *Methylobacterium (Methylobacterium)* y se realizó un BLAST de nucleótidos entre las secuencias contenidas en esta plataforma del gen *amiE* en este género.

### Diseño de oligonucleótidos

Se empleó el programa *Primer designing tool – NCBI* para el diseño de los oligonucleótidos, se utilizó la secuencia de nucleótidos del gen *amiE* de la cepa *Methylobacterium extorquens* DM4 (No. FP103042.2), tamaño del gen 1053 pb (Figura 2) y el producto que codifica es la enzima acilamida amidohidrolasa (amidasa alifática) (CAX25806.1).

```

1  tttagcgcggg tcgggtgggc cttcgccctt gccgacgaag gggatgccc cgatcggaca
61  ttctctcggg cgcgacgtgg agcgggtgat ggccgcgacc gcgtcggggg tgccgtcggg
121  gtccctogac cagcggcggt agaagtogta ggggcattcc gacatcccgt gccggttctc
181  cttcogagttg atcatgcocg tgtagccocg gtgcagcagc ttgaagaggt ggttctccga
241  ctggcgcgtgg gcgcggaat cgcggatcag gaacttcgag agtgccggcg actgaatgcc
301  catctcctcc tcgcccgaact ccccagcgt ccgaccgtcg aagccgatga tcgcccagtg
361  tccgaaatag ctgtagacgc cgtcgaagcc ggccgctgtg gcgactgcta cgtaggattt
421  gttggcgaat gccatcgoc ttagatcag aacctgctgt tccttgcccg gatacatgta
481  gccctggcag cggatgatga gttcggccgc gcgcatcgcg cagtcgccc agatctcggg
541  atagttgccg tcgtcgcaga tgatcaggct gatcttgagg cccttcggtc catccgagac
601  gtaggtcggg tcgcccggat accagccctc gatcggggtc cagggcatga tcttgccgta
661  cttctgcacg atctcgcctt ggtcgttcat caggatgagc gtgttgtagg gagctttgcg
721  cggatgctcc tcgtgacgct cgcgggtgag cgagaacacg cccagacct tggccttgcg
781  gcaggcgtcg gcgaagatgt cggctcocc accgggatg gaggaggcgg tctcgtacat
841  ctgcgcccg cgtacatga tgcggtgggt cgagtattcg gggagatca cgagatcgag
901  gcccgccaga ccggccttca tcccgatgat catgtcccg atctcttgg cgttttccaa
961  cacctcggcc ttggtgtgca gccggggcat cttgtagttc acgacggcga cgcgacgct
1021  gtccctgactc gacgagatat caccgtgcat cat

```

Figura 2. Secuencia del gen *amiE* de la cepa *Methylobacterium extorquens* DM4. Color gris abarca la región conservada del gen (953 pb).

Los oligonucleótidos que se diseñaron a partir de la región conservada del gen *amiE*. Para ellos se analizaron 28 secuencias de *Methylobacterium (Methylobacterium)* depositadas en la plataforma NCBI identificando regiones conservadas del gen. Los oligonucleótidos permitieron la amplificación de un producto de 756 pb. El oligonucleótido iniciador hacia adelante (Forward) abarcó desde 50 pb hasta 200 pb, el oligonucleótido iniciador reverso (Reverse) abarcó desde 853 pb hasta 950 pb del gen.

Oligonucleótido *amiEF*: 5' GTA GGG GCA TTC CGA CAT CC 3'

<b>Longitud</b>	20	<b>Pureza</b>	NO	<b>NanodropA(260)</b>	60.601
<b>Volumen (µl)</b>	500	<b>OD's totales</b>	22.4	<b>Conc. (µg/µl)</b>	1.48
<b>C + G (%)</b>	60.00	<b>Tm (1)</b>	68.2	<b>Tm (2)</b>	64.0
<b>p.m</b>	6600	<b>picomol/µl</b>	224.0		

**Tabla 3.** Características del oligonucleótido *amiEF*

Oligonucleótido *amiER*: 5' GGC CTC GAT CTC GTG ATC TTC 3'

<b>Longitud</b>	21	<b>Pureza</b>	NO	<b>NanodropA(260)</b>	73.166
<b>Volumen (µl)</b>	500	<b>OD's totales</b>	26.63	<b>Conc. (µg/µl)</b>	1.76
<b>C + G (%)</b>	57.14	<b>Tm (1)</b>	68.1	<b>Tm (2)</b>	66.0
<b>p.m</b>	6930	<b>picomol/µl</b>	253.7		

**Tabla 3.** Características del oligonucleótido *amiER*

Los oligonucleótidos se prepararon para tener una concentración de 10 µM= 10 pmol/µL.

#### Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 se sembraron cuatro placas de cada cepa en medio MMS y se incubaron durante 7 días a 30°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se recuperaron las células mediante lavados con MgSO<sub>4</sub> al 10 mM. Se utilizó el protocolo establecido en el kit de Jena Bioscience *Bacteria DNA Preparation*.

#### Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR)

Las condiciones de la reacción de la PCR fueron las siguientes; temperatura de desnaturalización 95° C por 3:00 minutos; temperatura de alineamiento a 57 ° C por 0:45 minutos; temperatura de extensión a 72° C por 10 minutos, se programaron 30 ciclos.

#### Purificación de producto de PCR

Se utilizó el protocolo establecido por el Kit de Jena Bioscience *PCR Purification*.

### Secuenciación del gen *amiE*

El amplificado del gen *amiE* (756 pb) se envió a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM, campus Cuernavaca. Se cuantificó por nanodrop la concentración del amplificado del gen *amiE* purificado. La mezcla DNA-Oligo fue de un volumen final de 16 µl: 10 pmol/µL de oligonucleótido y 120 ng del amplificado.

### Análisis estadístico

Se emplearon los programas GraphPad Prism 10 y Minitab para el análisis estadístico de los datos obtenidos en este estudio. Se analizó la normalidad de los datos. Se utilizó el análisis ANOVA de una vía para el ensayo de determinación de indoles; comparando la concentración de AIA (µg/ml) producida por las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23, *M. extorquens* JCM2802 y *P. putida* KT2440 a las 72 y 96 horas. Se realizó el análisis MANOVA para el análisis de los datos de población bacteriana, del experimento sobre supervivencia a hidrocarburos; se comparó el crecimiento poblacional (log de UFC/ml) de cada cepa en los tres tratamientos: 1) Tratamiento con gasolina; 2) Tratamiento con diesel y 3) Tratamiento fuente de carbono óptima (TFCO) con el tiempo de crecimiento (0, 24, 48, 72 y 96 horas) de cada tratamiento. También se comparó el crecimiento poblacional de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23, *M. extorquens* JCM2802 y *P. putida* KT2440, con la misma fuente de carbono (gasolina o diesel) a lo largo de tiempo de crecimiento (0, 24, 48, 72 y 96 horas).



## RESULTADOS

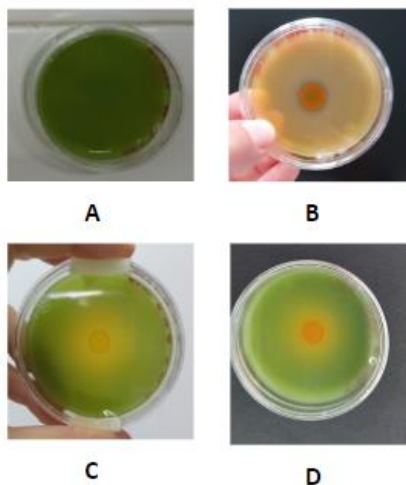
### Capacidades bioquímicas tipo PGPR

Los resultados obtenidos de la evaluación de las capacidades bioquímicas tipo PGPR de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23, *Methylobacterium extorquens* JCM2802 y *Pseudomonas putida* KT2440 fueron las siguientes:

La cepa *P. putida* KT2440 fue la más eficiente en cuanto a la solubilización del fosfato tricálcico como se observa en la Figura 3 por la presencia de un halo de solubilización transparente y con promedio de diámetro de 2.5 mm (Tabla 5). Sin embargo, las cepas *Methylobacterium* presentaron una solubilización parcial del fosfato inorgánico con acidificación del medio del cultivo formando un halo de solubilización opaco (Figura 3) y de un diámetro de 1.6 mm en la cepa *Methylobacterium* UAPS01-23 y de 1.2 mm en *M. extorquens* JCM2802 (Tabla 5).

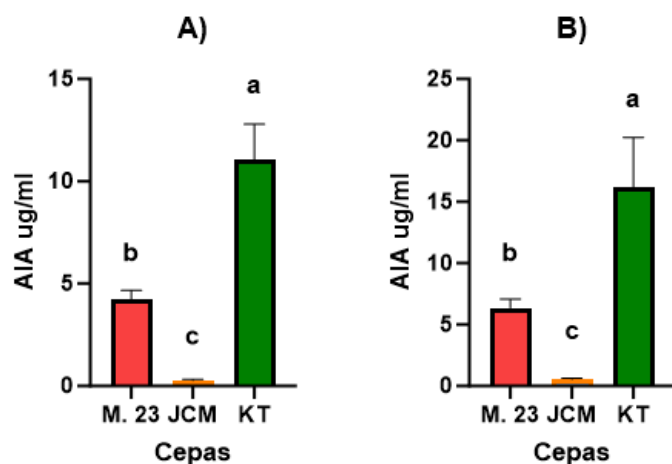
Cepas	Diámetro Halo
<i>P. putida</i> KT2440	2.5 mm
<i>Methylobacterium</i> UAPS01-23	1.6 mm
<i>M. extorquens</i> JCM2802	1.2 mm

**Tabla 5.** Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfatos de las tres cepas después de 7 días de incubación.



**Figura 3.** Capacidad de solubilización de fosfato inorgánico. El control negativo corresponde al inciso A, *P. putida* KT2440 corresponde a B, *Methylobacterium* UAPS01-23 corresponde a C y *M. extorquens* JCM2802 corresponde a D.

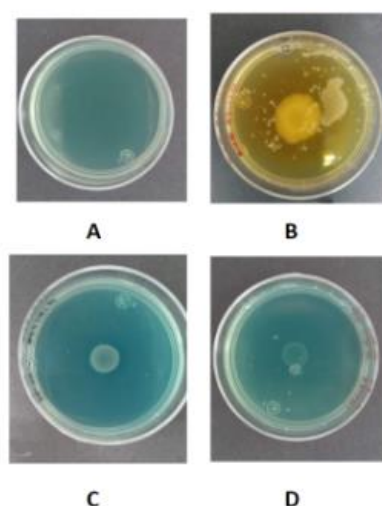
En la producción de compuestos indólicos totales a las 72 horas de crecimiento bacteriano se observó que la cepa *P. putida* KT2440 presentó un promedio de 11.043 µg/ml de indoles totales *Methylobacterium* UAPS01-23 produjo 4.228 µg/ml indoles totales y *M. extorquens* JCM2802 0.269 µg/ml indoles totales (Gráfico 1). La cepa con mayor producción de indoles totales a las 96 horas de crecimiento fue *P. putida* KT2440 con un promedio de 15.523 µg/ml de indoles totales, en segundo lugar, la cepa *Methylobacterium* UAPS01-23 produjo 6.366 µg/ml AIA y *M. extorquens* JCM2802 0.554 µg/ml indoles totales (Gráfico 1). Con esta determinación se observó que la cepa *M. UAPS01-23* es más eficiente para la producción de indoles en comparación a *M. extorquens* JCM2802, la producción de indoles totales en estas dos cepas presentó una diferencia estadísticamente significativa a las 72 ( $F_{DF2} (2,9) = 109.1$   $p = 0.0001$ ) y 96 horas ( $F_{DF2} (2,9) = 43.23$   $p = 0.0001$ ).



**Gráfico 1.** Producción de Indoles. Se muestra la producción de ácido indolacético (AIA), KT corresponde a *P. putida* KT2440; M. 23 corresponde a la cepa *Methylobacterium* UAPS01-23 y JCM corresponde a *M. extorquens* JCM2802. A) corresponde a la determinación de indoles a las 72 horas y B) corresponde a la producción de AIA a las 96 horas de crecimiento de las tres cepas. Las diferentes letras representan una

diferencia estadísticamente significativa entre las cepas con un nivel de confianza del 95%.

Para la evaluación de la producción de sideróforos se observó que *P. putida* KT2440 fue capaz de producir sideróforos de tipo hidroxamato, sin embargo, *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 carecen de la producción sideróforos con el ensayo O-CAS modificado, bajo las condiciones establecidas de esta metodología para la determinación de sideróforos en este trabajo (Figura 4).



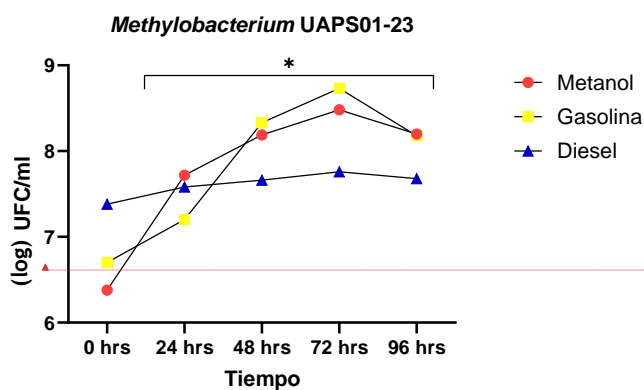
**Figura 4.** Producción de Sideróforos. El control negativo corresponde al inciso A, *P. putida* KT2440 corresponde a B, *Methylobacterium* UAPS01-23 se representa con C y *M. extorquens* JCM2802 corresponde a D.

### Supervivencia a hidrocarburos

Los resultados obtenidos de la evaluación de la supervivencia a hidrocarburos (gasolina y diesel) de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23, *Methylobacterium extorques* JCM2802 y *Pseudomonas putida* KT2440 fueron las siguientes:

La gráfica 2 muestra el crecimiento bacteriano de *Methylobacterium* UAPS01-23 a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas en los tres tratamientos con diferentes fuentes de carbono. El tratamiento con metanol inició con una población de 6.38 (log) de UFC/ml a las 0 horas, y a las 96 horas la población bacteriana incrementó a 8.2 (log) de UFC/ml, presentó una

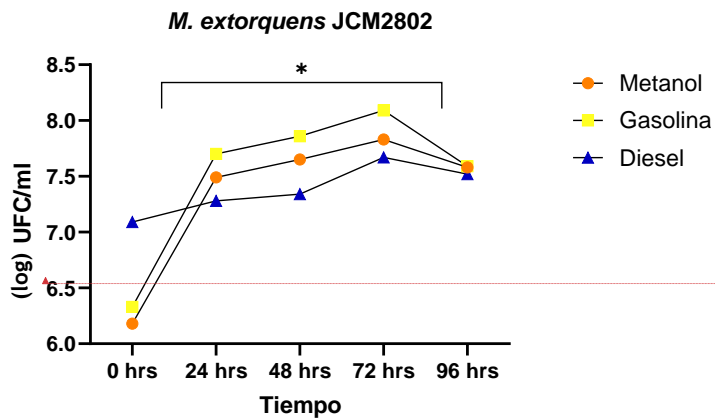
mayor población a las 72 horas (8.48 log de UFC/ml). El tratamiento con una concentración de 300 ppm de gasolina presentó un pico de crecimiento a las 72 horas con 8.73 (log) de UFC/ml. Por otro lado, el crecimiento con diesel se mantuvo constante durante las 96 horas de cultivo ( $7.3 \pm 0.03$  log de UFC/ml). Se realizó el análisis estadístico MANOVA y se encontró que existe una diferencia significativa entre las fuentes de carbono a las 24 ( $F_{DF2} (2,6) = 5.32, p= 0.047$ ), 48 ( $F_{DF2} (2,6) = 6.34, p=0.033$ ), 72 ( $F_{DF2} (2,6) = 19.44, p=0.002$ ) y 96 horas ( $F_{DF2} (2,6) = 9.42, p=0.014$ ).



Con formato: Fuente: Negrita

**Gráfico 2.** Crecimiento de *Methylobacterium* UAPS01-23 con diferentes fuentes de carbono. Tratamiento con metanol como fuente de carbono (Metanol), tratamiento con gasolina (Gasolina) y Tratamiento con diesel (diesel) como fuentes de carbono únicas. \*Diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes fuentes de carbono con un nivel de confianza del 95%.

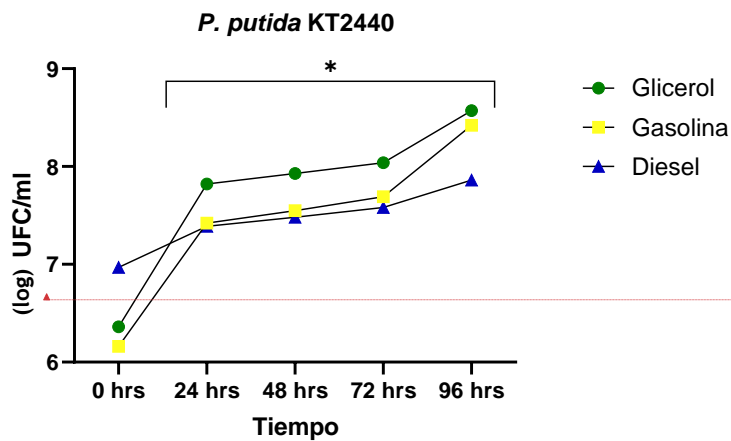
La gráfica 3 muestra el crecimiento bacteriano de *M. extorquens* JCM2802 a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas con diferentes fuentes de carbono. La fuente de carbono que reportó mayor población bacteriana fue la gasolina a una concentración de 300 ppm, donde se observó una población de 8.09 (log) de UFC/ml a las 72 horas, la cepa presentó un crecimiento máximo de 7.83 (log) de UFC/m a las 72 horas con metanol como fuente de carbono. En cuanto al tratamiento con Diesel, a una concentración de 300 ppm, la población bacteriana se mantuvo constante (orden de magnitud 7). Se realizó el análisis estadístico MANOVA y se encontró que existe una diferencia significativa entre las fuentes de carbono a las 24 ( $F_{DF2} (2,6) = 19.93, p=0.002$ ), 48 ( $F_{DF2} (2,6) = 11.58, p=0.009$ ) y 72 horas ( $F_{DF2} (2,6) = 5.36, p=0.046$ ), sin embargo, a las 96 horas no se reportó diferencias significativas entre las fuentes de carbono ( $F_{DF2} (2,6) = 0.84, p=0.477$ ).



Con formato: Fuente: Negrita

**Gráfico 3.** Población de *Methylobacterium extorquens* JCM2802 con diferentes fuentes de carbono. Tratamiento con metanol como fuente de carbono (Metanol), tratamiento con gasolina (Gasolina) y tratamiento con diesel (Diesel) como fuentes de carbono únicas. \*Diferencia significativa entre los tratamientos con diferentes fuentes de carbono con un nivel de confianza del 95%.

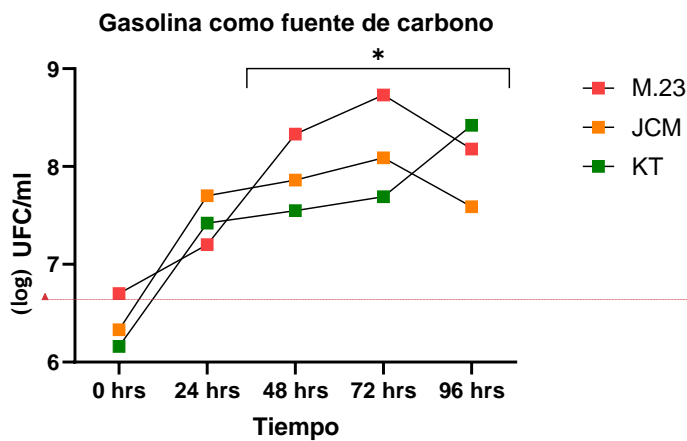
La grafica 4 muestra el crecimiento bacteriano de *P. putida* KT2440 a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas con diferentes fuentes de carbono. El tratamiento con mayor crecimiento bacteriano fue el control positivo cuya fuente de carbono utilizada fue el glicerol con una población de 8.64 (log) de UFC/ml a las 96 horas. Los tratamientos cuya fuente de carbono fueron diesel y gasolina presentaron un crecimiento bacteriano menor en comparación con el glicerol, con una población de 7.86 (log) de UFC/ml y 8.42 (log) de UFC/ml respectivamente a las 96 horas. Se realizó el análisis estadístico MANOVA y se encontró que existe una diferencia significativa entre las fuentes de carbono a las 24 ( $F_{DF2} (2,6) = 8.10, p=0.020$ ), 48 ( $F_{DF2} (2,6) = 25.00, p=0.001$ ), 72 ( $F_{DF2} (2,6) = 11.71, p=0.008$ ) y 96 horas ( $F_{DF2} (2,6) = 9.56, p=0.014$ ).



Con formato: Fuente: Negrita

**Gráfico 4.** Población de *Pseudomonas putida* KT2440 con diferentes fuentes de carbono durante 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Tratamiento con glicerol como fuente de carbono (Glicerol), tratamiento con gasolina (Gasolina) y tratamiento con Diesel (Diesel) como fuentes de carbono únicas. \*Diferencia significativa entre los tratamientos con diferentes fuentes de carbono con un nivel de confianza del 95%.

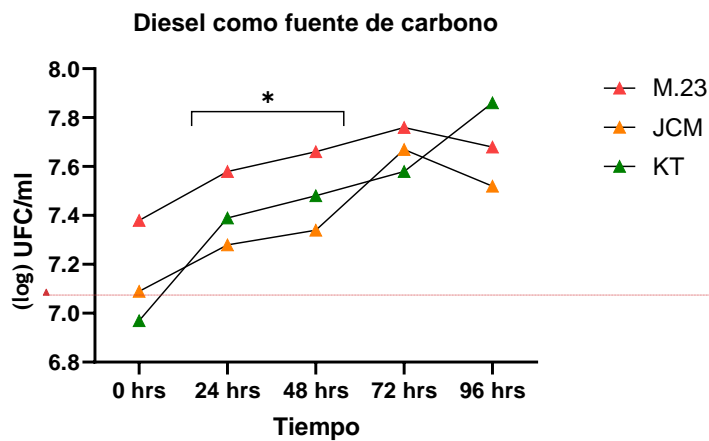
La cepa *Methylobacterium* UAPS01-23 presentó el mayor crecimiento bacteriano en medio con gasolina como única fuente de carbono. Las dos cepas metilotróficas alcanzaron el pico máximo de población a las 72 horas. *P. putida* KT2440 fue la cepa que presentó menor población en medio con gasolina, sin embargo, a las 96 horas se observó un incremento del crecimiento en un orden de magnitud (gráfica 5). El análisis estadístico MANOVA de una vía determinó que existe una diferencia significativa entre las cepas bacterianas a las 48 ( $F_{DF2} (3,5) = 11.46, p=0.011$ ), 72 ( $F_{DF2} (3,5) = 12.98, p=0.009$ ) y 96 horas ( $F_{DF2} (3,5) = 27.12, p=0.002$ ), sin embargo, a las 24 horas no se encontró una diferencia significativa entre las cepas bacterianas ( $F_{DF2} (3,5) = 2.49, p=0.175$ ) en medio con gasolina como única fuente de carbono.



Con formato: Fuente: Negrita

**Gráfico 5.** Población bacteriana de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 (M.23), *M. extorquens* JCM2802 (JCM) y *P. putida* KT2440 (KT) en medio suplementado con gasolina (como única fuente de carbono). \*Diferencia significativa entre las cepas en medio con gasolina con un nivel de confianza del 95%.

Así mismo, la cepa *Methylobacterium* UAPS01-23 presentó el mayor crecimiento bacteriano en medio con diesel como única fuente de carbono, igualmente, las dos cepas metilotróficas alcanzaron el pico máximo de población a las 72 horas, y se observó un incremento en la población de *P. putida* KT2440 a las 96 horas (gráfica 6). El análisis estadístico MANOVA determinó que existe una diferencia significativa entre las cepas bacterianas a las 24 ( $F_{DF2} (2,6) = 5.55, p=0.046$ ) y 48 horas ( $F_{DF2} (2,6) = 8.38, p=0.018$ ), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a las 72 ( $F_{DF2} (2,6) = 1.83, p=0.239$ ) y 96 horas ( $F_{DF2} (2,6) = 2.31, p=0.180$ ).



Con formato: Fuente: Negrita

**Gráfico 6.** Población bacteriana de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 (M.23), *M. extorquens* JCM2802 (JCM) y *P. putida* KT2440 (KT) en medio suplementado con Diesel (como única fuente de carbono). \*Diferencia significativa entre las cepas en medio con diesel con un nivel de confianza del 95%.

### Oligonucleótidos

En este trabajo se buscó la secuencia del gen *amiE* de la cepa *M. extorquens* DM4 (Figura 2) en la base de datos NCBI y se realizó un análisis BLAST a partir de 28 secuencias de *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) depositadas en la plataforma NCBI (Figura 5). Se identificó la región conservada del gen *amiE*, que incluye del nucleótido 50 al nucleótido 950 cuyo tamaño es de 953 pb en todas las secuencias analizadas.



### Distribution of the top 28 Blast Hits on 28 subject sequences

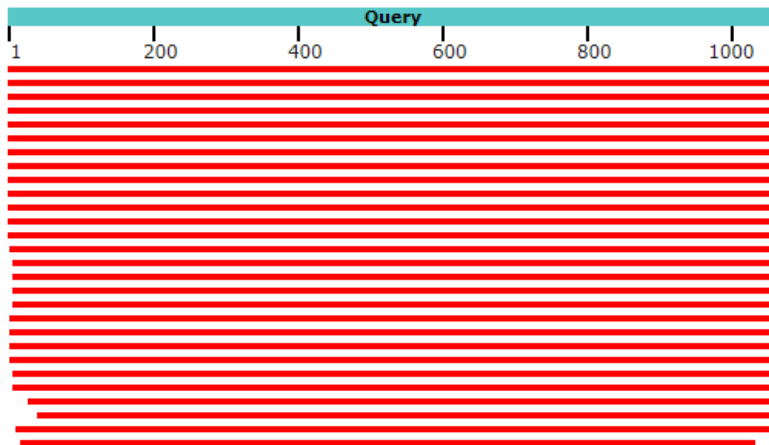


Figura 5. BLAST del gen *amiE* a partir de 28 secuencias depositadas en la plataforma NCBI.

Se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación parcial del gen *amiE* de la región conservada, cuya secuencia fue la siguiente: oligonucleótido *amiEF*: 5' GTA GGG GCA TTC CGA CAT CC 3'; oligonucleótido *amiER*: 5' GGC CTC GAT CTC GTG ATC TTC 3'.

Inicialmente se realizó la PCR de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 en un gradiente de temperatura de alineamiento (Figura 6 y 7), para identificar la temperatura que permitiera una amplificación con mayor cantidad y calidad del producto. Se observó que la temperatura idónea fue 57°C (Figura 8) para la amplificación del gen *amiE* en ambas cepas.

Con estos oligonucleótidos se realizó la reacción en cadena de la polimerasa punto final, cuyo resultado fue la amplificación de un fragmento de 756 pb del gen *amiE* de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802.

## Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR) del gen *amiE*

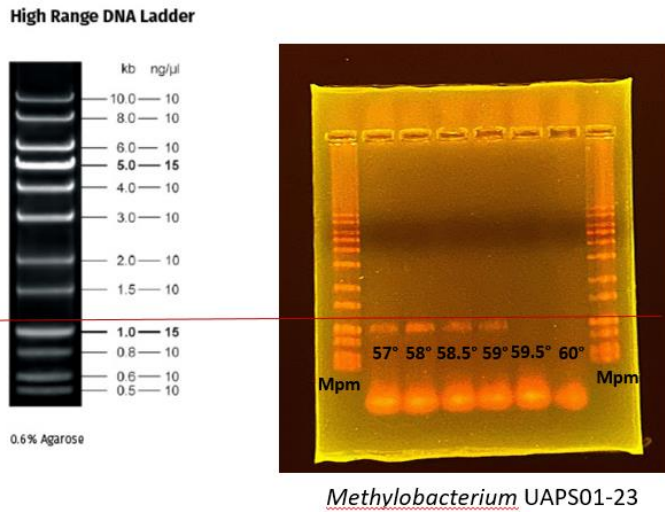


Figura 6. Electroforesis de la PCR del gen *amiE* en *Methylobacterium* UAPS01-23: Amplificación con gradiente de temperatura de fusión ( $T_m$ ) 57, 58, 58.5, 59, 59.5 y 60°C. Mpm corresponde al marcador de peso molecular.

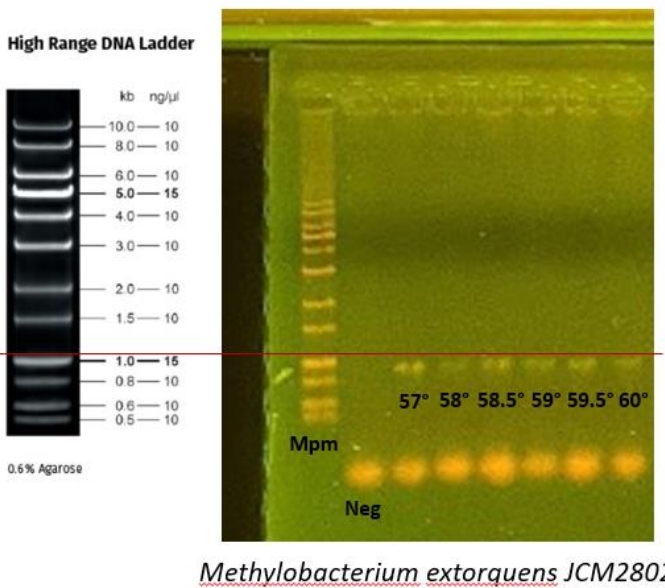
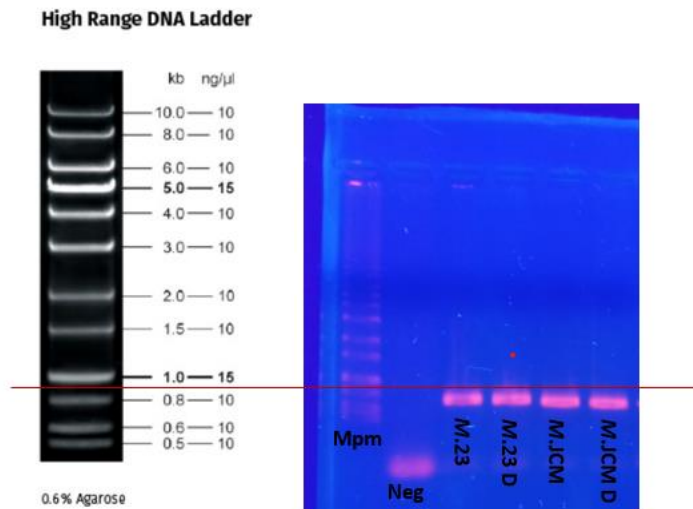


Figura 7. Electroforesis de la PCR del gen *amiE* en *Methylobacterium extorquens* JCM2802: Amplificación con gradiente de temperatura de fusión ( $T_m$ ) 57, 58, 58.5, 59, 59.5 y 60°C. Mpm corresponde al marcador

de peso molecular y Neg corresponde al control negativo (sin DNA).



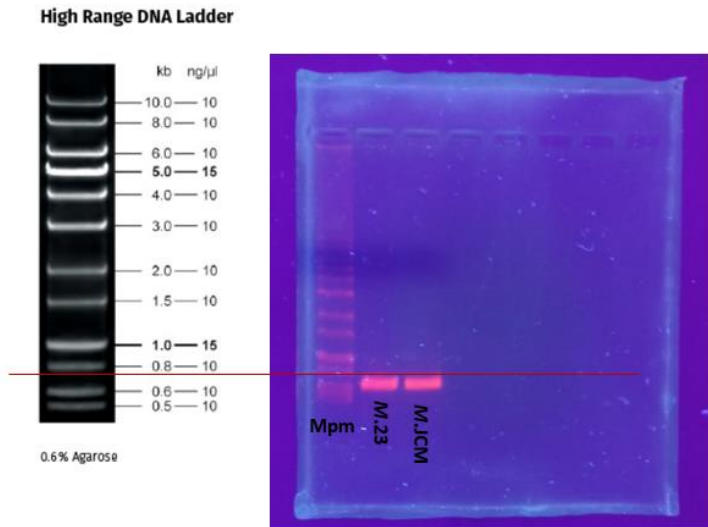
**Figura 8.** Electroforesis de la PCR del gen *amiE* en *Methylobacterium* UAPS01-23 y *Methylobacterium extorquens* JCM2802: Amplificación con una Tm de 57°C y un volumen de 70 µl. La D corresponde al duplicado de la muestra.

Los productos purificados de 756 pb correspondientes a la amplificación parcial de la región conservada del gen *amiE* de ambas cepas (Figura 9), se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM, campus Cuernavaca.

Con las secuencias obtenidas a partir de la amplificación parcial del gen *amiE* de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 (Figura 11), se realizó un análisis BLAST de nucleótidos con las secuencias de las cepas *Methylobacterium extorquens* TK0001, *Methylobacterium extorquens* DM4 y *Methylobacterium populi* (Figura 10), que presentan mayor porcentaje de identidad de la secuencia nucleotídica, y que están depositadas en la plataforma NCBI.

El amplicón del gen *amiE* de la cepa *Methylobacterium* UAPS01-23 presentó una cobertura (Query Cover) del 65% y un porcentaje de identidad con las cepas *M. extorquens* DM4, *M. extorquens* TK001 y *M. populi* del 93% al 95%. Por otro lado, la cepa *M. extorquens* JCM2802 presentó una cobertura del gen *amiE* (Query Cover) del 65% al 67% y un porcentaje de identidad con las cepas mencionadas anteriormente, que va

desde el 93% hasta el 100% (Tabla 6).



**Figura 9.** Electroforesis del producto purificado del gen *amiE* en *Methylobacterium* UAPS01-23 y *Methylobacterium extorquens* JCM2802.

**Figura 10.** Secuencias de *Methylobacterium* spp. con mayor porcentaje de identidad con *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802.

**F10A.** Gen *amiE* >LT962688.1:2141942-2142994 *Methylobacterium extorquens* cepa TK 0001, genome assembly, chromosome:

```

ATGATGCACGGTGATATCTCGTCGAGTCAGGACAGCGTCGGCGTCGCCGTCGTGAACTACAAGATGCCCC
GGCTGCACACCAAGGCCGAGGTGCTGAAAACGCCAAGAAGATCGGCGACATGATCATCGGGATGAAGGC
CGGTCTGCCGGGCTCGATCTCGTGATCTTCCCGAATACTCGACCCACGGCATCATGTACGACGCGGGC
GAGATGTACGAGACTGCCTCCTCCATCCCCGGTGC GGAGACTGACATCTTCGCCGACGCGTGC CGCAAGG
CCAAGGTCTGGGGTGTGTTCTCACTCACCGGCGAGCGCCACGAGGAGCATCCGCGCAAAGCCCCCTACAA
CACGCTCATCCTGATGAACACCAGGGCGAGATCGTGCAGAAGTACC GCAAGATCATGCCCTGGACCCCG
ATCGAGGGCTGGTATCCCGGAGACCCACCTACGTCTCGGATGGCCCCGAAGGGCCTCAAGATCAGCCTGA
TCATCTGCGACGACGGCAACTATCCCGAGATCTGGCGGACTGCGCGATGCGCGGCGCCGAACATCATCAT
CCGCTGCCAGGGCTACATGTATCCGGCCAAGGAACAGCAGGTTCTGATCTCGAAGGCGATGGCATTGCC
AACAATACCTACGTCGCGGTGGCCAACGCGCGGCTTCGACGGCGTCTACAGCTATTTCCGGTCACTCGG
CGATCATCGGCTTCGACGGCCGAGCTGGGCGAGTGC GGCGAGGAGAGATGGGCATCCAGTACGCCGC
ACTCTCGAAGTTCTGATCCGCGATTTCCGCGCCACGGCCAGTCGGAGAACCACCTTTCAAGTGCTG
CACC GCGGCTACACCGGCATGATCAACTCGAAGGAGAACCGGCACGGGATGTCGGAATGCCCTACGACT
TCTACCGTCGATCGAGACCCCGACGGCACCCGCGACGCGGTGCGGCCATCACCGCTCCAGCGT
CGGCACCGAGGAATGCCCGATCGAGGCATCCCTTCGTGCGCAAGGGCGAGGGCCCGCCGACCCGCGC
TGA

```

**F10B.** Gen *amiE* >FP103042.2:4103175-4104227 *Methylobacterium extorquens* DM4 genome assembly

TTAGCGCGGGTCGGGTGGGCCTTCGCCCTTGCCGACGAAGGGGATGCCCTCGATCGGACATTCTCGGTG  
CCGACGCTGGAGCGGGTGATGGCGCGCACCGCTCGCGGGTGCCGTGGGGTCTCGATCCAGCGCGGT  
AGAAGTCGTAGGGGCATTCCGACATCCCGTGCCTGTTCTCCTTCGAGTTGATCATGCCGGTGTAGCCGCG  
GTGCAGCAGCTTGAAGAGGTGGTTCTCCGACTGGCCGTGGCGCGGAAATCGGGATCAGGAACTTCGAG  
AGTGCGGCGTACTGAATGCCATCTCCTCCTCGCCGACTCGCCAGCGTCCGACCGTGAAGCCGATGA  
TCGCCGAGTGTCCGAAATAGCTGTAGACGCCGTGAAGCCGGCGGCTTGGCGACTGCTACGTAGGTATT  
GTTGGCGAATGCCATCGCCTTTGAGATCAGAACCTGCTGTTCTTGGCCGGATACATGTAGCCCTGGCAG  
CGGATGATGAGTTCGGCGCCGCGCATCGCGCAGTGCGCCAGATCTCGGGATAGTTGCCGTGTCGCGAGA  
TGATCAGGCTGATCTTGAAGCCCTTCGGTCCATCCGAGACGTAGGTGCGGTGCGCCGGATACCAAGCCCTC  
GATCGGGTCCAGGGCATGATCTTGCGGTACTTCTGCACGATCTGCCCTGGTCTCATCAGGATGAGC  
GTGTTGTAGGGAGCTTTGCGCGGATGCTCCTCGTGACGCTCGCCGGTGAAGCAGAACACGCCCCAGACCT  
TGGCCTTGGCGAGCGTGGCGAAGATGTCGGTCTCGCACCGGGATGGAGGAGCGGTCTCGTACAT  
CTCGCCCGCTGTACATGATGCCGTGGGTGAGTATTGGGGAAGATCACGAGATCGAGGCCCGCGAGA  
CCGGCCTTCATCCCGATGATCATGTCGCCGATCTTCTTGGCGTTTCCAACACCTCGGCCTTGGTGTGCA  
GCCGGGGCATCTTGTAGTTCACGACGGCGACGCCGACGCTGTCTGACTCGACGAGATATCACCGTGCAT  
CAT

**F10C.** Gen *amiE* >AP014809.1:3905576-3906628 *Methylobacterium populi* DNA, complete genome

TCAGCGCGGGTCGGGCGGGCCCTCGCCCTTGCCGACGAAGGGGATGCCCTCGATCGGGCATTCTCGGTG  
CCGACGCTGGACCGCGTGGTGGCGCGCACCGCTCGCGGGTGCCGTGGGGTCTCGATCCAGCGCGGT  
AGAAGTCGTAGGGGCATTCCGACATCCCGTGCCTGTTCTCCTTCGAGTTGATCATGCCCGTGTAGCCGCG  
GTGCAGCAGCTTGAAGAGGTGGTTCTCCGACTGGCCGTGGCGCGGAAATCGCGGATCAGGAAATTCGAG  
AGCGCCGCGTACTGGATGCCATCTCCTCCTCGCCGACTCGCCGAGCGTGGCGCGTGAAGCCGATGA  
TCGCCGAGTGGCGAAATAGGAGTAGACGCCGTGAAGCCAGCGGATTTGGCCACCGCGACGTAGGTGTT  
GTTGGCGAACGCCATCGCCTTCGAGATCAGGACCTGCTGCTCCTTGGCCGGTACATGTAGCCCTGGCAG  
CGGATGATCAGCTCGGCCCGCGCATGGCGCAGTGCGCCAGATTTGGGGTAATTGCCGTATCGCAGA  
TGATCAGGCTGATCTTACGCCCTTTGGACCGTCCGAGACGTAGGTGCGGTGCGCCGGATACCAAGCCCTC  
GATCGGGTCCAGGGCATGATCTTGCGGTACTTTGACGATCTCGCCCTGGTCTCATCAGGATGAGC  
GTGTTGTAGGGGGCCTTGGCGGATGCTCCTCGTGGCGCTCGCCGGTGAAGCAGAACACGCCCCAGACCC  
CCGCCTTGGCGAGGCATCGCGAAGATCTCGGTCTCGGCCCGGGGATGGAGGAGCGGTCTCGTACAT  
CTCGGCCGCGTGTACATGATGCCGTGGGTGAGTATTGGGGAAGATCACGAGATCGAGACCCGGCAGG  
CCGGCCTTCATCCCGATGATCATCTCGCCGATCTTCTTGGCGTTCTCGATGACCTCGGCCTTGGTGTGCA  
GGCGCGGCATCTTGTAGTTCACGACGGCCACGCCGACGCTGTCTGACTCGATGAAATATCGCCGTGCAT  
CAT

**Figura 11.** Secuencia parcial del gen *amiE* de las cepas metilotróficas utilizadas en este estudio.

**F11A.** Secuencia de 711 pb del amplificado del gen *amiE* de la cepa *Methylobacterium* UAPS01-23. En dirección 5' a 3'.

GACCGTGTAGCCGCGGTGCAGGAGCTTGAAGAGATGGTTCTCCGACTGGCCGTGGCGCGGAAATCGCGGATCAGGAATTT  
CGACAGCGCCGCTATTGGATGCCATCTCCTCCTCGCCGACTCGCCGAGCGTGGCGCGTGAAGCCGATGATCGCCGA  
GTGGCCGAAATAGGAGTAGACGCCGTGAAGCCGGCGGCTTGGCCACCGCGACGTAGGTGTTGTTGGCGAACGCCATCGC  
CTTCGAGATCAGGACCTGCTGTTCTTGGCCGGTACATGTAGCCCTGGCAGCGGATGATCAGCTCGGCCCGCGCATGGC

GCAGTCGCGCCAGATCTCGGGATAGTTGCCGTCGTCGCAGATGATGAGGCTGATCTTCAGCCCTTCGGACCGTCCGAAAC  
GTAGGTGCGGTGCGCCGGATACCAGCCCTCGATCGGGTCCAGGGCATGATCTTGCGGTATTTCTGGACGATCTCGCCCTG  
GTCGTTATCAGGATGAGGGTGTGTAGGGCGCTTTCGCGGGATGCTCCTCGTGGCGCTCGCCGGTGAAGGAGAACACGCC  
CCACACCTTGGCTTTCGCGCAGGCGTCGGCGAAGATCTCGGTCTCCGCACCGGGACGGACGAGGCGGTCTCGTACATCTC  
GGCCGCGTCGTACATGATGCCGTGGTTCGAGTATTTCGGGAAGTCMGA AAAARGGRRSMMCA

**F11B.** Secuencia de 716 pb del amplificado del gen *amiE* de la cepa *Methylobacterium* UAPS01-23. En dirección 3' a 5'.

TCTACGACGCGCCGAGATGTACGAGACCGCCTCGTCCGTCCTCCCGGTGCGGAGACCGAGATCTTCGCCGACGCCTGCCGCA  
AGGCCAAGGTGTGGGGCGTGTTCGCTCACCGCGAGCGCCACGAGGAGCATCCGCGCAAAGCGCCCTACAACACCTCA  
TCCTGATGAACGACCAGGGCGAGATCGTCCAGAAATACCGCAAGATCATGCCCTGGACCCCGATCGAGGGTGGTATCCCG  
GCGACCGCACCTACGTTTCGGACGGTCCGAAGGGGCTGAAGATCAGCCTCATCATCTGCGACGACGGCAACTATCCCGAGA  
TCTGGCGGACTGCGCCATGCGCGGCGCCGAGCTGATCATCCGTCGCGAGGGTACATGTACCCGCCAAGGAACAGCAGG  
TCCTGATCTCGAAGGCGATGGGCTTCGCCAACACCTACGTCGCGGTGCGCAACGCCCGGCTTCGACGGCGTCTACT  
CCTATTTGCGCCACTCGGCGATCATGGCTTCGACGGCCGACGCTCGCGAGTGCGGCAGGAGGAGATGGGCATCCAAT  
ACGCGGCGTGTGAAAATTCCTGATCCGCGACTTCGCGCCACGGCCAGTGGAGAACCATCTTTCAAGCTCTGCACC  
GCGGCTACACGGGATGATCAACTCGAAGGAGAACCGGCACGGGATCRGRGSCCCCCMMMMMMMMMA

**F11C.** Secuencia de 713 pb del amplificado del gen *amiE* de la cepa *Methylobacterium extorquens* JCM2802). En dirección 5' a 3'.

GACGGTGTAGCCGCGTGCAGCAGCTTGAAGAGTGGTTCCTCGACTGGCCGTGGGCGGAAATCGCGGATCAGGAACTT  
CGAGAGTGCGGCTACTGGATGCCCATCTCCTCCTCGCCGCACTCGCCAGCGTCCGGCCGTGCAAGCCGATGATCGCCGA  
GTGACCGAAATAGCTGTAGACGCGCTCGAAGCGCGGCGTGGCCACCGCGACGTAGTATTGTTGGCGAATGCCATCGC  
CTTCGAGATCAGAACCTGCTGTTCTTGGCCGGATACATGTAGCCCTGGCAGCGGATGATGAGTTCGCGCCCGCGCATCGC  
GCAGTCGCGCCAGATCTCGGGATAGTTGCCGTCGTCGCAGATGATCAGGCTGATCTTGAGGCCCTTCGGGCCATCCGAGAC  
GTAGGTGCGGTCTCCGGATACCAGCCCTCGATCGGGTCCAGGGCATGATCTTGCGGTACTTCTGCACGATCTCGCCCTG  
GTCGTTATCAGGATGAGCGTGTGTAGGGGCTTTCGCGGGATGCTCCTCGTGGCGCTCGCCGGTGAAGGAGAACACACC  
CCAGACCTTGGCTTTCGCGCAGCGTCCGCGAAGATGTCAGTCTCCGCACCGGGATGGAGGAGGAGTCTCGTACATCTC  
GCCCCGCGTCGTACATGATGCCGTGGTTCGAGTATTTCGGGAAGATCACGGWWYYYMRRGGCAMA

**F11D.** Secuencia de 721 pb del amplificado del gen *amiE* de la cepa *Methylobacterium extorquens* JCM2802. En dirección 3' a 5'.

CCCGGTATATGTACGACGCGGGCGAGATGTACGAGACTGCCTCCTCCATCCCCGGTGCAGGACTGACATCTTCGCCGACG  
CGTGCCGCAAGGCCAAGGTCTGGGGTGTGTTCTCACTCACCGGCGAGCGCCACGAGGAGCATCCGCGCAAAGCCCCCTACA  
ACACGCTCATCTGATGAACGACCAGGGCGAGATCGTGCAGAAAGTACCGCAAGATCATGCCCTGGACCCCGATCGAGGGCT  
GGTATCCCGGAGACCGCACCTACGTCCTGGATGGCCGAAGGGCTCAAGATCAGCCTGATCATCTGCGACGACGGCAACT  
ATCCCGAGATCTGGCGGACTGCGCGATGCGGGCGCCGAACCTCATCATCCGCTGCCAGGGCTACATGTATCCGGCCAAGG  
AACAGCAGTTCTGATCTCGAAGGCGATGGCATTTCGCCAACATACTACGTCGCGGTGGCCAACGCCCGGCTTCGACG  
GCGTCTACAGTATTTTCGGTCACTCGGCGATCATGGCTTCGACGGCCGGACGCTGGGCGAGTGGCGGAGGAGGAGATGG  
GCATCCAGTACGCCGACTCTCGAAGTTCCTGATCCGCGATTTCGCGCCACGGCCAGTGGAGAACCACCTCTTCAAGC  
TGCTGCACCGCGGTACACCGCATGATCAACTCGAAGGAGAACCGGCACGGGATGTCGTTKGS SCCCWYMMMA

Secuencia de nucleótidos A	Secuencia de nucleótidos B	Total Score	Query Cover	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud
<i>Methylobacterium</i> UAPS01-23 (F11A)	<i>M. extorquens</i> TK001 (F10A)	1042	65%	0.0	94.03%	711
	<i>M. extorquens</i> DM4 (F10B)	1037	65%	0.0	93.89%	711
	<i>M. populi</i> (F10C)	1107	65%	0.0	95.65%	711
<i>Methylobacterium</i> UAPS01-23 (F11B)	<i>M. extorquens</i> TK001 (F10A)	1046	65%	0.0	93.93%	716
	<i>M. extorquens</i> DM4 (F10B)	1040	65%	0.0	93.79%	716
	<i>M. populi</i> (F10C)	1112	65%	0.0	95.66%	716
<i>M. extorquens</i> JCM2802 (F11C)	<i>M. extorquens</i> TK001 (F10A)	1284	66%	0.0	100.00%	713
	<i>M. extorquens</i> DM4 (F10B)	1195	66%	0.0	97.70%	713
	<i>M. populi</i> (F10C)	1031	65%	0.0	93.51%	713
<i>M. extorquens</i> JCM2802 (F11D)	<i>M. extorquens</i> TK001 (F10A)	1291	67%	0.0	99.72%	721
	<i>M. extorquens</i> DM4 (F10B)	1203	67%	0.0	97.45%	721
	<i>M. populi</i> (F10C)	1037	67%	0.0	93.20%	721

**Tabla 6.** Análisis BLAST de las secuencias nucleotídicas parciales del gen *amiE* de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 de este trabajo (Secuencia A) y las secuencias del gen *amiE* de las cepas depositadas en la base de datos NCBI (Secuencia B). Total score; longitud total del gen *amiE* alojado en la base de datos NCBI. Query Cover; Porcentaje que nuestra secuencia de estudio cubre respecto a las secuencias del gen *amiE* depositadas en la base de datos NCBI. Valor E; número de resultados esperados de calidad similar que se podrían encontrar por azar. Porcentaje de identidad; porcentaje de nucleótidos idénticos entre las secuencias analizadas. Longitud; la región del gen que se comparó con las secuencias alojadas en la base de datos NCBI.

## DISCUSIÓN

En este trabajo, se determinó la capacidad PGPR de dos aislados del género *Methylobacterium* (*Methylorubrum*), así como la aptitud de estas bacterias para resistir el estrés provocado por la presencia de derivados del petróleo como diesel y gasolina.

Una de las características PGPR identificadas de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 fue la capacidad de solubilizar el fosfato inorgánico. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por distintos autores respecto al género, *Methylobacterium extorquens* G10, *Methylobacterium extorquens* Ps2 y *Methylobacterium nodulans* ORS2060 solubilizan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  liberando entre 0.137 - 0.236 mg/L de fósforo soluble (Agafonova et al. 2013). *Methylobacterium radiotolerans* es capaz de solubilizar fosfato en medio agar-Pikosvkaya formando un halo de solubilización, fenotipo similar al que presentan las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 estudiadas en este trabajo (Longoria-Espinoza et al. 2020). También se evidenció que *Methylobacterium* sp. solubiliza de 0.5 - 3.3 mg/ml de fosfato inorgánico en medio NBRIP. Sin embargo, las mismas cepas solubilizan de 2.4 - 4.4 mg/ml de fosfato inorgánico en medio agar-Pikovskaya (Rahim et al. 2021). En este trabajo se demostró la capacidad de solubilizar fosfatos de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 de forma cualitativa, sin embargo, esta solubilización pudiera ser más eficiente en otro medio de cultivo como el Pikosvkaya similar a lo reportado por Rahim y colaboradores (2021). Por otro lado, *Pseudomonas putida* parece tener un mejor rendimiento en medio NBRIP, ya que en el trabajo de Amri y colaboradores (2023) presentó un halo de  $3.53 \pm 0.05$  mm con este medio y un halo de  $2.14 \pm 0.03$  mm cuando creció en medio PKV.

Otra propiedad PGBPR que se evaluó en este trabajo fue la biosíntesis de sideróforos. Nuestros resultados mostraron que tanto *Methylobacterium* UAPS01-23 como *M. extorquens* JCM2802 carecen de producción de sideróforos. Sin embargo, se ha evidenciado que el género *Methylobacterium* es capaz de producir sideróforos de tipo hidroxamato siendo *Methylobacterium extorquens* AR1.6/2 de las cepas más eficaces en su producción (Lacava et al. 2008). Así mismo, se evidenció mediante el ensayo agar



cromo azulol S (CAS) en medio de succinato sin  $\text{Fe}^{3+}$  que la cepa *Methylobacterium aquaticum* 22A produjo sideróforos tipo hidroxicarboxilato y encontraron en su genoma un grupo de ocho genes que codifican el sideróforo tipo estafiloferrina B (hidroxamato) (Juma et al. 2022). Por lo que la ausencia de producción de sideróforos en nuestras cepas podría ser el resultado de las condiciones en las que se realizó el ensayo O-CAS.

La producción de fitohormonas es uno de los atributos importantes de las PGPR; en este estudio reportamos que *P. putida* KT2440 produjo AIA en una concentración que se alinea con lo demostrado para el género, como se determinó para la cepa *Pseudomonas* MZ-1 que produjo 12.44 ug/ml AIA y *Pseudomonas* JN-4 19.48 ug/ml AIA: *Pseudomonas* sp. puede producir esta fitohormona en un rango de 2 a 110 ug/ml de AIA (Kumar et al. 2014). Por otra parte, la cepa *Methylobacterium* UAPS01-23 produjo una concentración de AIA similar a lo reportado en la cepa *Methylobacterium zatmanii* MS4 capaz de producir 8.473  $\mu\text{g/ml}$  de AIA, la cual al ser inoculada en plantas y semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) aumentó el porcentaje de germinación de semillas, incrementó el número de hojas y aumentó la longitud de raíces y brotes (Pattnaik et al. 2017). La cepa *M. extorquens* JCM2802 produjo una cantidad menor de AIA en comparación a las cepas *Metylobacterium* sp. que producen en un rango de 1 a 2 ug/ml de AIA, sin embargo, presenta la capacidad metabólica para producir el AIA (Rahim et al. 2021), así como las cepas *M. extorquens* JCM2805 y *M. extorquens* JCM2807 (Palberg et al. 2022).

Una problemática ambiental de suma importancia es la contaminación del suelo con el petróleo y sus derivados, por lo que la biorremediación enfocada al metabolismo bacteriano ha sido una alternativa alentadora. En *Pseudomonas* se ha descrito la capacidad de degradar productos derivados del petróleo y oxidarlos como fuente de carbono (Mehrdad et al. 2019; Zheng et al. 2018). La cepa *Pseudomonas putida* P11 presentó un crecimiento adecuado al estar expuesta a gasolina y diesel, y fue capaz de degradar estos compuestos, inclusive esta cepa reportó un crecimiento logáritmico de 1-2 órdenes de magnitud en presencia de petróleo crudo (Oluwafemi et al. 2009). En este trabajo *P. putida* KT2440 presentó menor población en presencia de gasolina y diesel como fuente de carbono, en comparación al crecimiento bacteriano de *P. putida* KT2440 cuando utilizó glicerol como única fuente de carbono.

En contraste, en este trabajo las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 reportaron mayor crecimiento bacteriano cuando la fuente de carbono fue gasolina en comparación al metanol, que es una fuente de carbono utilizada para el metabolismo metilotrófico de *Methylobacterium* (Bustillos-Cristales et al. 2017). De forma similar, en otros estudios se ha comprobado que *Methylobacterium* puede metabolizar derivados de petróleo como el aceite de motor, este compuesto fue degradado por la bacteria en un 89.5% en un periodo de 21 días (Salam et al. 2015). Así mismo, esta capacidad metabólica se verificó en otra cepa de *Methylobacterium* que degradó todos los n-alcenos alifáticos presentes en los lodos de petróleo después de 15 días (Zakuan et al. 2023). La cepa *Methylobacterium radiotolerans* N7A0 degrada y utiliza naftalina, un hidrocarburo aromático, como única fuente de carbono y energía, presentando un crecimiento de 5.2 (log) de UFC/ml a los 14 días. Esta cepa de *Methylobacterium*, también creció en presencia de benceno, tolueno, fenol, salicilato, catecol y antraceno con una población menor a lo reportado con naftalina (Nzila et al. 2016).

Cabe resaltar, que en las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802 de este trabajo, se observó mayor población bacteriana en presencia de gasolina (fuente de carbono) en contraste, la población bacteriana fue menor en el medio de cultivo con diesel como fuente de carbono, donde observamos que la población se mantuvo constante en el mismo orden de magnitud a lo largo del experimento. Ese resultado sugiere que la bacteria puede sobrevivir ante la presencia de diesel. Podemos sugerir que *Methylobacterium* spp. (*Methylorubrum* spp.) no ocupa este hidrocarburo como fuente de carbono, puesto que no se observa un incremento de la población bacteriana. Esto podría deberse a la diferencia del porcentaje de compuestos aromáticos de estas sustancias, ya que la gasolina (39%) tiene un mayor porcentaje de hidrocarburos aromáticos con respecto al diesel (25%) (Prince et al. 2007; Huth & Helios, 2013).

En este trabajo nos dimos a la tarea de sustentar la capacidad de las cepas de *Methylobacterium* (*Methylobacterium*) de metabolizar diesel y gasolina, mediante la búsqueda *In silico* del gen que codifica para una enzima involucrada en la degradación

de hidrocarburos. Así mismo, se identificó una región altamente conservada de este gen en todas las secuencias del género *Methylobacterium* (*Methylorubrum*) analizadas por BLAST y se amplificó parcialmente el gen *amiE* (65-67%), lo que corrobora la presencia del gen en el genoma de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802.

Luo y colaboradores (2021) reportaron que la enzima acilamida amidohidrolasa es capaz de hidrolizar los anillos aromáticos, por lo que los resultados encontrados en este trabajo pueden sugerir que el gen *amiE* expresa esta enzima cuando las cepas crecen en medio de cultivo cuya fuente de carbono es gasolina, ya que los hidrocarburos aromáticos componen aproximadamente el 39% de este derivado del petróleo (Prince et al. 2007). Además, el crecimiento bacteriano obtenido a partir del medio de cultivo con gasolina sugiere la capacidad de utilizar a este hidrocarburo como fuente de carbono y nitrógeno, porque la acilamida amidohidrolasa hidroliza las amidas alifáticas de cadena corta y las metaboliza a su correspondiente ácido orgánico en *Pseudomonas aeruginosa* (Clamens et al. 2017).

Las amidasas presentan la capacidad de hidrólisis de las amidas de los compuestos aromáticos; además, se ha demostrado que estas enzimas participan en la biosíntesis de ácido indolacético (AIA) (Chacko et al. 2009). En la vía indol-3-acetonitrilo (IAN) se produce AIA por la actividad enzimática del sistema nitrilo hidratasa (NHase)/amidasa, donde el IAN se convierte primero en indol-3-acetamida (IAM) y luego en AIA. En la vía indol-3-acetamida (IAM) la IAM hidrolasa (amidasa, *iaaH*) produce AIA. De esta forma el sistema NHase/amidasa vincula las vías IAN e IAM (Tang et al. 2023; Zhang et al. 2019). Se ha evidenciado que *Pseudarthrobacter* sp. presentó el transcrito del gen *amiE*, lo que sugiere la síntesis de la enzima amidasa, capaz de hidrolizar indol-3-acetamida (IAM) y producir el AIA (Ham et al. 2021). En nuestros resultados, la amplificación parcial del gen *amiE* de las cepas *Methylobacterium* UAPS01-23 y *M. extorquens* JCM2802, así como la producción de ácido indolacético, podría sugerir que la amidasa alifática (*amiE*) está involucrada en la síntesis de ácido indolacético mediante la vía indol-3-acetonitrilo (IAN) o la vía indol-3-acetamida (IAM), ambas vías son dependientes de triptófano.

## CONCLUSIÓN

Concluimos que *Methylobacterium* UAPS01- 23 y *Methylobacterium extorquens* JCM2802 presentan características para la promoción del crecimiento vegetal (producen ácido indolacético y solubilizan fosfatos), que sugiere su aplicación como un modelo bacteriano con potencial PGPR. Así mismo, *Methylobacterium* UAPS01- 23 y *Methylobacterium extorquens* JCM2802 son eficientes para tolerar y crecer en condiciones de estrés por presencia de diesel y gasolina, por lo que estas cepas se pueden considerar como posibles candidatas para estudiarlas como bacterias degradadoras de hidrocarburos.

## PERSPECTIVAS

- Demostrar experimentalmente que las cepas *Methylobacterium* UAPS01- 23 y *Methylobacterium extorquens* JCM2802 expresan el gen *amiE*, cuando están expuestas a gasolina y diesel.
- Corroborar que las cepas *Methylobacterium* UAPS01- 23 y *Methylobacterium extorquens* JCM2802 utilizan como fuente de carbono a la gasolina, el diesel e hidrocarburos puros como el hexano, mediante la disminución de la concentración de estos derivados del petróleo.
- Demostrar que las cepas *Methylobacterium* UAPS01- 23 y *Methylobacterium extorquens* JCM2802 son capaces de incrementar el crecimiento vegetal en plantas.

## REFERENCIAS

- Abanda-Nkp watt, D., MÜsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M., & Schwab, W. (2006). Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *Journal of experimental botany*, 57(15), 4025–4032. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl173>
- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). *The role of microorganisms in bioremediation-A review*. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046.
- Agafonova, N.V., Kaparullina, E.N., Doronina, N.V. et al. *Phosphate-solubilizing activity of aerobic methylobacteria*. *Microbiology* 82, 864–867 (2013). <https://doi.org/10.1134/S0026261714010020>
- Amri, M., Rjeibi, M. R., Gatrouni, M., Mateus, D. M. R., Asses, N., Pinho, H. J. O., & Abbes, C. (2023). Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils. *Microorganisms*, 11(3), 783. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030783>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bechtaoui, N., Rabiou, M. K., Raklami, A., Oufdou, K., Hafidi, M., & Jemo, M. (2021). Phosphate-Dependent Regulation of Growth and Stresses Management in Plants. *Frontiers in plant science*, 12, 679916. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.679916>
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). *The rhizosphere microbiome and plant health*. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486. doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001
- 10.1016/j.tplants.2012.04.001
- Briat, J. F., Dubos, C., & Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends in Plant Science*, 20(1), 33-40.
- Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(4), 539-550.
- Chacko, S., Ramteke, P. W., & John, S. A. (2009). *Amidase from plant growth promoting rhizobacterium*. *J. Bacteriol. Res*, 1(4), 046-050.
- Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M. G., & Lidstrom, M. E. (2009). The expanding world of methylotrophic metabolism. *Annual review of microbiology*, 63, 477–499. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073600>
- Chu, F., & Lidstrom, M. E. (2016). XoxF Acts as the Predominant Methanol Dehydrogenase in the

Type I Methanotroph *Methylomicrobium buryatense*. *Journal of bacteriology*, 198(8), 1317–1325. <https://doi.org/10.1128/JB.00959-15>

Clamens, T., Rosay, T., Crépin, A., Grandjean, T., Kentache, T., Hardouin, J., Bortolotti, P., Neidig, A., Mooij, M., Hillion, M., Vieillard, J., Cosette, P., Overhage, J., O'Gara, F., Bouffartigues, E., Dufour, A., Chevalier, S., Guery, B., Cornelis, P., Feuilloley, M. G., ... Lesouhaitier, O. (2017). *The aliphatic amidase AmiE is involved in regulation of Pseudomonas aeruginosa virulence*. *Scientific reports*, 7, 41178. <https://doi.org/10.1038/srep41178>

Del Rocío Bustillos-Cristales, M., Corona-Gutierrez, I., Castañeda-Lucio, M., Águila-Zempoaltécatl, C., Seynos-García, E., Hernández-Lucas, I., Muñoz-Rojas, J., Medina-Aparicio, L., & Fuentes-Ramírez, L. E. (2017). Culturable Facultative Methylophilic Bacteria from the Cactus *Neobuxbaumia macrocephala* Possess the Locus *soxF* and Consume Methanol in the Presence of  $Ce^{3+}$  and  $Ca^{2+}$ . *Microbes and environments*, 32(3), 244–251. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17070>

Dilworth, L. L., Riley, C. K., & Stennett, D. K. (2017). Plant constituents: Carbohydrates, oils, resins, balsams, and plant hormones. In *Pharmacognosy* (pp. 61-80). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818353-3.00013-4>

Dourado, M. N., Camargo Neves, A. A., Santos, D. S., & Araújo, W. L. (2015). Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. *BioMed research international*, 2015, 909016. <https://doi.org/10.1155/2015/909016>

Egamberdieva, D., Wirth, S., Alqarawi, A. A., & Abd\_Allah, E. F. (2015). *Salt tolerant Methylobacterium mesophilicum* showed viable colonization abilities in the plant rhizosphere. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 585–590. doi:10.1016/j.sjbs.2015.06.029

Fu, L., Li, X., Xiao, X., & Xu, J. (2014). Purification and characterization of a thermostable aliphatic amidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii* CH1. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 18(2), 429–440. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0628-y>

Furuhata, K., Kato, Y., Goto, K., Hara, M., Yoshida, S.-i. and Fukuyama, M. (2006), Isolation and Identification of *Methylobacterium* Species from the Tap Water in Hospitals in Japan and Their Antibiotic Susceptibility. *Microbiology and Immunology*, 50: 11-17. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03765.x>

Ganz, T., & Nemeth, E. (2015). Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 15(8), 500–510. <https://doi.org/10.1038/nri3863>

Ginni, G., Kumar, S. A., Usman, T. M., Pakonyi, P., & Banu, J. R. (2020). Integrated biorefineries of food waste. In *Food Waste to Valuable Resources* (pp. 275-298). Academic Press.

Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and*

environmental microbiology, 61(2), 793–796. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995>

Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192

Green, P. N., & Ardley, J. K. (2018). Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(9), 2727–2748. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002856>

Green, P. N., & Bousfield, I. J. (1982). A taxonomic study of some Gram-negative facultatively methylophilic bacteria. *Microbiology*, 128(3), 623–638.

Grossi, C., Fantino, E., Serral, F., Zawoznik, M. S., Fernandez Do Porto, D. A., & Ulloa, R. M. (2020). *Methylobacterium* sp. 2A Is a Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Has the Potential to Improve Potato Crop Yield Under Adverse Conditions. *Frontiers in plant science*, 11, 71. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00071>

Ham, S., Yoon, H., Park, J. M., & Park, Y. G. (2021). Optimization of Fermentation Medium for Indole Acetic Acid Production by *Pseudarthrobacter* sp. NIBRBAC000502770. *Applied biochemistry and biotechnology*, 193(8), 2567–2579. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03558-0>

Han, Y., Zhang, Y., Xu, C., and Hsu, C. S. (2018). Molecular characterization of sulfur-containing compounds in petroleum. *Fuel* 221, 144–158. doi: 10.1016/j.fuel.2018.02.110

Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of microbiological methods*, 44(2), 121–129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)

Hernández-Mendoza, J. L., Rodríguez-Castillejos, G., Cano, E. G., Lizarazo-Ortega, C., Sánchez-Yáñez, J. M., González, S. M. C., ... & Jiménez, M. C. H. (2021). STUDY OF INDOLE-3-ACETIC ACID BIOSYNTHESIS PATHWAYS IN *Bradyrhizobium japonicum* BJBV-05. *Interciencia*, 46(5), 198–203.

Hidalgo, K. J., Sierra-García, I. N., Dellagèzze, B. M., & de Oliveira, V. M. (2020). Metagenomic Insights Into the Mechanisms for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Oil Supply Chain. *Frontiers in microbiology*, 11, 561506. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561506>

Huth, M. (2013). *Modern Gas Turbine Systems || Fuel flexibility in gas turbine systems: impact on burner design and performance*. 635–684. doi:10.1533/9780857096067.3.635

Jiang, Z. Li, J. Qu, L. (2017). *Hormone Metabolism and Signaling in Plants || Auxins*, ( ), 39–76. doi:10.1016/B978-0-12-811562-6.00002-5

Joshi, D. R., Zhang, Y., Gao, Y., Liu, Y., & Yang, M. (2017). Biotransformation of nitrogen- and sulfur-containing pollutants during coking wastewater treatment: Correspondence of

performance to microbial community functional structure. *Water research*, 121, 338–348. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.045>

Juma, P. O., Fujitani, Y., Alessa, O., Oyama, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., & Tani, A. (2022). *Siderophore for Lanthanide and Iron Uptake for Methylo-trophy and Plant Growth Promotion in Methylobacterium aquaticum Strain 22A*. *Frontiers in microbiology*, 13, 921635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.921635>

Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>

Kaur, J. (2022). Bacterial inoculants for rhizosphere engineering: Applications, current aspects, and challenges. In *Rhizosphere Engineering* (pp. 129-150). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89973-4.00004-1>

Kelly, D.P., McDonald, I.R., Wood, A.P. (2014). The Family *Methylobacteriaceae*. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1\\_256](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_256)

Kist, Jennifer; Tate, Robert L. (2013). Application of *mxoF* functional gene sequence to determine genetic relatedness among environmental *Methylobacterium* strains (PPFMs). *Soil Biology and Biochemistry*, 58(), 313–322. doi:10.1016/j.soilbio.2012.12.009

Kumar, A., Shukla, U. K., Singh, A., Poonam, A. K., Prasad, S., Singh, S. K., & Kumar, D. (2014). Evaluation of *Pseudomonas* isolates from wheat for some important plant growth promoting traits. *African Journal of Microbiology Research*, 8(27), 2604-2608. DOI:10.5897/AJMR2014.6711

Kumar, M., Tomar, R. S., Lade, H., & Paul, D. (2016). Methylo-trophic bacteria in sustainable agriculture. *World journal of microbiology & biotechnology*, 32(7), 120. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2074-8>

Kumar, M., Kour, D., Yadav, A. N., Saxena, R., Rai, P. K., Jyoti, A., & Tomar, R. S. (2019). Biodiversity of methylo-trophic microbial communities and their potential role in mitigation of abiotic stresses in plants. *Biologia*, 74, 287-308. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00190-6>

Lacava, Paulo Teixeira, Silva-Stenico, Maria Estela, Araújo, Wellington Luiz, Simionato, Ana Valéria Colnaghi, Carrilho, Emanuel, Tsai, Siu Mui, & Azevedo, João Lúcio. (2008). *Detection of siderophores in endophytic bacteria Methylobacterium spp. associated with Xylella fastidiosa subsp. Pauca*.

Lau, E., Fisher, M. C., Steudler, P. A., & Cavanaugh, C. M. (2013). The methanol dehydrogenase gene, *mxoF*, as a functional and phylogenetic marker for proteobacterial methanotrophs in natural environments. *PloS one*, 8(2), e56993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056993>

Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz,



D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic acids research*, 48(D1), D265–D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>

Luo, J., Xu, Y., Wang, J., Zhang, L., Jiang, X., & Shen, J. (2021). *Coupled biodegradation of p-nitrophenol and p-aminophenol in bioelectrochemical system: Mechanism and microbial functional diversity*. *Journal of Environmental Sciences*, 108, 134-144. doi:10.1016/j.jes.2021.02.017

Longoria-Espinoza, R. M., Félix-Gastélum, R., & Cordero-Ramírez, J. D. (2020). *Diversity of endophytic bacteria associated with tomato plants (Solanum lycopersicum)*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(2), 307-319.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthilkumar, M., Sundaram, S., & Sa, T. (2009). Nodulation and plant-growth promotion by methylophilic bacteria isolated from tropical legumes. *Microbiological research*, 164(1), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.08.009>

Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, J.-S. Lee, K.C. Lee, and S. Sundaram. 2010. *Flavobacterium glycinis* sp. nov., a facultative methylophilic bacterium isolated from the rhizosphere of soybean. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:2187–2192.

Meena, K. K., Kumar, M., Kalyuzhnaya, M. G., Yandigeri, M. S., Singh, D. P., Saxena, A. K., & Arora, D. K. (2012). Epiphytic pink-pigmented methylophilic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(4), 777–786. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9692-9>

Mehrdad, S., Saeb, K., Taghavi, L., & Ghane, M. (2019). Evaluation of the Biodegradation of Petroleum Contaminants by *Pseudomonas Aeruginosa* in the Caspian Sea Coastline Waters. *Iranian Journal of Toxicology*, 13(3), 21-26.

Morohoshi, T., & Ikeda, T. (2016). Complete Genome Sequence of *Methylobacterium populi* P-1M, Isolated from Pink-Pigmented Household Biofilm. *Genome announcements*, 4(3), e00458-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00458-16>

Nzila, A., Thukair, A., Sankara, S., Chanbasha, B., & Musa, M. M. (2016). Isolation and characterization of naphthalene biodegrading *Methylobacterium radiotolerans* bacterium from the eastern coastline of the Kingdom of Saudi Arabia. *Archives of Environmental Protection*, 42(3).

Oluwafemi S. Obayori; Sunday A. Adebosoye; Adams O. Adewale; Ganiyu O. Oyetibo; Odunola O. Oluyemi; Rashid A. Amokun; Matthew O. Ilori (2009). *Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four Pseudomonas strains*. , 21(2), 243–248. doi:10.1016/s1001-0742(08)62258-5

OECD (1992), *Test No. 301: Ready Biodegradability*, OECD Guidelines for the Testing of

Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070349-en>.

Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, 6, 745.

Palberg, D., Kisiąła, A., Jorge, G. L., & Emery, R. J. N. (2022). A survey of *Methylobacterium* species and strains reveals widespread production and varying profiles of cytokinin phytohormones. *BMC microbiology*, 22(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02454-9>

Pandiyan, Kuppusamy (2021). Microbiomes and Plant Health || Phyllosphere microbiome: modern prospectus and application., ( ), 345–366. doi:10.1016/B978-0-12-819715-8.00012-4

Pattnaik, S., Rajkumari, J., Paramanandham, P., & Busi, S. (2017). Indole acetic acid production and growth-promoting activity of *Methylobacterium extorquens* MP1 and *Methylobacterium zatmanii* MS4 in tomato. *International Journal of Vegetable Science*, 23(4), 321-330.

Parasuraman, P., Pattnaik, S., & Busi, S. (2019). Plant-microbe interactions in ecosystems functioning and sustainability. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 255-266). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00018-3>

Patel, J. S., Kumar, G., Bajpai, R., Teli, B., Rashid, M., & Sarma, B. K. (2021). PGPR formulations and application in the management of pulse crop health. In *Biofertilizers* (pp. 239-251). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821667-5.00012-9>

Patt, T. E., Cole, G. C., & Hanson, R. S. (1976). *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylophilic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(2), 226-229.

Patten, Cheryl L.; Glick, Bernard R. (1996). *Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid.*, 42(3), 207–220. doi:10.1139/m96-032

Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 127-131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>

Pigoleva, S.V., N.S. Zakharchenko, A.V. Pigolev, Y.A. Trotsenko, and Y.I. Buryanov. 2009. Influence of colonizing methylobacteria on morphogenesis and resistance of sugar beet and white cabbage plants to *Erwinia carotovora*. *Microbiology (Russia)* 45:604–609.

Prabhakar P. K. (2020). Bacterial Siderophores and Their Potential Applications: A Review. *Current molecular pharmacology*, 13(4), 295–305. <https://doi.org/10.2174/1874467213666200518094445>

Prince, R. C., Parkerton, T. F., & Lee, C. (2007). The primary aerobic biodegradation of gasoline hydrocarbons. *Environmental science & technology*, 41(9), 3316-3321.

Rahim, A. A., Ibrahim, N. A., Ishak, F. N., Mean, L. J., Ayub, N. A. M., & Fazilah, N. N. (2021, May).

*Investigation of Newly Isolated Methylobacterium sp. as Potential Biofertilizer*. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 765, No. 1, p. 012063). IOP Publishing.

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental science and pollution research international*, 23(5), 3984–3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>

Salam, L. B.; Obayori, O. S.; Raji, S. A. (2015). *Biodegradation of Used Engine Oil by a Methylophilic Bacterium, Methylobacterium Mesophilicum Isolated from Tropical Hydrocarbon-contaminated Soil*. *Petroleum Science and Technology*, 33(2), 186–195. doi:10.1080/10916466.2014.961610

Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475. <https://doi.org/10.3390/biology10060475>

Schoch CL, et al. *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford)*. 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.

Shekhar Nautiyal (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms., 170(1), 265–270. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x

Shukla, Awadhesh Kumar (2019). *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture || Ecology and Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Landscape.*, (), 1–15. doi:10.1016/B978-0-12-815879-1.00001-X

Singh, K., & Chandra, S. (2014). Treatment of petroleum hydrocarbon polluted environment through bioremediation: a review. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.1.8>

Singh, D., Thapa, S., Geat, N., Mehriya, M. L., & Rajawat, M. V. S. (2021). Biofertilizers: Mechanisms and application. In *Biofertilizers* (pp. 151-166). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821667-5.00024-5>

Singh, P., Singh, V. K., Singh, R., Borthakur, A., Madhav, S., Ahamad, A., ... & Mishra, P. K. (2020). *Bioremediation: a sustainable approach for management of environmental contaminants*. In *Abatement of environmental pollutants* (pp. 1-23). Elsevier doi:10.1016/B978-0-12-818095-2.00001-1

Skouloubris, S., Labigne, A., & De Reuse, H. (2001). *The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of Helicobacter pylori: natural evolution of two enzyme paralogues*. *Molecular microbiology*, 40(3), 596–609. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02400.x>

Smejkalová, H., Erb, T. J., & Fuchs, G. (2010). Methanol assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1: demonstration of all enzymes and their regulation. *PLoS one*, 5(10), e13001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013001>

- Srivastava, M., Srivastava, A., Yadav, A., & Rawat, V. (2019). Source and control of hydrocarbon pollution. In *Hydrocarbon Pollution and its Effect on the Environment* (p. 9). IntechOpen.
- Su, Y., Xia, S., Wang, R., & Xiao, L. (2017). Phytohormonal quantification based on biological principles. *Hormone metabolism and signaling in plants*, *13*, 431-470. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00013-X>
- Tang, J., Li, Y., Zhang, L., Mu, J., Jiang, Y., Fu, H., Zhang, Y., et al. (2023). *Biosynthetic Pathways and Functions of Indole-3-Acetic Acid in Microorganisms*. *Microorganisms*, *11*(8), 2077. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11082077>
- Thuynsma, R., Kleinert, A., Kossmann, J., Valentine, A. J., & Hills, P. N. (2016). The effects of limiting phosphate on photosynthesis and growth of *Lotus japonicus*. *South African Journal of Botany*, *104*, 244-248. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.001>
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., & Liu, X. (2021). Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. *Biology*, *10*(2), 158. <https://doi.org/10.3390/biology10020158>
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022). Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Plants*, *11*(22), 3065. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/plants11223065>
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature reviews. Microbiology*, *18*(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Truskewycz, A., Gundry, T. D., Khudur, L. S., Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Ball, A. S., & Shahsavari, E. (2019). Petroleum Hydrocarbon Contamination in Terrestrial Ecosystems- Fate and Microbial Responses. *Molecules* (Basel, Switzerland), *24*(18), 3400. <https://doi.org/10.3390/molecules24183400>
- Ustiatik, R., Nuraini, Y., & Handayanto, E. (2021). Siderophore production of the Hg-resistant endophytic bacteria isolated from local grass in the Hg-contaminated soil. *Journal of Ecological Engineering*, *22*(5). DOI [10.12911/22998993/135861](https://doi.org/10.12911/22998993/135861)
- Van Aken, B., Peres, C. M., Doty, S. L., Yoon, J. M., & Schnoor, J. L. (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*(Pt 4), 1191–1196. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02796-0>
- Van Dien, S. J., Okubo, Y., Hough, M. T., Korotkova, N., Taitano, T., & Lidstrom, M. E. (2003). Reconstruction of C(3) and C(4) metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using

transposon mutagenesis. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 3), 601–609. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25955-0>

de Vasconcellos, S. P., Crespim, E., da Cruz, G. F., Senatore, D. B., Simioni, K. C. M., dos Santos Neto, E. V., ... & de Oliveira, V. M. (2009). Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, 40(5), 574–588.

Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33–39.

Yamaguchi, I., Cohen, J. D., Culler, A. H., Quint, M., Slovin, J. P., Nakajima, M., ... & Sakagami, Y. (2010). 4.02—plant hormones. *Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology* (ed. Liu HW & Mander L.), 9–125.

Zakuan Azizi Shamsul Harumain, Mohd Azrul Naim Mohamad, Noor Faizul Hadry Nordin, & Mohd Yunus Abd Shukor. (2023). *Biodegradation of Petroleum Sludge by Methylobacterium sp. Strain ZASH*. *Tropical Life Sciences Research*, 34(2), 197–222. <https://doi.org/10.21315/tlsr2023.34.2.10>

Zhang, M., FitzGerald, K. A., & Lidstrom, M. E. (2005). Identification of an upstream regulatory sequence that mediates the transcription of *mox* genes in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 11), 3723–3728. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28243-0>

Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). *The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(7), 1411. <https://doi.org/10.3390/molecules24071411>

Zheng, Mengyuan; Wang, Weiyao; Hayes, Margaret; Nydell, Alexander; Tarr, Matthew A.; Van Bael, Sunshine A.; Papadopoulos, Kyriakos (2018). *Degradation of Macondo 252 oil by endophytic Pseudomonas putida*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 643–648. doi:10.1016/j.jece.2017.12.071

