

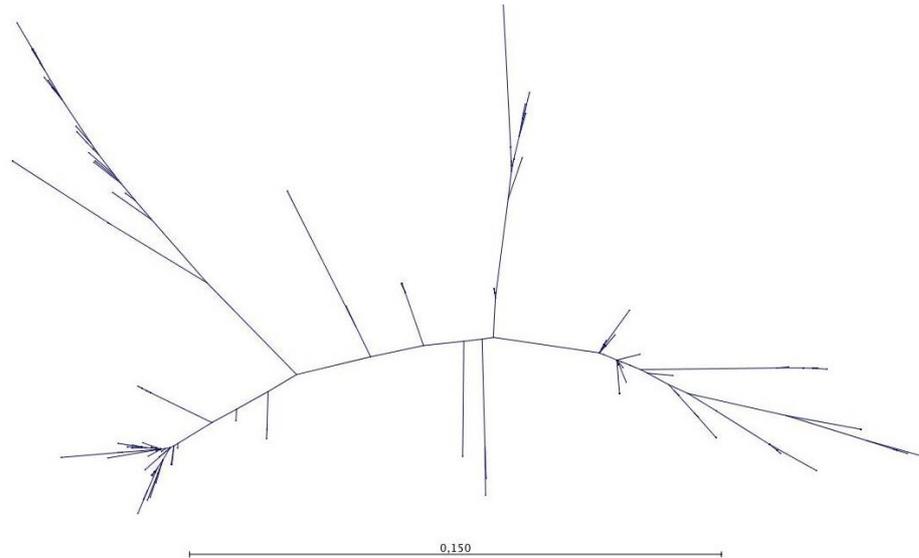
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS METILOTROFAS DE PIGMENTACIÓN ROSA.

RESUMEN.

En este trabajo se han estudiado aislamientos bacterianos que aparecieron sobre granos de arroz previamente desinfectados. Las plantas contaminadas por estas bacterias mostraron un mejor aspecto que las que no estaban contaminadas, por lo que se procedió a la caracterización polifásica de estos microorganismos. En estudios previos se habían identificado como metilobacterias (1421 y 21411), en este trabajo se han estudiado sus características bioquímicas y fisiológicas además de sus perfiles BOX. El análisis del *ADNr 16S* las ha identificado como *Methylobacterium aquaticum*. Se ha generado un árbol filogenético del grupo en el que se han incluido estas bacterias.



José Jesús Gallego Parrilla
Departamento de Microbiología,
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.
Avda. Reina Mercedes 6, 41012-Sevilla. España.



ÍNDICE

Introducción

Página 3

Objetivos

Página 6.

Material y métodos

Página 7

Resultados

Página 14

Discusión

Página 20

Conclusiones

Página 23

Agradecimientos

Página 23

Bibliografía

Página 24

INTRODUCCIÓN.

El género *Methylobacterium* propuesto por Patt *et al.*, (1970) revisado por Green & Bousfield (1983), pertenece a la clase *α -proteobacteria* e incluye a microorganismos aerobios estrictos, Gram-negativos, con forma de bacilos, de pigmentación rosa en su mayoría, con metabolismo metilotrofo facultativo (se conocen por sus siglas PPFM). Estas bacterias son capaces de crecer con compuestos de un sólo carbono como el formato, el formaldehído y el metanol, como fuentes de carbono y energía. Además pueden utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos. Las condiciones ideales para su desarrollo suelen ser 28°C y pH 7, aunque pueden variar según la especie, tolerando hasta un 2% de NaCl y un rango de pH de 5 a 9.

Estos microorganismos se pueden aislar de una enorme cantidad de ambientes como: suelo, polvo, aguas dulces o marinas, aire, ambientes hospitalarios, aires acondicionados, la filosfera, nódulos, semillas, tejidos vegetales, alimentos, cremas para la cara y productos fermentados, entre otros muchos. (Green & Bousfield, 1983) y (Veyisoglu, A. et al 2013)..

En la filosfera son la comunidad dominante (Delmotte *et al.*, 2009) donde viven gracias a la asimilación del metanol que emiten las plantas como producto de la degradación de la pectina (Fall y Benson, 1996). Son capaces de producir fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetal, favoreciendo la fijación de nitrógeno y protegiendo a la planta contra patógenos (Pérez-Montaña, et al 2014; Gallego-Parrilla *et al.*, 2013) Se habla incluso de una posible especificidad planta-bacteria, en la que ambos grupos co-evolucionan, adaptándose y desplazando a posibles patógenos mientras fomentan la producción de clorofila (Dourado, 2012).

El 22% de las bacterias cultivables tomadas de muestras estratosféricas pertenecen también a éste género. Se cree que esto se debe a la similitud entre la filosfera y la atmósfera. Aproximadamente el 90% de las bacterias del género *Methylobacterium* aisladas producen pigmentos de tipo carotenoide, con los cuales logran defenderse del daño que producen las radiaciones ultravioleta (UV). La resistencia a los rayos UV se une a la tolerancia del grupo a distintos desinfectantes (Hiraishi *et al.*, 1995) lo que la convierte en el único género con presencia en las guías del CDC (Centers for Disease Control and Prevention) sin ser un patógeno (Chosewood, 2009). Sin embargo si que puede llegar a ser un microorganismo oportunista. Algunas

bacterias aisladas en hospitales, tanto en pacientes como en superficies, fueron más tarde incluidas en el género *Methylobacterium* (Hiraishi *et al.*, 1995). El primer caso de infección fue descrito en un paciente con SIDA (Holton, 1990; Hiraishi *et al.*, 1995). Sin embargo no se han descrito muchos más casos de oportunismo.

Es conocida su presencia en nódulos (Jourand, 2004) así como su papel como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Schauer, 2011). Las PGPR son bacterias de vida libre con gran importancia agrícola y que presentan un amplio rango de beneficios relacionados con el crecimiento y la salud de las plantas. Este beneficio lo llevan a cabo suprimiendo las enfermedades causadas por patógenos, acelerando la asimilación y disponibilidad de nutrientes o incluso actuando sobre las hormonas vegetales. También pueden mejorar la tolerancia frente a situaciones desfavorables para las plantas, como: ataque de malas hierbas, estrés hídrico, estrés salino y presencia de metales pesados, entre otros.

Los mecanismos por los que benefician a las plantas incluyen antagonismo con hongos, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético (AIA), producción de ácido cianhídrico (HCN), actividad ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC), activación del sistema inmunitario de la planta (ISR) y producción de toda una batería de enzimas.

La rizosfera es la zona bajo la influencia directa de la raíz, es una zona rica en microorganismos y nutrientes que provienen de los procesos fotosintéticos de la planta. Los microorganismos que componen esa microbiota están fuertemente regulados tanto por las señales que envía la planta como por las señales que se envían ellos mismos, existe un "diálogo molecular" en toda la zona. Las PGPR colonizan esta zona incrementando en muchos casos la superficie útil de la raíz, mejorando la disponibilidad de nutrientes al alcance de la planta y pueden tener actividad antimicrobiana, lo que les permite competir con posibles patógenos de la planta. Así mismo, mejoran la fertilidad del suelo, reduciendo con ello la necesidad de fertilizantes químicos.

Las bacterias estudiadas en este trabajo fueron aisladas de la superficie de un grano de arroz (Figura 1) que habían sido previamente desinfectados para posteriores experimentos, su presencia allí se explica por su tolerancia a la desinfección. Esta resistencia es fundamental para su supervivencia en el medio natural, ya que les permite

competir con otros microorganismos. La combinación de resistencia a los rayos UV, su

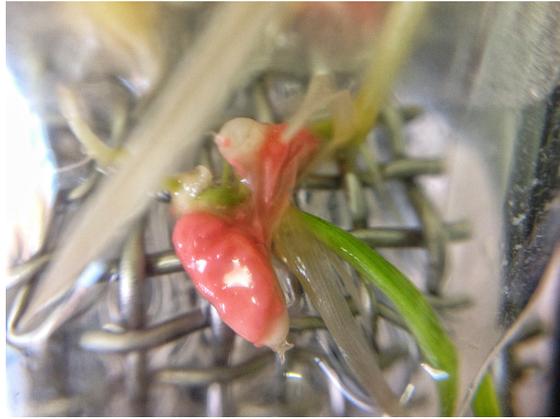


Figura 1. Grano de arroz colonizado por una PPFM

actividad promotora del crecimiento vegetal y su enorme versatilidad metabólica, le permiten aguantar largos periodos de tiempo en la superficie de las hojas o en suspensión mientras fomentan el crecimiento de la planta.



Figura 2. Aspecto de plántulas de arroz sin inocular (izquierda) frente a plántulas inoculadas con PPFM (derecha)

Muchas de las plantas que presentaban PPFM llegaban a tener mejor aspecto en los ensayos que las inoculadas con otras bacterias o los controles (figura 2), por lo que se decidió estudiar su posible papel como PGPR.

Se realizaron sucesivas resiembras para conseguir aislamientos puros de las bacterias rosa elegidas. Posteriormente, las cepas aisladas se sometieron a distintas pruebas fisiológicas y bioquímicas. Además se realizaron distintos ensayos con semillas para observar su efecto en el crecimiento de las plántulas.

Una vez logrados los cultivos puros de estas bacterias, se decidió proceder a su identificación por métodos moleculares. Para ello, se han puesto a punto técnicas de *fingerprinting* o huella genética bacteriana, concretamente la llamada BOX-PCR. También se han procesado y ajustado toda una serie de datos presentes en las bases de datos de este grupo de bacterias, para disponer de una herramienta sólida y potente con la que realizar una comparativa filogenética. Posteriormente, se ha secuenciado el gen *ADNr16S* de las cepas aisladas y se clasificaron dentro del género *Methylobacterium*, con lo que en este trabajo se propone un nuevo árbol filogenético basado en ARNr16S acorde con los datos experimentales y bibliográficos (Kato *et al.*, 2015).

OBJETIVOS.

- Caracterización fisiológica y molecular de los aislamientos de PPFM.
- Estudio de propiedades PGPR en los aislamientos y en cepas de colección.
- Identificación de las bacterias aisladas.
- Construcción de un árbol filogenético del género *Methylobacterium* donde incluir los aislamientos estudios

MATERIAL Y MÉTODOS.

Bacterias. Para la realización de este trabajo se han utilizado las bacterias que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Bacterias.

Bacteria	Características	Referencia
<i>Methylobacterium variabile</i> GR3	Colección española de cultivos tipo (CECT)	Gallego et al 2005
<i>Methylobacterium tarhaniae</i> N4211	CECT	Veyisoglu <i>et al</i> , 2013
<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16T	CECT	Gallego <i>et al</i> , 2005
21411	Aislado de rizosfera de arroz	Este trabajo
1421	Aislado de rizosfera de arroz	Este trabajo

Medios de cultivo para bacterias.

Durante la realización de este trabajo se han utilizado los medios de cultivo que se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Medios de cultivo para bacterias.

Medio	Composición	Comentarios
TYG	Triptona 5 g/L Extracto de levadura 2,5 g/L Glucosa 1 g/L Agar 20 g/L	Medio de cultivo usado para mantenimiento de estirpes.
BeGa	Polipeptona 5 g/L K ₂ PO ₄ H 1 g/L Mg ₂ SO ₄ 7H ₂ O 1 g/L Glucosa 2 g/L Agar 20 g/L	Suplementado 2% de Agar para cultivo en placa.
King B	Triptona 5 g/L Extracto de levadura 2,5 g/L Glucosa 1 g/L Agar 20 g/L	Suplementado con 1g/L de triptófano para las pruebas de AIA.

Pruebas bioquímicas y enzimáticas.

Detección de ácido indol acético (AIA).

Para detectar la producción de ácido indol-3-acético (AIA), se inoculó una colonia de cada bacteria en un tubo de ensayo con 5 ml de medio líquido King B suplementado con triptófano 1g/L (Tabla 3). El cultivo se incubó en agitación a 28°C durante 7 días. Posteriormente se centrifugó y se recogió el sobrenadante. La medida del AIA se realizó por el método de Salkowski (Sharma, 1994; Balota *et al.*, 1997 y Nair & Chandra, 1997).

La reacción se llevó a cabo en los pocillos de una placa de *microtiter*. En cada pocillo se colocaron 10 µl de muestra de cultivo y 160 µl de reactivo de Salkowski. Para cuantificar la cantidad de AIA presente en las muestras se realizó una recta de calibrado, para lo que se operó como en el caso anterior, pero en lugar de las muestras de cultivo se pusieron 10 µl de distintas disoluciones de AIA a diferentes concentraciones.

Las placas se leyeron en un lector de placas a 535 nm de longitud de onda.

Actividad proteasa.

Para detectar la actividad proteasa, se inoculó una colonia de cada bacteria sobre una placa que contenía el medio proteasa (Tabla 3). Se midieron los halos pasados 5 días.

Solubilización de fosfatos.

Para detectar la solubilización de fosfatos, se inoculó una colonia de cada bacteria sobre una placa que contenía el medio NBRIP (Tabla 3). Después de 7 días de cultivo se midieron los halos.

Actividad amilasa.

Para detectar la actividad amilasa, se inoculó una colonia de cada bacteria en una placa que contenía el medio para amilasa (Tabla 3). Después de 3 días de cultivo se revelaron las placas (Tabla 3) y se midieron los halos.

Actividad pectinasa.

Para detectar esta actividad, se inoculó una colonia de cada bacteria en una placa que contenía el medio NBRIP (Tabla 3). Se midieron los halos pasados 7 días revelando como procede (Tabla 3).

Actividad HCN.

Para detectar la producción de ácido cianhídrico (HCN), se inoculó una colonia de cada bacteria en un tubo de ensayo con 5 ml medio líquido King B con triptófano 1g/L (Tabla 3). El cultivo se incubó en agitación a 28°C durante 7 días. Posteriormente se añadió 10 µL del cultivo sobre la placa de HCN y se dejó secar. En la tapa de la placa de Petri se colocó un filtro de laboratorio y se empapó con una solución de ácido pícrico de 1,5 mL aproximadamente. Luego se selló la placa para evitar el escape de gases. Se buscó un cambio de color en el papel de filtro a los 7 días de cultivo.

Tabla 3. Medios utilizados en las pruebas bioquímicas y enzimáticas.

Medio	Composición														
Para actividad proteasa.	<table> <tr><td>Caseína</td><td>5g</td></tr> <tr><td>Extracto de levadura</td><td>2,5g</td></tr> <tr><td>Glucosa</td><td>1g</td></tr> <tr><td>Agar</td><td>20g</td></tr> <tr><td>H₂O</td><td>900mL</td></tr> </table> <p>Completar con agua destilada hasta los 900ml de medio. Ajustar el pH a 7. Esterilizar en autoclave. Añadir 100ml de solución de leche desnatada al 10%. Transcurridos 3-5 días de cultivo, se observa un halo transparente alrededor de las colonias, en un medio opaco.</p>	Caseína	5g	Extracto de levadura	2,5g	Glucosa	1g	Agar	20g	H ₂ O	900mL				
Caseína	5g														
Extracto de levadura	2,5g														
Glucosa	1g														
Agar	20g														
H ₂ O	900mL														
NBRIP	<table> <tr><td>Glucosa</td><td>10g</td></tr> <tr><td>Ca₃(PO₄)</td><td>5g</td></tr> <tr><td>MgCl₂ 6H₂O</td><td>5g</td></tr> <tr><td>MgSO₄ 6H₂O</td><td>0,25g</td></tr> <tr><td>KCl</td><td>0,2g</td></tr> <tr><td>NH₄SO₄</td><td>0,1g</td></tr> <tr><td>H₂O</td><td>1000mL</td></tr> </table> <p>Ajustar el pH a 7. El medio tiene un color blanco opaco a pH neutro. Los halos transparentes producidos por las bacterias no se suelen ver hasta pasados 4-5 días.</p>	Glucosa	10g	Ca ₃ (PO ₄)	5g	MgCl ₂ 6H ₂ O	5g	MgSO ₄ 6H ₂ O	0,25g	KCl	0,2g	NH ₄ SO ₄	0,1g	H ₂ O	1000mL
Glucosa	10g														
Ca ₃ (PO ₄)	5g														
MgCl ₂ 6H ₂ O	5g														
MgSO ₄ 6H ₂ O	0,25g														
KCl	0,2g														
NH ₄ SO ₄	0,1g														
H ₂ O	1000mL														
Medio para actividad amilasa.	<table> <tr><td>Peptona</td><td>10g</td></tr> <tr><td>NaCl</td><td>5g</td></tr> <tr><td>Extracto de carne</td><td>5g</td></tr> <tr><td>Almidón soluble</td><td>2g</td></tr> <tr><td>Agar</td><td>20g</td></tr> <tr><td>H₂O</td><td>1000mL</td></tr> </table> <p>Dejar crecer las bacterias 1-2 días y revelar inundando la placa con lugol. La placa toma un color azul violeta, se observarán halos transparentes alrededor de las colonias que muestran esta actividad.</p>	Peptona	10g	NaCl	5g	Extracto de carne	5g	Almidón soluble	2g	Agar	20g	H ₂ O	1000mL		
Peptona	10g														
NaCl	5g														
Extracto de carne	5g														
Almidón soluble	2g														
Agar	20g														
H ₂ O	1000mL														
Medio con pectina	<table> <tr><td>Na₂HPO₄</td><td>6g</td></tr> <tr><td>KH₂PO₄</td><td>3g</td></tr> <tr><td>NaCl</td><td>0,5g</td></tr> <tr><td>Pectina</td><td>7g</td></tr> <tr><td>Extracto de levadura</td><td>3g</td></tr> <tr><td>Agar</td><td>20g</td></tr> <tr><td>H₂O</td><td>1000mL</td></tr> </table> <p><u>Revelado de las placas:</u> Tras 4-5 días de crecimiento revelar con Rojo Congo al 0,1%. Inundar la placa con rojo congo y dejar a temperatura ambiente 20-30 minutos. Tirar el líquido y lavar 2-3 veces de 5 min cada una con NaCl 1M. Tirar el NaCl. Si se produce celulosa se verá un halo amarillo alrededor de la colonia, que pasado un día se suele ver mejor.</p>	Na ₂ HPO ₄	6g	KH ₂ PO ₄	3g	NaCl	0,5g	Pectina	7g	Extracto de levadura	3g	Agar	20g	H ₂ O	1000mL
Na ₂ HPO ₄	6g														
KH ₂ PO ₄	3g														
NaCl	0,5g														
Pectina	7g														
Extracto de levadura	3g														
Agar	20g														
H ₂ O	1000mL														
Medio para HCN	<table> <tr><td>Peptona de caseína</td><td>15g</td></tr> <tr><td>NaCl</td><td>5g</td></tr> <tr><td>Peptona de soja</td><td>5g</td></tr> <tr><td>Glicina</td><td>3g</td></tr> <tr><td>Agar</td><td>20g</td></tr> <tr><td>H₂O</td><td>1000mL</td></tr> </table> <p>Impregnar el filtro con ácido pícrico y cerrar la placa con parafina Si el color del filtro a los 7 días cambia de amarillo a marrón rojizo se confirma la producción de HCN.</p>	Peptona de caseína	15g	NaCl	5g	Peptona de soja	5g	Glicina	3g	Agar	20g	H ₂ O	1000mL		
Peptona de caseína	15g														
NaCl	5g														
Peptona de soja	5g														
Glicina	3g														
Agar	20g														
H ₂ O	1000mL														

Análisis de “fingerprint” mediante BOX-PCR.

El empleo del cebador BOX, permite amplificar regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano y, de esta forma, discriminar las cepas aisladas por debajo de nivel de especie (Versalovic et al, 1991).

La prueba se realizó a partir de colonias aisladas. Se tomaron varias colonias si eran pequeñas, una si era mediana (unos 3 mm de diámetro) o parte de una colonia si era de tamaño grande. Las colonias se resuspendieron en tubos de microcentrífuga con 50 µL de agua destilada o bidestilada estéril y se hirvieron durante 10 minutos.

Para la BOX-PCR se preparó la siguiente mezcla de reacción por cada bacteria:

Agua bidestilada estéril	7,5 µL
Buffer (NEB)	2 µL
dNTPs (NEB) diluidos 2,5 veces en agua bidestilada	0,4µL
4µL del cebador <i>BOX A IR</i> : TACGGCAAGGCGACGCTGACG	4 µL
Taq (NEB)	0,1µL
Producto obtenido en el hervido de las colonias	6 µL

El programa que se usó para la PCR fue: 95°C durante 15 minutos, 35 ciclos a 94°C de 30 minutos, 52°C durante un minuto, 72°C durante 3 minutos y medio. Y para finalizar un periodo de extensión a 72°C durante 13 min.

Las muestras de la PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE 0,5X durante una hora y media a 70-100 V. En ocasiones en las que se requería más detalle, las electroforesis se realizaron en agarosa 1,8-2% en TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA) durante dos horas a 70V

Los análisis de los datos de la prueba fingerprint PCR-BOX se analizaron con el programa *QuantityOne*, mediante la producción de una matriz de similaridad automática basada en el análisis de ausencia/presencia de bandas.

La visualización de los geles electroforéticos se hizo mediante el transiluminador *Bio-Rad*, el análisis de los datos de la prueba fingerprint PCR-BOX usando el programa *Quantity One 1-D Analysis Software*®.

Análisis PCR-ADNr16S.

Para el análisis del gen *ADNr16S* se partió de cultivos líquidos a crecimiento óptimo (7 días) a los que se les realizó el protocolo F de extracción del kit *ADN de BiONEER AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit-4 prep trail kit*.

Posteriormente se tomaron 10µL de este producto y se añadieron a la mezcla de reacción compuesta por:

Buffer	5 µL
idNTPs	2,5µL
iTaq	2,5 µL
Cebador 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) (Weisburg <i>et al</i> , 1991)	3 µL
Cebador 1389R. (ACGGGCGGTGTGTACAAG) (Osborn <i>et al</i> , 2000)	3 µL
Completar hasta 25µL con agua bidestilada estéril.	

En el termociclador se utilizó el siguiente programa: 94°C durante 10 minutos, 34 ciclos a 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos, 72°C durante 2 minutos y finalmente un periodo de 7 min a 72°C.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 0'8% 0,5X TAE (20mM Tris, 10mM ácido acético, y 1mM EDTA.) para corroborar la presencia de únicamente un banda de aproximadamente 1,5 kb. Posteriormente se purificó la muestra usando la enzima ExoSAP USB® *ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup*. El proceso consiste en mezclar 15µL de producto de PCR más 6µL de ExoSAP-IT y realizar un único ciclo en el termociclador de 15 min a 37°C y 15 min a 80°C (Rafael Medina, comunicación personal).

La pureza y concentración del ADN se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop® (*Thermo Scientific*). Las muestras se enviaron a secuenciar a Stabvida® mediante la técnica de Sanger, solicitando que en el proceso se usasen además de los cebadores 27F y 1389R, los cebadores universales 518F y 800R. Para comprobar que la cobertura obtenida con la lectura de los 4 cebadores era correcta se utilizó el programa *CLC Sequence Viewer 7*. El conjunto de los fragmentos secuenciados permitió la elaboración de las secuencias del gen *ADNr 16S* para las bacterias estudiadas. Esta secuencia una vez corregida y aceptada será usada para la elaboración de árboles filogenéticos.

Análisis de secuencias.

Para determinar la clasificación filogenética de las cepas, se utilizaron las secuencias del gen *ANDr 16S* contenidas en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para el género *Methylobacterium*. El pre-procesado se realizó usando una herramienta diseñada con la ayuda de Jorge Camarero (Universidad Politécnica de Madrid). En el ensamblaje de las secuencias correspondientes a cada uno de los cebadores usados para la secuenciación del gen *ANDr 16S*, se utilizó el programa *SeqMan Pro versión 7.1.0* de la suite de programas *Lasergene (DNASTAR)*.

Las secuencias se compararon con las bases de datos utilizando la aplicación BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al*, 1990), tanto del servidor del NCBI, como del servidor específico *EzTaxon* (Kim *et al*, 2012).

El alineado completo de las secuencias se llevó a cabo con el programa *ClustalW* (Larkin *et al*, 2007). Los parámetros de alineamiento múltiple se ajustaron por defecto. En todos los casos los alineamientos se revisaron y corrigieron manualmente mediante el uso de los programas *BioEdit 7.1.3* (Hall, 1999) y *DAMBE* (Xia & Xie, 2001).

La elección del modelo de sustitución para los análisis filogenéticos por máxima verosimilitud (*Maximun-Likelihood*, ML) se llevó a cabo mediante el programa *jModelTest 2.1.1* (Darriba *et al* 2012), que evalúa cual es el modelo de sustitución paramétrica idóneo para un set de secuencias dadas.

Para la construcción de los árboles filogenéticos se usó el programa *PhyML* (Guindon *et al*, 2010). La construcción del árbol filogenético por ML para el gen *ADNr 16S*, se siguieron los modelos obtenidos anteriormente. Se comprobó la coherencia de la filogenia mediante el análisis no paramétrico de soporte de rama de tipo aLRT (*Aproximate Likelihood-Ratio Test*) basado en procesos *SH-Like* (Anisimova & Gascuel 2006). Cada uno de estos ensayos se repitió 10 veces y se eligió para representar a la filogenia el árbol con mejor valor de verosimilitud.

Plantas.

Las plantas usadas para el estudio de las capacidades promotoras del crecimiento vegetal han sido: *Vigna radiata* y *Brassica napus*.

Solución nutritiva para plantas.

Para el soporte de las plantas se usó agar-agua (agua destilada suplementada con 0'8% de agar) y medio semisólido de Rigaud-Puppo (1975).

Solución de Rigaud-Puppo.

KNO ₃	0,5 g
KPO ₄ H ₂	0,2 g
K ₂ SO ₄	0,2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,1 g
Microelementos (Solución deGibson)	1 mL
Quelante de hierro (Sandofer®)	0,02 g
H ₂ O	1.000 mL

Ajustar a pH 6,8-7 con KOH.

Solución de Gibson:

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ 2H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,08 g
Na ₂ MoO ₄	0,13 g
H ₂ O	1.000 mL

Desinfección de las semillas.

Los métodos de desinfección para las semillas varían ligeramente para cada especie.

Las semillas de *B. napus* se sumergen en etanol 70% durante 1 minuto, posteriormente se sumergen en hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos en agitación, a continuación se realizan 6 lavados sucesivos de 3 minutos con agua destilada estéril.

Las semillas de *V. Radiata*, se sumergen en etanol 96% durante 30 segundos, posteriormente se sumergen en hipoclorito de sodio al 6% durante 6 minutos en agitación, a continuación se realizan 6 lavados sucesivos de 3 minutos con agua destilada.

Una vez desinfectadas, las semillas se hicieron rodar sobre la superficie de una placa de medio TSA. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7 días para confirmar la

ausencia de contaminación en las semillas tratadas.

Ensayos de estrés salino.

Para el estrés salino se probaron las semillas en distintas concentraciones de NaCl (65, 75, 100, y 150mM). Para ello prepararon placas de Petri con medio semisólido de Rigaud-Puppo (agar al 0,8 % en solución de Rigaud-Puppo) que contenías distintas cantidades de NaCl. Se colocaron 20 semillas por cada placa y se observó su evolución durante 4 días a 28 °C en oscuridad.

Estos ensayos se realizaron también en presencia de bacterias. Se prepararon placas con medio que contenían medio de Rigaud-Puppo semisólido con NaCl 125 mM para las semillas de *V. radiata* y 100mM para *B. napus*. Las semillas se sumergieron en un cultivo en medio BeGa líquido de las bacterias, adecuadas durante 10 minutos y posteriormente se colocaron en las placas correspondientes.

RESULTADOS.

Pruebas bioquímicas y enzimáticas.

Producción de AIA.

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para las bacterias aisladas y para las bacterias de colección.

Tabla 4. Valores de D.O. obtenidos en los distintos cultivos.

Bacteria	1421	21411	<i>M. tarhaniae</i> N4211	<i>M. variable</i> GR3	<i>M. aquaticum</i> GR16T
Lectura	0,2273	0,1103	0,1782	0,2185	0,1899

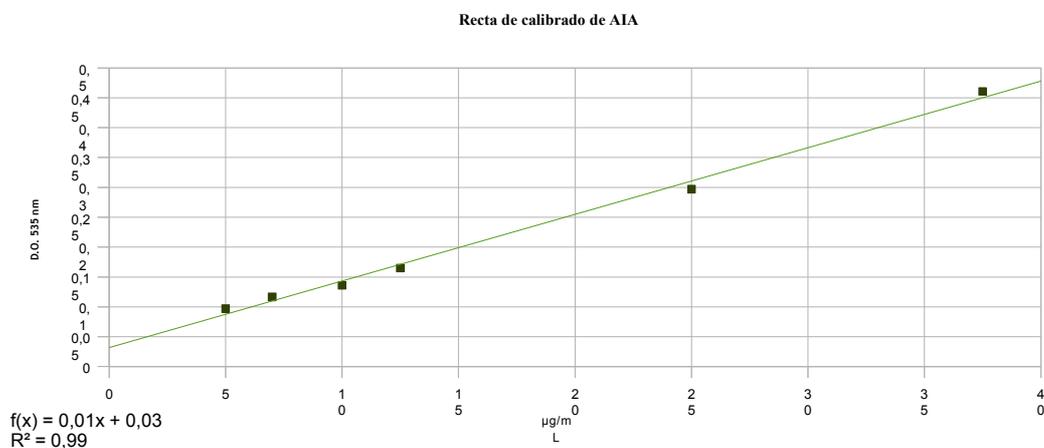


Figura 3. Recta de calibrado para AIA.

Como se aprecia, todas las bacterias son productoras de AIA y no se observan grandes diferencias entre las mismas. Los valores de AIA producidos por las diferentes bacterias estaban comprendidos entre 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3).

Solubilización de fosfatos.

Fue negativa para todas las bacterias.

Actividad proteasa.

Fue negativa para todas las bacterias.

Actividad amilasa.

Fue positiva, se observaron halos en las placas y se midió su diámetro (Tabla 5).

Actividad pectinasa.

Fue negativa para todas las bacterias del estudio.

Tabla 5. Actividad amilasa. El tamaño del diámetro del halo es consecuencia del efecto de la actividad de la enzima.

Bacteria	Diámetro
<i>Methylobacterium variabile</i> GR3	0,5 cm
<i>Methylobacterium tarhaniae</i> N4211	1 cm
<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16T	0,4 cm
21411	1 cm
1421	0,8 cm

Actividad HCN.

Fue negativa para todas las bacterias, dos de ellas, *Methylobacterium aquaticum* GR16T y *Methylobacterium variabile* GR3, mostraron un débil crecimiento pero no produjeron pigmentación.

Efecto del estrés salino sobre la germinación de las semillas.

En la Tabla 6 se muestra el efecto de la salinidad sobre la germinación de las semillas de *Vigna radiata* y *Brassica napus*.

Tabla 6. Efecto de la concentración salina sobre la germinación de las diferentes semillas probadas. Se expresa en número de semillas germinadas frente al total de semillas estudiadas.

Planta	Concentración	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
<i>Vigna radiata</i>	0 mM NaCl	18/20	18/20	20/20	ND
	65 mM NaCl	19/20	20/20	20/20	ND
	75 mM NaCl	18/20	19/20	20/20	ND
	100 mM NaCl	16/20	18/20	20/20	ND
	150 mM NaCl	5/20	19/20	19/20	ND
<i>Brassica napus</i>	0 mM NaCl	12/20	13/20	18/20	ND
	65 mM NaCl	7/20	9/20	13/20	ND
	75 mM NaCl	9/20	11/20	14/20	ND
	100 mM NaCl	9/20	10/20	12/20	ND
	150 mM NaCl	6/20	6/20	12/20	ND

ND: No determinado.

Como se observa en la tabla la presencia de NaCl tiene un efecto negativo sobre la germinación de las semillas. A la vista de estos resultados se decidió que 125mM es la concentración de NaCl más adecuada para crear las condiciones de estrés a las semillas de *V. radiata*, y 100mM para *B. napus*.

Así mismo, se estudió el efecto de la presencia de las bacterias en la germinación de las semillas de estas plantas. Para ello, se utilizaron las bacterias aisladas y dos estirpes de colección, *Methylobacterium aquaticum* GR16T y *Methylobacterium variabile* GR3. (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de las bacterias sobre germinación de las semillas probadas. Se expresa en número de semillas germinadas frente al total de semillas estudiadas.

	<i>B. napus</i>	<i>V. radiata</i>
Control	5/6	7/7
<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16T	3/6	3/7
<i>Methylobacterium variabile</i> GR3	5/6	7/7
1421	5/6	7/7
21411	5/6	7/7

La presencia de las bacterias no afecta a la germinación de las semillas ensayadas, excepto en el caso de *Methylobacterium aquaticum* GR16T que parece afectar a negativamente a la germinación de las semillas de ambas plantas.

Para comprobar si las bacterias ejercen un efecto protector frente al estrés salino en la germinación se usaron semillas sometidas a una concentración de 125mM para las semillas de *V. radiata* y 100mM para *Brassica napus*, a la vez que se inocularon con las bacterias. Los resultados se muestran en la Tabla 8, e indican que la presencia de las bacterias no supone una mejora significativa en la germinación.

Tabla 8. Efecto de diferentes bacterias sobre germinación de las diferentes semillas probadas en condiciones de estrés salino. Se expresa en número de semillas germinadas frente al total de semillas estudiadas.

Planta	Bacteria	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
<i>V. radiata</i>	Control	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
	<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16T	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
	<i>Methylobacterium variabile</i> GR3	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
	1421	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
	21411	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
<i>B. napus</i>	Control	4/6	4/6	5/6	5/6	5/6
	<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16T	4/6	4/6	4/6	4/6	4/6
	<i>Methylobacterium variabile</i> GR3	3/6	3/6	3/6	4/6	4/6
	1421	4/6	5/6	5/6	5/6	5/6
	21411	4/6	4/6	5/6	5/6	5/6

Análisis de “fingerprinting” mediante BOX-PCR.

La técnica de BOX-PCR ha permitido diferenciar las distintas cepas y especies de *Methylobacterium*. Además gracias al procesado de bandas se pudieron hacer árboles simples que permitían ordenar a las especies de colección (*Methylobacterium tarhaniae* N4211, *Methylobacterium variabile* GR3, *Methylobacterium aquaticum* GR16T) y las bacterias aisladas.

En la Figura 4, se observa que en los perfiles electroforéticos de estas cepas, el

número de bandas oscila entre 3 y 5, lo que permite discriminar las bacterias. Usando el detector automático de bandas del programa *QuantityOne* y marcadores de peso molecular conocido, se cuantificó la similitud mediante el coeficiente *Dice*. Ejecutándose con posterioridad un dendograma utilizando el algoritmo UPGMA (Figura 5.).

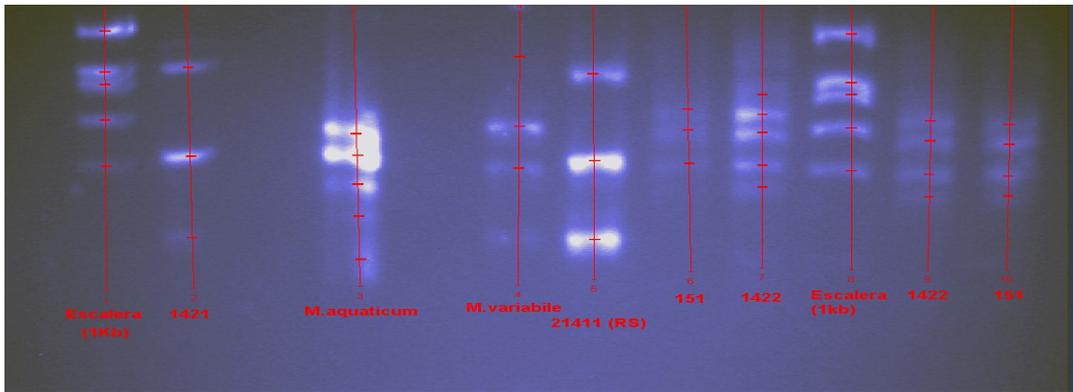


Figura 4. Perfil BOX de las bacterias estudiadas

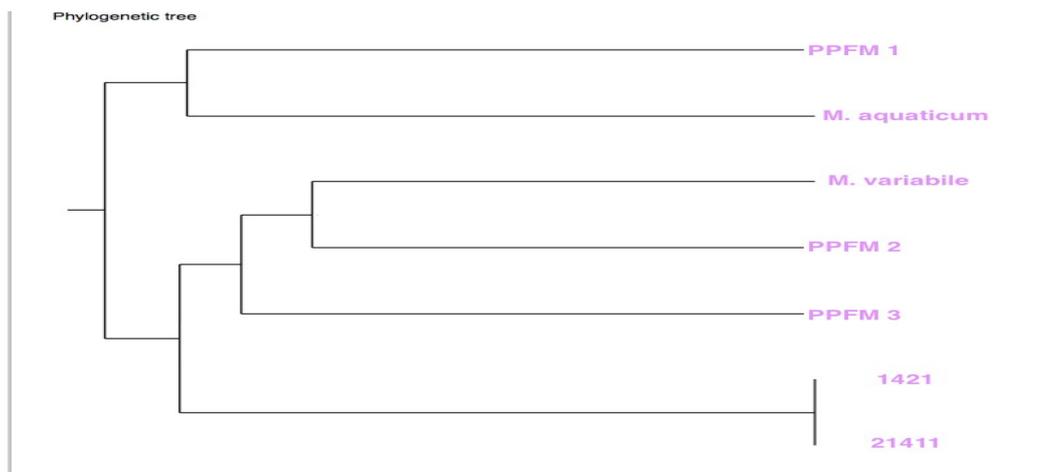


Figura 5. Dendograma UPGMA resultante, se añadieron otras PPFM para un mejor resultado.

Análisis filogenético del gen ADNr 16S.

La secuenciación de los fragmentos amplificados para el gen *ADNr 16S* se realizó por la empresa Stabvida (Portugal).

La secuenciación de las cepas 1421 y 21411 daba numerosos errores por varias razones. No sólo a causa de los problemas físicos asociados a su membrana y el tamaño de su genoma, lo que complicó la extracción de ADN y la PCR-amplificación. Sino que Además en zonas del gen *ADNr 16S* aparecían *gaps* que generaban lecturas llenas de

ruido, lo que impedía la comparación en las distintas bases de datos. En la bibliografía está descrito este problema para varias estirpes y especies de metilobacterias (Hiraishi, 1995). La lectura por parte del cebador 616F era correcta y de buena calidad hasta llegar a la posición 900. Sin embargo, en el caso de los cebadores 1510R y 1520R el resultado era particularmente malo, la lectura daba una señal no sólo baja, sino tan llena de ruido que se hacía imposible su uso.

Para resolver este problema se usaron cuatro cebadores, de forma que hubiera varias lecturas superpuestas. Además, por sugerencia de los Drs Akira Hiraishi y Esaú Megias (comunicación personal) se comenzó a leer por debajo de 1400pb con la idea de evitar lo que parecía una zona oscura en el genoma causante de los errores de lectura en Sanger. Se usaron los cebadores 27F y 1389R para realizar la amplificación mientras que para la secuenciación Sanger se usaron estos dos y además 518F y 800R. De esta forma se obtuvo una lectura limpia.

La solución vista en el programa *CLC Sequence Viewer 7* (figura 6.)mostró una buena cobertura del gen permitiendo que la secuencia aceptada, corregida y correcta pudiese ser usada para la elaboración de árboles filogenéticos.

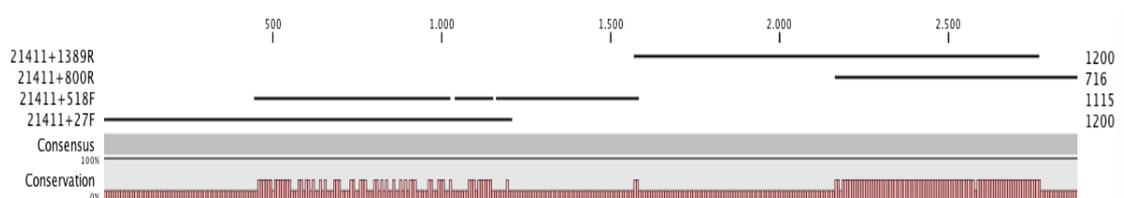


Figura 6. Cobertura de los fragmentos secuenciados del gen *ADNr 16S* del aislamiento 21411.

Una vez lista la secuencia consenso de ambas bacterias (1421 y 21411) se les realizó un BLAST en EzTaxon, lo que clasificó a estas bacterias como cepas de *Methylobacterium aquaticum* con una similitud del 99% para 1421 y del 98,5% para 21411. Con estos datos se les dio una identificación de cepa (No00 para el aislamiento 1421 y NO42 para el aislamiento 21411), y se enviaron sus datos a las bases de datos del NCBI.

Las cepas obtuvieron los siguientes nombres y números de acceso:

***Methylobacterium aquaticum* strain NO00 KR920749**

***Methylobacterium aquaticum* strain NO42 KR856053**

Finalmente con estas cepas y teniendo un set de datos del *ADNr 16S* coherente para el grupo *Methylobacterium*, se pasó a elaborar un árbol usando bacterias del género *Pseudomonas* como grupo externo.

En la figura 7 se observan las ramas del árbol filogenético más cercanas a las bacterias estudiadas. El árbol filogenético completo usando las secuencias del *ADNr 16S* de las cepas tipo del género (Anexo 1), debe, a causa de sus dimensiones, consultarse en el material suplementario del trabajo.

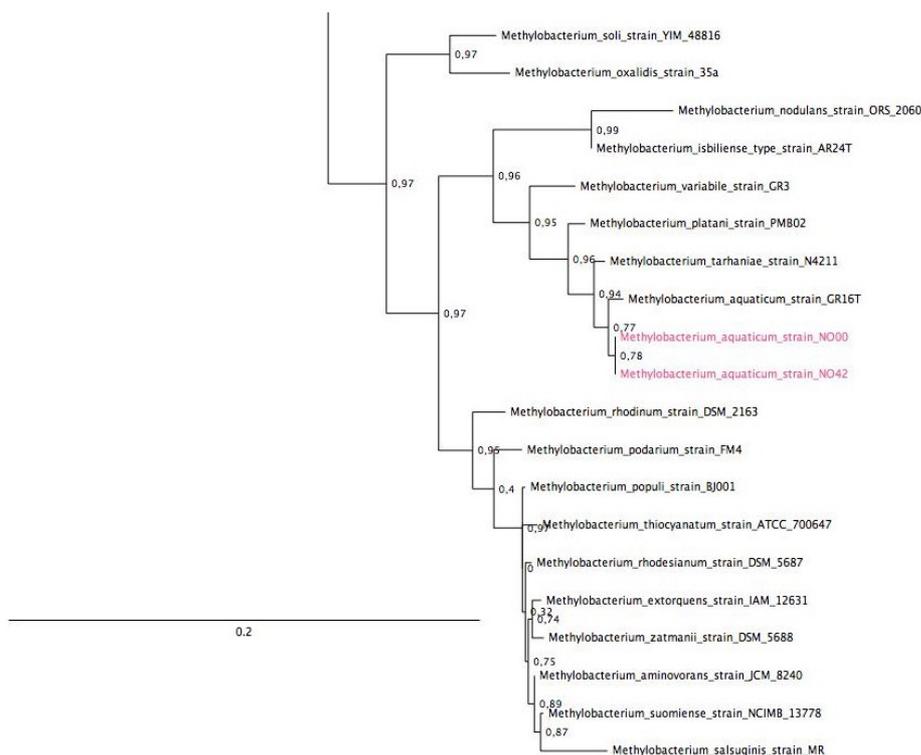


Figura 7. Detalle de las ramas cercanas a las cepas de estudio (en rosa) del árbol filogenético obtenido.

DISCUSIÓN.

Para la caracterización de las bacterias metilotrofas aisladas en la rizosfera de plantas de arroz que mostraban un mejor aspecto que las plantas controles se siguió una caracterización polifásica mediante la utilización de métodos fenotípicos y moleculares.

Para ello, se han puesto a apunto técnicas de fingerprinting o huella genética bacteriana, concretamente la llamada BOX-PCR. Son muchos los trabajos que utilizan estas técnicas de perfiles electroforéticos de bandas como soporte en estudios filogenéticos de discriminación de especies. Pero en muchos de ellos se concluye que la información que aporta no es concluyente para distinguir entre especies dado que los

grupos filogenéticos que se obtienen de este modo, difieren ampliamente de aquellos obtenidos con otras técnicas para la determinación de relaciones filogenéticas. Sin embargo, estas técnicas REP, y en concreto la BOX-PCR constituyen una poderosa herramienta para diferenciar cepas dentro de cada especie. Otra característica de esta técnica es que se puede usar para seguir determinadas cepas de perfil conocido en procesos biológicos, por ejemplo se ha utilizado para comprobar que bacterias utilizadas para la nodulación en plantas tienen el mismo perfil de las bacterias recuperadas de estos nódulos (M. Esaú Megias Saavedra. 2013).

Debido a la complejidad del gen a secuenciar fue necesario poner apunto los métodos PCR-ADNr 16S y los diseños para la secuenciación que la empresa encargada de hacerla debía seguir. Las secuencias que se obtenían con los cebadores 1510R y 1522R presentaban un número tan elevado de indeterminaciones que era imposible su uso, por lo que, como se indica en los resultados se utilizaron los cebadores 27F y 1389R para la amplificación, evitando así la zona problemática del gen. Además se aseguró una lectura más correcta por medio de los cebadores 518F y 800R.

Se ha procesado y ajustado la información presente en las bases de datos de este grupo de bacterias, para disponer de una herramienta sólida y potente con la que realizar una comparación filogenética en la que incluir el gen *ADNr 16S* de las cepas aisladas. Con ello se ha propuesto un nuevo árbol filogenético basado en *ADNr 16S* acorde con los datos tanto experimentales de las secuencias obtenidas, como con los bibliográficos (Kato *et al.*, 2015). Según los cuales varias especies del género debían ser reclasificadas, entre ellas estaban *Methylobacterium chloromethanicum* (McDonald *et al.*, 2001) y *Methylobacterium dichloromethanicum* (Doronina *et al.*, 2000) que han sido propuestas como sinónimos de *Methylobacterium extorquens*. (Urakami & Komagata 1984) *Methylobacterium rhodesianum* (Green *et al.*, 1988) es el nombre oficial de *Methylobacterium lusitanum* (Doronina *et al.*, 2002) debido a pruebas posteriores de hibridación ADN-ADN. Los nombres '*Methylobacterium dankookense*' (Lee *et al.*, 2009) y '*Methylobacterium goesingense*' (Idris *et al.*, 2006) fueron propuestos y validados. Las especies más recientemente validadas son, *Methylobacterium gossipiicola* (Madhaiyan *et al.*, 2012), *Methylobacterium cerastii* (Wellner *et al.*, 2012), *Methylobacterium bullatum* (Hoppe *et al.*, 2011) y *Methylobacterium marchantiae* (aislada de *Marchantia polymorpha* L.) (Schauer *et al.*, 2011) Como puede observarse el movimiento dentro del género es muy dinámico, en 2005 el género contaba con 19

especies aceptadas, actualmente el género comprende 51 especies según el LPSN (<http://www.bacterio.net/methylobacterium.html>). Aunque como sugieren algunos autores (Kato *et al.*, 2015), es posible que los problemas acumulados en las bases de datos afecten a este número.

En el caso de las bacterias estudiadas para este trabajo, el resultado obtenido con el análisis del gen *ADNr 16S* coloca a las cepas aisladas dentro de la especie *Methylobacterium aquaticum*, con una similitud de las secuencias de un 99%. Sin embargo, las pruebas fisiológicas, el perfil BOX y los resultados en las pruebas con plantas, no son los esperados. Por lo tanto, no se puede descartar que estas cepas no pertenezcan a esta especie y, que incluso pudieran constituir una nueva especie.

Esto se apoya además por la existencia de otras especies dentro del género como algunas de las descritas por Kato o Hiraishi cuyos *ADNr 16S* poseen similitudes de más del 99% con otras especies previamente descritas. Para confirmar esto serían necesarias pruebas MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) o la combinación del análisis filogenético del gen *GyrB* y del gen *ADNr 16S* con el objetivo de construir árboles filogenéticos con mayor resolución intraespecífica.

CONCLUSIONES.

1. El análisis del gen *ADNr 16S* ha mostrado ser una herramienta no siempre capaz de discriminar especies. En el caso de las metilobacterias esto se suma a la complejidad del mismo gen.
2. La prueba BOX-PCR es capaz de separar especies, en algunas ocasiones con mayor resolución que el análisis del gen *ADNr 16S*, mostrando ser efectiva como prueba rápida no conclusiva.
3. Las cepas de *Methylobacterium aquaticum* NO42 y NO00 podrían ser especies nuevas, debido a que, pese a la similitud del gen *ADNr 16S*, sus perfiles BOX y características fisiológicas y bioquímicas no coinciden con las descritas para *M. aquaticum*. Al igual que ocurre con otras metilobacterias que a pesar de compartir idénticas secuencias *ADNr 16S* son especies distintas.

Agradecimientos.

Este trabajo habría sido imposible sin la ayuda de muchas personas, pero hay algunas a las que quisiera nombrar especialmente.

A la Dra. Rosario M. Espuny, por confiar en mí para hacer ciencia.

Al Dr Ramón A. Bellogín por su paciencia, ayuda y comprensión.

Al Dr Esaú Megías por su ayuda y apoyo.

Al Dr Akira Hiraishi por sus valiosos consejos.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología, por acogerme y enseñarme durante tanto tiempo.

BIBLIOGRAFÍA.

Amat-García, E., Amat-García, G., & Henao-M, L. (2004). Diversidad taxonómica y ecológica de la entomofauna micófaga en un bosque altoandino de la cordillera oriental de Colombia. *Ecología*, 28(107), 223–231. Retrieved from http://www.rds.org.co/aa/img_upload/cd3189bd6b9a1ea1575134c54f92a42c/Entomofauna_Micofaga.pdf

Anisimova, M., & Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology*, 55(4), 539–552. <http://doi.org/10.1080/10635150600755453>

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Chosewood, L. (2009). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (5th ed.). Washington D.C.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Doronina, N. V, Trotsenko, Y. A., Tourova, T. P., Kuznetsov, B. B., & Leisinger, T. (2000). *Methylophila helvetica* sp. nov. and *Methylobacterium dichloromethanicum* sp. nov.--novel aerobic facultatively methylotrophic bacteria utilizing dichloromethane. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(2), 210–218. [http://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80007-7](http://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80007-7)

Dourado, M. N., Andreote, F. D., Dini-Andreote, F., Conti, R., Araújo, J. M., & Araújo, W. L. (2012). Analysis of 16s rRNA and *mxoF* genes revealing insights into *Methylobacterium* niche-specific plant association. *Genetics and Molecular Biology*, 35(1), 142–148. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000017>

Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlapbach R, *et al*, Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:16428–16433.

Esaú Megias Saavedra. (2013). *Estudio del carácter endofito de bacterias aisladas de plantas de arroz en las marismas del Guadalquivir*. (Tesis doctoral). Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

Fall R, Benson AA (1996) Leaf methanol: the simplest natural product from plants. **1**:296–301.

Gallego Parrilla J.J., Alías-Villegas C., Díaz-Olivares I.M., Gutiérrez Alcántara R., Madinabeitia-Peiró N., Bellogín R.A., Espuny M.R. (2013) Caracterización de una metilobacteria aislada de la superficie del grano de arroz. Libro de resúmenes de II Iberoamerican conference On Beneficial Plant-Microorganism-Environment Interactions (IBEMPA). Sesión IV-CP02. Pág 285 y 286 DOI: [10.13140/2.1.3698.1767](https://doi.org/10.13140/2.1.3698.1767)

Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., & Gascuel, O. (2005). PHYML Online - A web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2). <http://doi.org/10.1093/nar/gki352>

Green, P. N. & Bousfield, I. J. (1982). A taxonomic study of some Gram-negative facultatively methylotrophic bacteria. J Gen Microbiol 128, 623–638.

Hiraishi, A., Furuhashi, K., Matsumoto, A., Koike, K. A., Fukuyama, M., & Tabuchi, K. (1995). Phenotypic and Genetic Diversity of Chlorine-Resistant *Methylobacterium* Strains Isolated from Various Environments, *61*(6), 2099–2107.

Hiraishi, A., Yong Kook Shin, Ueda, Y., & Sugiyama, J. (1994). Automated sequencing of PCR-amplified 16S rDNA on “HydroLink” gels. *Journal of Microbiological Methods*, *19*(2), 145–154. [http://doi.org/10.1016/0167-7012\(94\)90046-9](http://doi.org/10.1016/0167-7012(94)90046-9)

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*, 95–98. <http://doi.org/citeulike-article-id:691774>

Hoppe, T., Peters, K., & Schmidt, F. (2011). *Methylobacterium bullatum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from *Funaria hygrometrica*. *Systematic and Applied Microbiology*, *34*(7), 482–486. <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.12.005>

Holton, J., Miller, R., Furst, V., & Malnick, H. Isolation of *Protomonas extorquens* (the “red phantom”) from a patient with AIDS., *21 The Journal of Infection* 87–93 (1990). [http://doi.org/10.1016/0163-4453\(90\)90761-V](http://doi.org/10.1016/0163-4453(90)90761-V)

Idris, R., Kuffner, M., Bodrossy, L., Puschenreiter, M., Monchy, S., Wenzel, W. W., & Sessitsch, A. (2006). Characterization of Ni-tolerant methylotrophic bacteria associated with the hyperaccumulating plant *Thlaspi goesingense* and description of *Methylobacterium goesingense* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *29*(8), 634–644. <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.01.011>

Jourand, P., Giraud, E., Béna, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M., ... de Lajudie, P. (2004). *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(6), 2269–2273. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.02902-0>

Kato, Y., Asahara, M., Arai, D., Goto, K., & Yokota, A. (2005). Reclassification of *Methylobacterium chloromethanicum* and *Methylobacterium dichloromethanicum* as later subjective synonyms of *Methylobacterium extorquens* and of *Methylobacterium lusitanum* as a later subjective synonym of *Methylobacterium rhodesianum*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *51*, 287–299. <http://doi.org/10.2323/jgam.51.287>

Kundu, B. S. y P. K. Sharma. 1994. Plant Response to Phytohormones Release by Diazotrophs. *Environment and Ecology* 12: 794-751.

Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., ... Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*(PART 3), 716–721. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>

Lee, S. W., Oh, H. W., Lee, K. H., & Ahn, T. Y. (2010). *Methylobacterium dankookense* sp. nov., isolated from drinking water. *Journal of Microbiology*, *47*(6), 716–720. <http://doi.org/10.1007/s12275-009-0126-6>

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthilkumar, M., Lee, J. S., & Lee, K. C.

(2011). *Methylobacterium gossipiicola* sp. nov., a pinkpigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from the cotton phyllosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(1), 162–167. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.030148-0>

McDonald, I. R., Doronina, N. V., Trotsenko, Y. a., McAnulla, C., & Murrell, J. C. (2001). *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp. nov. and *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane-utilizing bacteria isolated from a polluted environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 119–122.

Mantilla, J., García, I., Espinal, P., & Valenzuela, E. (2004). Estandarización y evaluación de tres sistemas rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Col. Cienc. Quím.*

Nairs, S. K. y N. Chandra (1997). Phytohormone Production by Diazotrophs Associated with Plantation and Orchard Crops. *Journal of Tropical Agriculture* 35: 1-2,47-48.

Osborn, A. M., Moore, E. R., & Timmis, K. N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2(1), 39–50. <http://doi.org/doi:10.1046/j.1462-2920.2000.00081.x>Raja, P., Balachandar, D., & Sundaram, S. P. (2008). PCR fingerprinting for identification and discrimination of plant-associated facultative methylotrophs. *Indian Journal of Biotechnology*, 7(October), 508–514.

Patt, T. E., Cole, G. C. & Hanson, R. S. (1976). *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 26, 226–229.

Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>

Pedrinho, E. A. N., Galdiano, R. F., Campanharo, J. C., Alves, L. M. C., & Lemos, E. G. de M. (2010). identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. *Bragantia*, 69(4), 905–912. <http://doi.org/10.1590/S0006-87052010000400017>

Rigaud, J., & Puppo, A. (1975) Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *The Journal General Bacteriology*, 88: 223-228.

Schauer, S., Kämpfer, P., Wellner, S., Spröer, C., & Kutschera, U. (2011). *Methylobacterium marchantiae* sp. nov., a pinkpigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from the thallus of a liverwort. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 870–876. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.021915-0>

Veyisoglu, A., Camas, M., Tatar, D., Guven, K., Sazak, A., & Sahin, N. (2013). *Methylobacterium tarhaniae* sp. nov., isolated from arid soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART8), 2823–2828. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.049551-0>

Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–6831. <http://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <http://doi.org/n.a>.

Wellner, S., Lodders, N., & Kampfer, P. (2012). *Methylobacterium cerastii* sp. nov., isolated from the leaf surface of *Cerastium holosteoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(4), 917–924. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.030767-0>

Yamashita, S. I., Uchimura, T., & Komagata, K. (2004). Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 865–870. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.02946-0>

Xia, X., & Xie, Z. (2001). DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92(4), 371–373. <http://doi.org/10.1093/jhered/92.4.371>