



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**DIVERSIDAD BACTERIANA METILOTRÓFICA  
ASOCIADA A LA CACTÁCEA *Neobuxbaumia  
macrocephala*, ENDÉMICA EN RIESGO DE LA  
RESERVA TEHUACÁN CUICATLÁN**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

- **DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

MC MARÍA DEL ROCÍO BUSTILLOS CRISTALES

**ASESOR DE TESIS:**

DC LUIS ERNESTO FUENTES RAMÍREZ



**BUAP**

Puebla, Pue., 7 de agosto 2017.

A la academia del Posgrado de Microbiología  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.

Por este conducto los abajo firmantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la alumna **Ma. Del Rocío Bustillos Cristales**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**"Diversidad bacteriana metilotrófica asociada a la cactácea *Neobuxbaumia macrocephala*,  
endémica en riesgo de la Reserva Tehuacán Cuicatlán".**

A nuestro juicio, la alumna **Ma. Del Rocío Bustillos Cristales** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente  
"Pensar bien, para vivir mejor"

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Miguel Castañeda Lucio

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Ismael Hernández Lucas

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Jesús Muñoz Rojas

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Verónica Quintero Hernández

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio 1C11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx



4.4 Determinación de genes que codifican para la enzima metanol deshidrogenasa	17
4.4.1 PCR para amplificar genes involucrados en la metilotropía	17
4.4.2. Hibridación Dot blot para detectar el gen que codifica para la enzima metanol deshidrogenasa	18
4.5 Análisis de Secuencias	18
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	
Caracterización fenotípica	19
Morfología microscópica	19
Morfología colonial	19
Características bioquímicas y fisiológicas de los aislados	21
Pruebas bioquímicas	21
Crecimiento en diferentes fuentes de carbono	26
Crecimiento a diferentes temperaturas	27
Crecimiento bacteriano a diferentes valores de pH	28
Tolerancia a la presencia de cloruro de sodio en el medio	29
Comportamiento frente a diferentes antimicrobianos	30
Taxonomía por secuencias de genes ribosomales	
Análisis de las secuencias del 16S rRNA	30
Phylum Actinobacteria	33
Phylum Firmicutes	40
Phylum Bacteroidetes	43
Phylum Proteobacteria	45
Números de catálogo de las secuencias nucleotídicas	51
Análisis de las secuencias del gen 23S rRNA	54
Crecimiento en metanol dependiente de Ca <sup>2+</sup> y Ce <sup>3+</sup>	55
Loci asociado a metanol deshidrogenasa	57
Hibridación “dot blot”	60
<b>CONCLUSIONES</b>	61
<b>PERSPECTIVAS</b>	61

BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	70

## TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para enzimas metanol deshidrogenasas.	17
Tabla 2. Procedencia de los aislamientos metilotróficos.	20
Tabla 3. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos.	22
Tabla 4. Identificación de cepas por comportamiento bioquímico.	24
Tabla 5. Asignación taxonómica por secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA.	32
Tabla 6. Bacterias metilotróficas cultivables aisladas de <i>N. macrocephala</i> .	52
Tabla 7. Crecimiento metilotrófico con $\text{Ca}^{2+}$ o $\text{Ce}^{3+}$ como cofactor para la enzima metanol deshidrogenasa.	56

## FIGURAS

Figura 1. Valle Tehuacán-Cuicatlán.	3
Figura 2. Metabolismo de compuestos de un carbono en bacterias metilotróficas aerobias.	7
Figura 3. Reserva Tehuacán Cuicatlán.	12
Figura 4. Morfología microscópica de algunas de las bacterias aisladas de <i>N. macrocephala</i> .	19
Figura 5. Fenotipos diferentes observados en medio sólido glicerol-peptona.	20
Figura 6. Crecimiento con diferentes fuentes de carbono.	26
Figura 7. Crecimiento a diferentes temperaturas.	27
Figura 8. Crecimiento a diferentes valores de pH.	28
Figura 9. Tolerancia a NaCl.	29
Figura 10. Respuesta a los antimicrobianos.	30
Figura 11. Distribución taxonómica de los aislamientos.	31

Figura 12A. Familia Micrococcaceae.	34
Figura 12B. Familia Nocardiaceae.	35
Figura 12C. Familia Nocardioideaceae.	36
Figura 12D. Familia Cellulomonadaceae.	37
Figura 12E. Familia Microbacteriaceae.	38
Figura 12F. Familia Geodermatophilaceae.	39
Figura 12G. Familia Staphylococcaceae.	41
Figura 12H. Familia Paenibacillaceae.	42
Figura 12I. Familia Sphingobacteriaceae.	44
Figura 12J. Phylum Alfabroteobacteria.	46
Figura 12K. Phylum Betaproteobacteria.	48
Figura 12L. Phylum Gamaproteobacteria.	50
Figura 13. Relación filogenética de las secuencias de metanol deshidrogenasas de los aislamientos.	58
Figura 14. Alineamiento parcial de aminoácidos de las enzimas metanol deshidrogenasas de los aislados de <i>N. macrocephala</i> y XoxF.	59
Figura 15. Hibridación Dot-Blot con <i>xoxF</i> .	60

## RESUMEN

Los microorganismos metilotróficos desempeñan un papel importante en múltiples ecosistemas, así como en áreas de interés humano debido a su diversidad, sus vías metabólicas únicas en la naturaleza, así como su capacidad para asimilar y oxidar sustratos de bajo costo. Las bacterias metilotróficas utilizan como fuente de energía y de carbono compuestos reducidos en carbono que no tienen enlaces C-C. Estos microorganismos tienen una distribución amplia que incluye suelos, ambientes acuáticos y plantas.

Este trabajo se planteó con el propósito de obtener conocimiento de la diversidad microbiana metilotrófica cultivable del ambiente de la cactácea *Neobuxbaumia macrocephala*. A futuro este conocimiento podría ser utilizado para dar inicio a un programa para el desarrollo de estrategias de conservación de esa planta en riesgo, así como para iniciar el estudio de la ecología de las interacciones entre bacterias metilotróficas y cactáceas. Se aislaron 73 cepas a partir de rizósfera, de la superficie vegetal y del interior de la planta. El medio de cultivo contenía metanol como fuente única de carbono y energía. Las cepas se caracterizaron mediante un estudio polifásico que nos permitieron una aproximación a nivel de género. Se incluyeron diferentes pruebas fenotípicas así como análisis de secuencia de los genes 16S rRNA y 23S rRNA para su identificación taxonómica. Las cepas identificadas incluyen microorganismos de los grupos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Alfa-, Beta- y Gamaproteobacteria.

Se intentó detectar el *loci* de distintas enzimas metanol deshidrogenasas incluyendo *mxoF*, *mno* y *xoxF* tanto por hibridación como por PCR. Únicamente se detectó la presencia de secuencias de la familia de las deshidrogenasas XoxF. Las enzimas metanol deshidrogenasas *xoxF* son dependientes de lantánidos y se caracterizan por tener el codón Asp301 el cual está implicado en la coordinación del lantánido. Se identificó el codón Asp301 en las secuencias que abarcaron la región donde se reporta la ubicación de éste. Así mismo, probamos el crecimiento metilotrófico de cepas de cada grupo taxonómico en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{Ce}^{3+}$ .

## ABSTRACT

Methylotrophic microorganisms play an important role in different ecosystems and in anthropic interest since their diversity, their exceptional metabolic pathways, as well as their ability to assimilate and oxidize low-cost substrates. Methylotrophic bacteria use reduced carbon compounds that do not have C-C bonds as carbon and energy sources. That microorganisms have a wide distribution that includes soils, water environments and plants.

This work was performed with the aim of gaining insight into the knowledge of culturable methylotrophic bacterial diversity of the cactus *Neobuxbaumia macrocephala*. This knowledge might allow future development of conservation strategies for that plant at risk and also might support the ecological study of the interactions between methylotrophic bacteria and cactaceae. A total of 73 strains were obtained from rhizosphere, plant surface and plant interior. The strains were isolated in a methanol-based medium as a source of carbon and energy. The isolates were characterized by a polyphase study that allowed us a taxonomical approximation to level of genus. The study included different phenotypic tests and sequence analysis of the genes 16S rRNA and 23S rRNA. The isolates included microorganisms of the groups Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Alpha-, Beta- and Gammaproteobacteria.

We attempted to detect the *loci* of several enzymes methanol dehydrogenases including *mxoF*, *mno* and *xoxF* both by hybridization and by PCR. All the sequences belonged to the XoxF dehydrogenase family. The enzymes methanol dehydrogenases XoxF are lanthanide-dependent and are characterized by having codon Asp301 which is involved in the coordination of lanthanide. That codon was detected in all the sequences that covered the region where the site is reported. The methylotrophic growth of strains of each taxonomic group in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Ce}^{3+}$  was tested.



## INTRODUCCIÓN.

### 1. Diversidad Bacteriana

Desde un enfoque microbiológico, la diversidad describe el número de diferentes tipos de especies y su relativa abundancia en una comunidad dada en cierto hábitat. A partir de un punto de vista práctico la diversidad puede ser definida como el número y distribución de diferentes tipos de secuencias detectables presentes en el DNA de la comunidad extraída de un hábitat (Hedrick *et al.*, 2000).

Las bacterias son una gran fuente de diversidad genética, son la principal porción de la biomasa en la Tierra y son responsables de muchos procesos esenciales para la vida como los ciclos biogeoquímicos (Konstantinidis *et al.*, 2006; Prosser *et al.*, 2007). Esta diversidad está íntimamente ligada a la variación del ambiente, es decir a la cantidad de hábitats que se presentan. Así entre más heterogéneo es el ambiente pueden encontrarse mayor cantidad de genotipos adaptados a nichos determinados (Kassen y Rainey 2004). Esta heterogeneidad ambiental, así como los cambios ocasionados por los propios organismos determinan la proporción relativa de los miembros de las comunidades microbianas.

Una de las teorías más ampliamente aceptadas en ecología de los desiertos, establece que la estructura de las comunidades microbianas del suelo y las transformaciones biogeoquímicas asociadas a ellas dependen de la proximidad a plantas superiores usualmente escasas en estos ambientes (García y McKell 1970).

### 2. Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán, está situado en la región centro-sur de México entre los estados de Puebla y Oaxaca a 20<sup>o</sup> latitud norte del país Fig. 1 (Rzedowski 1978). El clima es semiárido con una precipitación media anual de 380 mm, la aridez que se presenta en esta zona se debe a la influencia de la Sierra Madre Oriental que obstaculiza el acceso de la humedad proveniente con los vientos alisios del Golfo de México (Byers 1967). La temperatura media anual es de 21.4 °C oscilando entre los 16.5 °C en enero y los 24.2 °C en mayo (García 1973). Los suelos en esta región son del tipo calcáreo, salinocalcáreo, yesífero y calcáreo-yesífero, los cuales son el producto del intemperismo *in situ* (Aguilera 1970).

Tanto la variedad de suelos, como el rango de altitudes y la accidentada orografía han influido muy probablemente para la formación de ambientes únicos y diferentes en los que se desarrolla una diversidad de vida no observada en otras regiones, incluyendo las semidesérticas. Esta zona árida, ha sido reiteradamente reconocida por su sorprendente riqueza vegetal, en la que predominan especies de afinidad neotropical y que incluye un gran número de endemismos; se han registrado 2,703 especies de plantas vasculares y un endemismo superior al 30% (Dávila *et al.* 1993). En la Reserva se identifican bosques tipo tropical caducifolio, bosque espinoso,

pastizal y matorral xerófilo, bosque de encinos y bosque de pino-encino. Dentro de esta riqueza vegetal podemos mencionar a las cactáceas columnares, algunas especies de agaves, orquídeas y algunas especies de oyamel en peligro de extinción (<http://www.mexicodesconocido.com.mx/tehuacan-cuicatlan.html>).



**Fig. 1.** Valle Tehuacán-Cuicatlán (Casas *et al.* 2001).

La familia de las cactáceas es una de las más representativas de las áridas tierras mexicanas y actualmente cuenta con una alta proporción de especies incluidas en la IUCN (International Union for the Conservation of Nature) de la lista roja de los taxones en peligro de extinción (Hunt 1992). Actualmente muchas de las plantas endémicas de esta reserva se encuentran en riesgo por la conjunción de la biología particular de estas plantas y la actividad humana directa o indirecta; en particular la cactácea columnar *Neobuxbaumia macrocephala* de la reserva que es la especie de interés en este trabajo de investigación.

### **3. *Neobuxbaumia macrocephala***

El género *Neobuxbaumia* es un miembro de la familia Cactaceae que se distribuye en ambientes secos y semi-húmedos del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, la vertiente del Pacífico y la vertiente del Golfo de México (Bravo y Sánchez 1978). Dentro de esta región la especie *N. macrocephala* se puede encontrar en suelos de tipo calcáreo, en matorrales xerófitos y bosque seco tropical.

*N. macrocephala* es un cactus columnar ramificado que alcanza entre 7 y 15 m de altura, el número de ramas en una planta adulta puede variar de una a diez. Las plantas soportan un cephalium rojizo en la punta de cada rama a partir de la cual emergen flores de color rojo-púrpura entre mayo y junio, durante el final de la estación seca. La especie es hermafrodita y sus flores son principalmente nocturnas, es decir, abren a la puesta del sol y cierran en la mañana. Los murciélagos *Choeronycteris mexicana*, *Leptonycteris curasoae* y *Leptonycteris nivalis* son los principales polinizadores que promueven la producción de semillas, los frutos maduran de junio a agosto y son consumidos por murciélagos y algunas especies de aves que probablemente actúan como dispersores de semillas (Valiente *et al.* 1997).

Tanto los factores bióticos (competencia, polinización e interacciones simbióticas) como abióticos (pH, salinidad y humedad) afectan la abundancia y el rango de distribución de *N. macrocephala* (Godínez *et al.*, 1999). Este último es muy restringido en comparación a otras especies del género, ya que solo se encuentra en pequeños parches entre los 1700 y 1800 m de altitud, con una densidad aproximada de 200 individuos por hectárea y con un registro de pocos eventos de reclutamiento en sus poblaciones (Bravo y Sánchez 1978; Valiente 1997). Ello ha causado que en la actualidad esta especie se encuentre en estado de amenaza (Esparza *et al.*, 2002; Arriaga *et al.*, 2000; Valiente *et al.*, 1997).

En distintos estudios se ha reportado la capacidad de promoción del crecimiento de diversas plantas por parte de bacterias con metabolismo metilotrófico, el cual forma parte importante del ciclo global del carbono (Kutschera 2007).

#### **4. Metilotrofia**

La definición de organismo metilotrófico fue dada por primera vez por Colby y Zatman en 1973 y recreada por Anthony en 1982. Son aquellos microorganismos que presentan un metabolismo energético capaz de oxidar compuestos orgánicos monocarbonados (donadores de electrones) los cuales no presentan enlaces carbono-carbono (compuestos C1), tales como metanol (di, tri) metilamina, formamida, metano y monóxido de carbono, entre otros y que son utilizados como fuente de energía y carbono. De acuerdo a la capacidad de utilización del sustrato monocarbonado, estas bacterias pueden clasificarse en metilotróficas obligadas o facultativas. Estas últimas muestran plasticidad para utilizar compuestos mono- y multicarbonados (Lidstrom 1992).

Las bacterias metilotróficas son ubicuas en la naturaleza y se desarrollan tanto en ambientes acuáticos como terrestres. Éstas tienen la capacidad de colonizar una amplia variedad de cultivos, localizándose comúnmente en la superficie de hojas, en semillas y en la rizósfera de las plantas. La presencia de estos microorganismos en los vegetales puede resultar benéfica para la planta a través de mecanismos tales como producción de ácido indol acético, citoquininas y por fijación biológica de N<sub>2</sub> (Koenig *et al.*, 2002; Toukdarian y Lidstrom, 1984; Trotsenko *et al.*, 2001). Se conoce que en distintos ambientes el éxito de las especies vegetales está íntimamente ligado a la actividad de ciertas especies bacterianas. En el caso particular del ambiente semidesértico también se ha observado la interacción benéfica de microorganismos con las plantas, aunque actualmente no se conoce la participación de bacterias metilotróficas en estas interacciones.

Los microorganismos metilotróficos desempeñan un papel importante en el campo de la biotecnología, esto se debe, en parte, a sus vías metabólicas únicas en la naturaleza así como por su capacidad y diversidad para asimilar y oxidar sustratos de bajo costo (materias primas o de los contaminantes industriales). Estos aspectos han provocado la intensificación de los

estudios acerca de la asimilación de compuestos de C<sub>1</sub> por estas bacterias (Wang *et al.*, 2004).

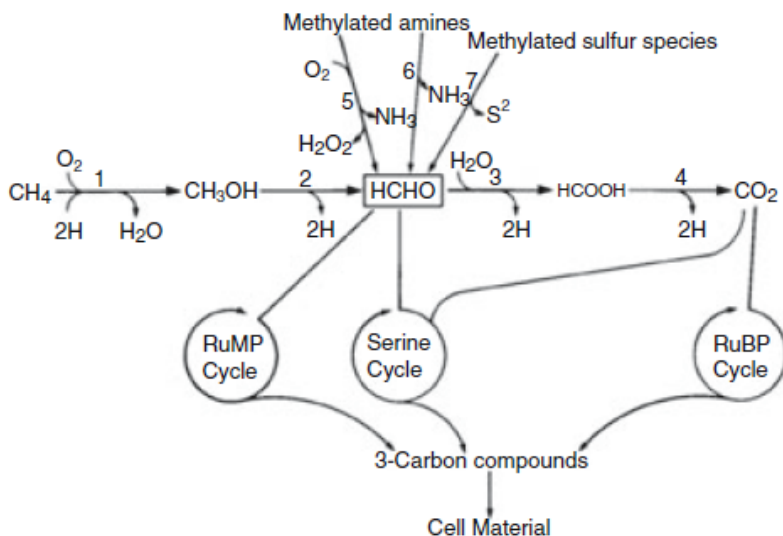
En el ambiente terrestre dos importantes sustratos metilótrofos son el metanol (CH<sub>3</sub>OH) y el metano (CH<sub>4</sub>). Se estima que aproximadamente 100 millones de toneladas de metanol son producidos anualmente de manera natural por las plantas, las que lo excretan a través de los estomas de las hojas (Fall *et al.*, 1996). Por su parte, el metano es producido principalmente por arqueobacterias metanogénicas fisiológicamente especializadas que colonizan ambientes anóxicos (Balch *et al.*, 1979).

Los metilótrofos han sido aislados de diversos ambientes entre los que se incluyen sedimentos, cuerpos acuáticos, suelos y plantas. El grupo de estos microorganismos es muy diverso y abarca géneros pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos. Se han identificado metilótrofos en los taxones Alfa-, Beta- y Gamaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Chloroflexi, Acidobacteria, Nitrospirae, Verrucomicrobia e inclusive en el dominio Archaea (Beck *et al.*, 2015; Chistoserdova y Lidstrom 1997; Firsova *et al.*, 2015; Keltjens *et al.*, 2014; Knief *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014; Lidstrom 2006; Madhaiyan *et al.*, 2009; McTaggart *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2010). Por otra parte en los eucariontes metilótrofos se incluyen las levaduras *Pichia pastori*, *Candida boidinii* y *Candida rishirensis* sp. (Horiguchi *et al.*, 2001; Yurimoto *et al.*, 2011). El mayor número de bacterias metilótroficas caracterizadas corresponde al grupo taxonómico Alfabroteobacteria, específicamente el género *Metylobacterium*.

Hasta hace poco, el papel principal de los metilótrofos aeróbicos era considerado en función de su involucramiento en el ciclo global del carbono, particularmente en la oxidación del metano, uno de los gases más importantes con efecto invernadero y cuya concentración se incrementa hasta en un 1% cada año (Cicerone *et al.*, 1988). La entrada de metano en la atmósfera es debida tanto a fuentes abióticas (geoquímicas) como bióticas (arqueas metanogénicas) (Zavarzin *et al.*, 1999). Por su parte, las comunidades aeróbicas oxidadoras del metano reducen la cantidad de este gas que llega a la atmósfera. Distintas metilobacterias pueden mineralizar derivados halogenados del metano, compuestos que contienen sulfuros metilados y aminas metiladas (Dezwardt *et al.*, 1996), hecho que tiene relevancia sobre todo en el caso de contaminantes atmosféricos cuya concentración puede ser disminuida por la actividad de estos microorganismos.

## **5. Metabolismo metilótrofico.**

Para la degradación de los compuestos carbonados tipo C<sub>1</sub> existen dos rutas primarias en las bacterias metilótroficas: el ciclo de la ribulosa monofosfato o de fijación de formaldehído y la vía de la serina (Anthony 1982). Para la asimilación de carbono el formaldehído es convertido dentro de la célula en biomasa a través de los ciclos mencionados o bien es oxidado a CO<sub>2</sub> con la consiguiente generación de energía (Anthony 2000; Lidstrom 1991 y 2006).



**Fig. 2.** Metabolismo de compuestos de un carbono en bacterias metilotróficas aerobias. 1, metano monooxigenasa; 2, metanol deshidrogenasa; 3, sistema de oxidación de formaldehído; 4, formato deshidrogenasa; 5 y 6, oxidasas de aminas metiladas; 7, deshidrogenasa de sulfuros metiladas. RuMP, ribulosa monofosfato; RuBP, ribulosa bifosfato. Fuente: Lidstrom 2006.

La enzima metanol deshidrogenasa mejor caracterizada (MDH, EC 1.1.1.244) es un tetrámero  $\alpha_2\beta_2$  con dos sitios activos cada uno conteniendo un grupo prostético PQQ, pirroquinolina quinona y un átomo de calcio (Anthony 2000). La MDH cataliza la oxidación del metanol a formaldehído en el periplasma de las bacterias metilotróficas durante su crecimiento en compuestos C1. Esta descripción inicialmente fue hecha en *Methylobacterium extorquens* y posteriormente se ha encontrado como una característica común en casi todas las bacterias metilótrofas y en las cuales ésta constituye más del 15% de su proteína soluble (Anthony 1986).

En las diferentes proteobacterias metilótrofas al menos diecisiete genes desempeñan una función en el proceso de degradación de compuestos de un solo carbón (Goodwin y Anthony 1995; Lidstrom *et al.*, 1992). Tres de estos genes codifican para proteínas estructurales en el complejo de degradación del metanol: *mxoF* y *mxoI* codifican para la cadena larga ( $\alpha$ ) y para la pequeña ( $\beta$ ), respectivamente, de la enzima metanol deshidrogenasa y *mxoG* codifica para el citocromo cL, el aceptor del primer electrón para MDH (Mc Donald y Murrell 1997).

La enzima MDH está ampliamente extendida entre las bacterias metilotróficas del phylum Proteobacteria, particularmente, el gen *mxoF* ha sido usado como un marcador para estudios filogenéticos de microorganismos metilótrofos en el ambiente (Mc Donald y Murrell 1997). Sin embargo, recientemente se caracterizó una enzima diferente, denominada Mdh2 responsable de la oxidación del metanol en cuatro cepas Burkholderiales: *Methyloversatilis universalis* FAM5, *Methylibium petroleiphilum* PM1, y dos más no identificadas aún (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008), esta enzima aparentemente está menos extendida en el ambiente, se relaciona de manera particular a la subunidad mayor de la MDH y posee menos de un 35% de similitud en secuencia de aminoácidos que la típica MDH (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008).

La enzima metanol deshidrogenasa que cataliza la oxidación del metanol a formaldehído es distinta que la metanol deshidrogenasa en bacterias metilotróficas Gram-positivas (De Vries *et al.*, 1992) y hongos metilótrofos (Williamson *et al.* 1987). La bacteria metilótrofa termotolerante

*Bacillus methanolicus* posee una metanol deshidrogenasa dependiente de NAD con propiedades estructurales y funcionales diferentes a las MDH de la mayoría de las proteobacterias (Arfman *et al.*, 1992).

En algunas bacterias Gram-positivas de alto contenido de GC se ha encontrado una enzima diferente, la metanol N, N'-dimetil-4-nitrosoanilina oxidoreductasa, la cual es una proteína decamérica y con poca especificidad ya que también participa en la oxidación de otros alcoholes (Bystrykh *et al.*, 1997).

Otras deshidrogenasas filogenéticamente relacionadas a MxaFI incluyen a un grupo de enzimas que han sido llamadas XoxF, las que han sido pobremente caracterizadas. Los análisis filogenéticos han revelado la presencia de cinco clados distintos del gene *xoxF*, nombrados *xoxF* 1-5 y se ha visto que muchos organismo poseen varias copias de estos (Chistoserdova 2011; Keltjens *et al.*, 2014).

Recientemente se ha demostrado que las deshidrogenasas XoxF oxidan metanol de forma dependiente de los elementos llamados tierras raras (REE) en lugar de Ca<sup>2+</sup> como cofactor (Fitriyanto *et al.*, 2011; Keltjens *et al.*, 2014; Nakagawa *et al.*, 2012; Pol *et al.*, 2014). Los análisis de secuencias muestran que las enzimas XoxF tienen un origen filogenético común y que están agrupadas en al menos cinco clados (Taubert *et al.*, 2015).

Estudios filogenéticos moleculares en microorganismos basados en la secuencia del gen que codifica la subunidad 16S rRNA y/o en las secuencias de genes funcionales conservados han ampliado en gran medida nuestro conocimiento de la diversidad microbiana en la naturaleza. Las sondas de genes funcionales conservados son particularmente usadas en investigaciones sobre la diversidad de metilótrofos aeróbicos (Wang *et al.*, 2004).

## 6. Microbiología de las cactáceas

En comparación con otros grupos de plantas, se conoce poco de la microbiología de las cactáceas. En trabajos previos se ha investigado sobre microorganismos fitopatógenos (Alcorn *et al.*, 1991; Boyle 1949; Foster y Fogleman, 1993). En cuanto a bacterias no deletéreas, se han detectado posibles endófitos entre las poblaciones bacterianas asociadas (Fogleman y Foster, 1989). En asociación a dos especies de cactáceas (*Pachycereus pringlei* y *Opuntia Cholla*) se han encontrado microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter* y *Actinomadura*, algunos de ellos con actividad de fosfolubilización o con actividad promotora de crecimiento vegetal (Puente *et al.*, 2004a). Así mismo, en nuestro grupo Mascarúa-Esparza *et al.* (1988) aislaron e identificaron *Azospirillum* asociado a *Opuntia*. Esta asociación bajo condiciones específicas promueve el crecimiento de la planta (Caballero-Mellado, sin publicar). En otros ensayos de inoculación, en el grupo del Dr. Bashan (CIBNOR) se han obtenido resultados notables utilizando cepas provenientes de grupos vegetales lejanos. Se han observado incrementos en germinación y en crecimiento de plántulas del cardón gigante (*Pachycereus pringlei*) en sustrato artificial y en suelo por la inoculación con *A. brasilense* Cd, así como efectos en el crecimiento con *A. brasilense* Sp 245 (Bacilio *et al.*, 2006; Puente y Bashan 1993).

El microorganismo inoculado pudo ser detectado hasta los 300 días posteriores a la inoculación en sustrato artificial y a los 100 días en suelo. De manera similar *P. pringlei*, *Stenocereus thurberi* y *Lophocereus schotti* inoculadas con *Azospirillum* y sembradas en jardines urbanos incrementaron su supervivencia en comparación a plantas no inoculadas, las que en su totalidad no vivieron más de dos años. Se observaron incrementos en la cantidad de nitrógeno y en la materia orgánica en suelo. El efecto promotor del crecimiento ejercido por *Azospirillum* en *P. pringlei* se incrementa en suelos pobres (Carrillo *et al.*, 2000).

## **7. Métodos dependientes de cultivo**

El uso de técnicas microbiológicas convencionales basada en el cultivo previo de los microorganismos en combinación con métodos moleculares independientes de cultivo debería ser la estrategia de elección en estudios de diversidad microbiana. Las técnicas dependientes de cultivo no pueden proporcionar información completa acerca de los miembros que integran la comunidad microbiana asociada a las plantas e igualmente no permitirán determinar la relevancia que los miembros no cultivables poseen en dicha comunidad. Sin embargo, las técnicas dependientes de cultivo hoy en día resultan muy útiles pues al disponer de cultivos puros de los diferentes microorganismos aislados podemos obtener información relacionada a su fisiología y metabolismo. De esta manera, las técnicas moleculares independientes de cultivo y las tradicionales dependientes de cultivo son complementarias entre sí (González *et al.*, 2003).

Con el propósito de generar conocimiento de la diversidad microbiana metilotrófica que a futuro permita el desarrollo de estrategias de conservación de plantas en riesgo y que también genere conocimiento básico para conocer y explorar las asociaciones benéficas entre bacterias metilotróficas y cactáceas en riesgo, se ha planteado esta tesis doctoral.

## ANTECEDENTES

Recientemente varios estudios han analizado la influencia de diferentes factores sobre el microbioma de las plantas, tales como genotipo del hospedero, compartimento en la planta, propiedades intrínsecas al suelo, variaciones estacionales, entre otras, (Caruso *et al.*, 2011; Coleman *et al.*, 2016) en los cactus, sin embargo, muchas de esas cuestiones permanecen poco entendidas.

Puente *et al.*, en 2004a mostraron que tanto hongos como bacterias son capaces de colonizar densamente el rizoplasma de diferentes especies tales como *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurbei*, y *Opuntia cholla*. Posteriormente se caracterizaron algunas de esas bacterias y se mostró que algunas de ellas son responsables del desgaste de las rocas y promueven el crecimiento de los cactus (Puente *et al.*, 2004b; Lopez *et al.*, 2011).

Métodos moleculares como la electroforesis en gradiente de temperatura (TGGE), bibliotecas de genes que codifican para la subunidad 16S rRNA y pirosecuenciación fueron utilizados en un estudio de diversidad bacteriana en la rizósfera de la cactácea *Mammillaria carnea* en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán, con los cuales identificaron cambios en las comunidades microbianas entre las diferentes épocas del año, mostrando un alto nivel de biodiversidad en la temporada de sequía (Torres *et al.*, 2012).

Recientemente se realizó un estudio en la reserva de Tehuacán-Cuicatlán en donde se evaluó la diversidad y estructura de comunidades bacterianas en la rizósfera de tres especies de cactáceas tomando en consideración el posible efecto de temporadas lluviosas y secas, a través de técnicas moleculares y de cultivo así como secuenciación de los genes 16S rRNA y *nifH*. De las muestras aisladas de la rizósfera la composición en género fue muy similar en cada temporada, los taxos más abundantes fueron: alfaproteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes. Mediante las técnicas moleculares los phyla bacterianos más representados fueron Actinobacteria, Proteobacteria y Acidobacteria (Aguirre *et al.*, 2012). También Andrew *et al.* (2012) mediante pirosecuenciación examinaron comunidades microbianas de suelos y rizósfera asociadas a las raíces del cactus saguaro y del cardón, observando que las comunidades microbianas en los desiertos son abundantes y diversas.

En un trabajo previo realizamos un proyecto cuyo objetivo fue detectar bacterias metilotróficas aisladas de cactáceas con potencial de promoción de crecimiento en el cactus *Echinocactus platyacanthus*, en dicho trabajo encontramos aislados pertenecientes a los géneros *Cellulomonas*, *Lysinibacillus*, y *Roseomonas* comunes en la flora microbiana de las plantas con características de una PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas por sus siglas en inglés) (Sin publicar).

En 2016 se estudiaron las comunidades microbianas en dos especies de cactus nativas del centro de México *Myrtillocactus geometrizans* y *Opuntia robusta*, y se determinó que las asociaciones bacterianas se ven influenciadas principalmente por el compartimento de la planta, la especie de planta, y en menor proporción la estación del año, así mismo, se observó que la diversidad bacteriana es mayor en la filósfera que en la rizósfera, y por otra parte es mayor en la rizósfera que en la endósfera del cactus (Fonseca *et al.*, 2016).



## **JUSTIFICACIÓN**

La diversidad bacteriana que habita las plantas de los desiertos y zonas áridas es poco conocida, pero se sabe que numerosos microorganismos son capaces de colonizar distintos hábitats de esas regiones. Las bacterias metilotróficas colonizan distintos ambientes aunque hasta la fecha poco se sabe acerca de la diversidad de éstas en ambientes áridos. El conocimiento de su diversidad resultará fundamental para el estudio de distintos aspectos de la biología de los seres que se han adaptado a las rigurosas condiciones ambientales prevalentes en dichas regiones. Adicionalmente este mismo conocimiento ecológico es requisito para el aprovechamiento humano de las capacidades metabólicas y ecológicas de las bacterias del desierto.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Explorar la diversidad de las bacterias metilotróficas asociadas a la cactácea *Neobuxbaumia macrocephala*

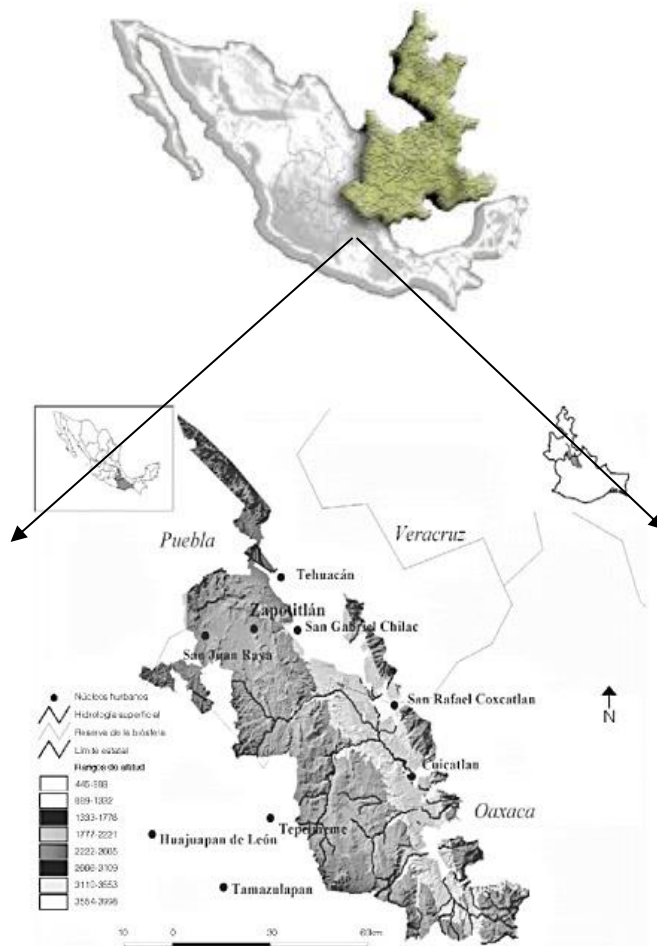
### **Objetivos Particulares**

- Realizar una agrupación fenotípica atendiendo a una combinación de datos morfológicos y fisiológicos de las cepas de estudio.
- Caracterizar genotípicamente a las cepas mediante la secuenciación de los genes esenciales 16S rRNA y 23S rRNA
- Determinar la presencia del gen que codifica para la enzima metanol deshidrogenasa
- Determinar polimorfismo del gen que codifica la enzima metanol deshidrogenasa.
- Evaluar el comportamiento metilotrófico bajo condiciones adecuadas para el *locus* encontrado.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. Zona de muestreo

*Neobuxbaumia macrocephala* es endémica de la región de Tehuacán-Cuicatlán. En Zapotitlán de Salinas podemos encontrar poblaciones pequeñas de este cactus columnar aproximadamente a 15 Km de Zapotitlán antes de llegar a Acatepec por la carretera a Huajuapán de León (Arias *et al.*, 2000).



**Fig. 3.** Reserva Tehuacán Cuicatlán.

El muestreo se realizó en el año 2009 una vez que se obtuvieron los permisos correspondientes por ser considerada esta planta una especie amenazada. Las plantas de la especie *N. macrocephala* se localizaron aproximadamente a una distancia de entre 34 y 36 Km de la carretera Federal que va de Tehuacán, Puebla a Zapotitlán, Oaxaca. Este muestreo fue realizado en el trabajo de tesis de licenciatura “Caracterización genotípica de bacterias metilotróficas aisladas de cactáceas de la reserva de la biosfera del valle de Tehuacán-Cuicatlán” (Seynos 2010).

Se muestrearon tres plantas adultas de aproximadamente 7-10 m de altura. Se tomaron muestras *in situ* de las regiones rizosféricas y epífitas de cada una de las tres plantas y se trasladaron al laboratorio en recipientes estériles. Las muestras de suelo (10 g cada una) se tomaron a una

distancia no mayor de 1 m de la planta y a una profundidad de 5 – 10 cm. Las muestras de la región epífita (5 cm<sup>2</sup>) de las plantas se colectaron con hisopos de algodón estériles que fueron inmersos en 10 ml de solución estéril de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mM.

Para la obtención de muestras endófitas se tomaron secciones de tejido no mayores a 1.5 cm<sup>2</sup> a lo largo de la columna del cactus que no comprometieran la integridad y viabilidad de la planta. Las muestras se depositaron en recipientes estériles para su procesamiento en el laboratorio.

## **2. Aislamiento**

Se desinfectó la superficie externa de las muestras de tejido obtenido de las plantas mediante lavados con etanol al 100% y solución de hipoclorito de sodio al 4% y posteriores enjuagues con agua destilada estéril hasta eliminar el olor a cloro. Posteriormente se eliminó el tejido externo (aprox. 2 mm) para exponer tejido interno del cual se tomó un gramo de tejido interno estéril y se hicieron diluciones seriadas decimales.

Las diluciones decimales de suelo, de la muestra de superficie de planta y de muestra del interior de planta se sembraron en medio mínimo MMS en placa con metanol al 0.5% (v/v) como fuente única de carbono. Las placas se dejaron incubar a 30 °C por 10-15 días, se seleccionaron las colonias crecidas y se sembraron nuevamente en MMS con metanol al 0.5% (v/v). Las colonias aisladas desarrolladas a los 10 días aproximadamente a 30 °C fueron conservadas en glicerol al 50% a -70 °C.

## **3. Caracterización fenotípica**

Las cepas de estudio fueron sometidas a observaciones microscópicas y pruebas conducentes a la caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica. Se emplearon pruebas estándar en las que se incluyen: tinción de Gram, morfología y movilidad, reacción de catalasa y oxidasa, pruebas bioquímicas, asimilación de diferentes fuentes de carbono, crecimiento diferencial a temperatura y pH distintos, crecimiento a diferentes salinidades y susceptibilidad a diferentes antimicrobianos.

### **3.1 Morfología microscópica**

El análisis morfológico de las colonias se llevó a cabo mediante la observación al microscopio estereoscópico. El empleo de la tinción de Gram permitió una primera caracterización de las cepas aisladas que fueron observadas al microscopio óptico con el objetivo 100X.

### **3.2 Morfología colonial**

Las características morfológicas en placa se observaron en medio sólido glicerol-peptona a pH=7. Las placas se incubaron hasta por 10 días.

### **3.3 Características bioquímicas y fisiológicas de los aislados**

Como medio base para el desarrollo y mantenimiento bacteriano así como para algunas de las pruebas fenotípicas se utilizó el medio de cultivo GP (Glicerol-peptona) (anexo 1) a pH 7. La temperatura de incubación para la mayoría de los experimentos fue de 30 °C hasta por 10 días.

### **3.3.1. Pruebas Bioquímicas**

Las diferentes pruebas bioquímicas de movilidad, catalasa, oxidasa, DNAasa, coagulasa, hidrólisis de esculina, almidón, gelatina y celulasa se realizaron mediante métodos convencionales (Koneman 2006).

Para las pruebas en las que se determinó el crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones de cultivo se utilizó el método de goteo en placa para el cual se realizaron diluciones seriadas 1:10 a partir de un cultivo de 48 h a 30 °C y se colocaron por triplicado gotas de 20 µl de cada una de las diluciones en placas con medio gelificado (Hoben *et al.* 1982). Las placas se incubaron en las condiciones de crecimiento correspondiente. Se determinó el número de colonias en las distintas diluciones y se realizaron los cálculos requeridos para determinar el número de UFC/ml.

### **3.3.2 Crecimiento en diferentes fuentes de carbono**

Para evaluar las fuentes de carbono asimilables por los microorganismos se realizaron pruebas de crecimiento bacteriano en medio mínimo adicionado con la fuente de carbono respectiva al 0.5% (w/v). Estas pruebas se llevaron a cabo contando por triplicado el número de unidades formadoras de colonia a partir de diluciones del cultivo empleando la técnica de conteo en placa (Hoben, *et al.* 1982). Los sustratos ensayados fueron los azúcares D (+) glucosa, sacarosa, melibiosa, D (+) xilosa, D (-) arabinosa, lactosa, dulcitol, D (+) galactosa y trehalosa y los ácidos orgánicos succínico y glucónico. Las placas se incubaron a 30°C por 10 días. Como control negativo utilizamos medio mínimo MMS sin fuente de carbono y como control positivo se utilizó medio glicerol-peptona (GP).

### **3.3.3. Determinación de condiciones óptimas de crecimiento**

El desarrollo bacteriano a diferentes condiciones de crecimiento se realizó en medio GP sólido sobre el cual se inocularon por triplicado diluciones decimales de cada una de las bacterias. Las condiciones que se probaron fueron temperatura, salinidad y pH óptimos de crecimiento.

#### **3.3.3.1 Crecimiento a diferentes temperaturas.**

Las temperaturas de crecimiento ensayadas fueron: 4, 20, 30, 37 y 50 °C en medio sólido glicerol peptona con incubación hasta 10 días. El crecimiento se determinó por triplicado mediante el método de conteo de colonia conteo en placa (Hoben *et al.*, 1982)

#### **3.3.3.2. Crecimiento bacteriano a diferentes pH**

Se probó la capacidad de crecimiento bacteriano en medio sólido GP a pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. El crecimiento se determinó por el método de conteo en placa después de un periodo de incubación a 30 °C por 10 días.

### **3.3.3.3. Tolerancia a la presencia de cloruro de sodio en el medio.**

Para probar la tolerancia a la salinidad de las cepas a caracterizar se ensayaron las siguientes concentraciones de NaCl 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% y 5% (w/v). Se inocularon por triplicado diluciones seriadas 1:10 por el método de conteo en placa (Hoben *et al.*, 1982). La incubación se realizó a 30°C hasta por 10 días y se determinaron las UFC/ml comparando el crecimiento bacteriano con el crecimiento en el medio glicerol-peptona sin cloruro de sodio.

### **3.3.4 Comportamiento antimicrobiano.**

La prueba de susceptibilidad a diferentes antibióticos se llevó a cabo por el método de difusión en agar (Bauer *et al.*, 1996). Se utilizaron los antibióticos ceftriaxona (30 µg/ml), ciprofloxacina (5 µg/ml), imipenem (10 µg/ml), trimetoprim/ sulfametoxazol (25 µg/ml), gentamicina (10 µg/ml), ceftazidima (30 µg/ml) y ampicilina (10 µg/ml). Los halos de inhibición se reportan de acuerdo a la bibliografía consultada y los diámetros seleccionados por los autores (Swenson *et al.*, 1995).

### **3.3.5 Crecimiento en metanol dependiente de Ca<sup>2+</sup> y Ce<sup>3+</sup>**

Se determinó el crecimiento de las bacterias metilotróficas en medio mínimo MMS (Anexo 2) adicionado con Ca<sup>2+</sup> o Ce<sup>3+</sup> como cofactores, ya que la enzima metanol deshidrogenasa MDH tiene dos variantes reportadas, la dependiente de PQQ y Calcio (variante heterotetramérica) y la MDH homodimérica dependiente de PQQ y REE (lantánidos o tierras raras) (Taubert *et al.* 2015).

Cultivos bacterianos crecidos en medio GP sólido (Anexo 1) por 4 días a 30 °C fueron lavados dos veces con MgSO<sub>4</sub> 10 mM y resuspendidos en 10 mL de la misma solución. Se inocularon de 4-5 µl de la suspensión bacteriana en 5 mL de MMS adicionado con CaCl<sub>2</sub> 30 µM o en MMS modificado con CeCl<sub>3</sub> 30 µM. Las células fueron incubadas en agitación a 30 °C durante 5 días. El crecimiento bacteriano fue determinado por absorbancia a 600 nm después de 72, 96, 120 y 144 h de incubación. Las medias de tres réplicas independientes fueron comparadas estadísticamente por t-student p < 0.05.

## **4. Caracterización genotípica**

La acumulación de información sobre la secuencia de varios genes de referencia ha impulsado el diseño de una gran variedad de métodos que se pueden aplicar al estudio de los microorganismos. La identificación de los microorganismos requiere necesariamente la secuenciación de regiones de valor taxonómico como son los genes que codifican para el RNA ribosómico que están suficientemente conservados (Larsen *et al.*, 1993).

Para determinar la identidad taxonómica de las bacterias metilotróficas se utilizó la secuencia de los genes conservados 16S rRNA y 23S rRNA.

### **4.1 Extracción de DNA genómico.**

El DNA genómico de los aislados fue extraído utilizando kit de purificación de DNA Wizard (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo 3).

#### **4.2 PCR para la amplificación del gen que codifica la subunidad 16S rRNA.**

El gen que codifica la subunidad 16S rRNA es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas (Rodicio *et al.*, 2004). Dicho gen es importante ya que presenta regiones muy conservadas y a la vez regiones variables, lo que proporciona suficiente diversidad genética para distinguir unas especies de otras (Woese 1987).

Se amplificó un fragmento de 1365pb (pares de bases) del gen que codifica la subunidad 16S rRNA usando los iniciadores UN27F (5' TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3') y el iniciador reverso UN1392R (5' CAG GGG CGG TGT GTA CA 3'); la mezcla de la reacción de PCR se ajustó con las siguientes concentraciones de reactivos en un volumen de 50 µl: 25 ng de DNA, 2.5 U de Taq DNA polimerasa, 200 µM de cada dNTP's, 10 µM de cada iniciador y 67 mM de Buffer. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystem) usando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95 °C por 3 minutos, 26 ciclos que consistían en: separación de las hebras de la doble hélice de DNA por calentamiento a 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), alineamiento 57 °C por 45 segundos, y extensión del iniciador 72 °C por 1 minuto; la extensión final fue de 72 °C por 10 minutos.

Para la corrección de las secuencias del gen 16S rRNA diseñamos un oligonucleótido reverso que amplifica desde las 700 pb para poder completar la secuencia de la región media del gen. La secuencia de este nuevo oligonucleótido 16S700REV es la siguiente: 5'AGG GTA TCT AAT C 3'

#### **4.3 Amplificación del gen que codifica la subunidad 23S rRNA.**

El gen que codifica la subunidad 23S rRNA a diferencia del gen 16S rRNA contiene regiones mayores de secuencias características debido a su mayor longitud, inserciones y/o deleciones únicas, y posiblemente mejor resolución filogenética por su mayor variación de secuencias (Ludwing y Schleifer 1994). Estudios recientes indican que el gen que codifica la subunidad 23S rRNA también contiene regiones conservadas para el diseño de un amplio rango de oligonucleótidos con un grado similar de universalidad que el amplio rango de oligonucleótidos diseñados para el gen 16S rRNA (Hunt *et al.*, 2006).

Diseñamos varios pares de oligonucleótidos a partir de alineamientos de secuencias nucleotídicas del gen 23S rRNA de diversas bacterias pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos y con el siguiente par se lograron obtener productos de amplificación: 2260R 5'CGA CAA GGA ATT TCG CTA C 3' y 930F 5'TAK CTS GTT CTC YCC GAA 3' (anexo 9), a una concentración de 10 pM. Con este par de oligonucleótidos se logra amplificar parcialmente el gen 23S rRNA obteniendo 1300 pb aproximadamente. Se emplearon las mismas concentraciones de reactivos con las que amplificamos el gen que codifica la subunidad 16S rRNA y el programa de PCR para este par de oligonucleótidos fue el siguiente:

desnaturalización inicial 95 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos que consistían en: separación de las hebras de la doble hélice de DNA por calentamiento a 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), alineamiento a 50 °C por 45 segundos, y extensión a 72 °C por 1 minuto; la extensión final fue de 72 °C por 10 minutos.

Los amplicones para ambos genes se observaron en geles de agarosa al 1% y posteriormente se llevó a cabo su purificación utilizando el kit comercial High Pure PCR Cleanup Micro Kit, de Roche.

Las secuencias obtenidas por parte de la unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, fueron editadas mediante EditSeq y fueron comparadas por BLAST

con las incluidas en la base de datos de GeneBank.

La información de las secuencias con mayor similitud, cobertura y menor e-value se utilizó para recabar secuencias de 16S rRNA del mismo grupo taxonómico. Las secuencias fueron alineadas mediante ClustalW y posteriormente se generaron árboles filogenéticos utilizando algoritmo de Neighbor-Joining con Bootstrapping usando 500 iteraciones (MEGA 7.0).

#### 4.4 Determinación de genes que codifican para la enzima metanol deshidrogenasa.

Se buscó la presencia del gen asociado a la oxidación del metanol a partir de las cepas aisladas en este trabajo mediante amplificación e hibridación tipo Dot Blot (Southern 1975).

##### 4.4.1 PCR para amplificar genes involucrados en la metilotrofia.

En la búsqueda de los *loci* asociados a la metilotrofia utilizamos diferentes oligonucleótidos diseñados para los siguientes genes que codifican enzimas metanol deshidrogenasas:

- El par de oligonucleótidos *mxaf* 1003 y *mxar* 1561 diseñados por Murrell y Mc Donald (1997) para amplificar el gen *mxaf* en alfa-proteobacterias.
- El par de oligonucleótidos degenerados *mxaf* 916 y *mxar* 1360 que se diseñaron en este trabajo alineando secuencias de oligonucleótidos del gen *mxaf* de diferentes grupos taxonómicos.
- El par NDMA 270f y NDMA 850r (De Boer *et al.*, 1990) utilizados para amplificar el gen *mno* que codifica para la metanol deshidrogenasa dependiente de NDMA (N,N'-dimetil-4-nitrosoanilina oxidoreductasa) en Actinobacterias.
- Los oligonucleótidos *mxafxoxFf916* y *mxafxoxFr1360* diseñados para amplificar preferentemente los genes *mxaf*, *xoxF4* y *xoxF5*. El diseño de estos oligonucleótidos se basó en alineamientos de secuencias públicas.

**Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para enzimas metanol deshidrogenasas.**

Primer *	Secuencia (5'-3')	Blanco	Referencia
<i>mxaf</i> f1003 <i>mxar</i> r1561	GCG GCA CCA ACT GGG GCT GGT GGG CAG CAT GAA GGG CTC CC	<i>mxaf</i>	Mc Donald <i>et al.</i> , 1996.
<i>mxaf</i> 916 <i>mxar</i> 1360	GGC GAC AAC AAG TGG WCS ATG ART CCA TRC ARA YGT GGT T	<i>mxaf</i>	Este trabajo
NDMA 270f NDMA850r	CCC AAG GAC TAC AAC GTC AT CCS AGN CCR CCS GAG TTG AA	<i>mno</i>	De Boer <i>et al.</i> , 1990
<i>xoxF</i> 361f <i>xoxF</i> 603r	CAG GAT CCG TCC GTG AT SGA GAT GCC GAC GAT	<i>xoxF M. extorquens</i>	Este trabajo
<i>mxafxoxF</i> 916f <i>mxafxoxF</i> 1360r	GGC GAC AAC AAG TGG WCG ATG AGT CCA TGC AGA CRT GGT T	<i>mxaf</i> , <i>xoxF4</i> , <i>xoxF5</i>	Este trabajo

\*Los números indican la posición aproximada de los oligonucleótidos en el gen.

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados utilizando el kit comercial High Pure PCR Cleanup Micro Kit, de Roche y enviados a secuenciar a la Unidad de Síntesis y secuenciación del IBT-UNAM.

#### 4.4.2. Hibridación Dot blot para detectar el gen que codifica para la enzima metanol deshidrogenasa

El DNA genómico de las cepas metilotróficas fue transferido a membranas de nylon para realizar hibridación tipo dot blot (Southern 1975), utilizando 1 µg of DNA por cada pozo, como control positivo utilizamos 100 ng de DNA genómico de la cepa tipo *M. extorquens* JCM2802, como control negativo 1 µg of DNA genómico de *U. maydis* 207. Las sondas fueron obtenidas por amplificación por PCR a partir del DNA genómico de la cepa tipo *Methylobacterium extorquens* JCM2802 con los oligonucleótidos mxaf 1003 y mxar 1561 (Mac Donald y Murray, 1997) para amplificar *mxaf* y con los oligonucleótidos xoxFf361 y xoxFr603 para amplificar *xoxF*. Las sondas fueron marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y oligonucleótidos aleatorios (Amersham Rediprime II DNA Labeling System, GE Healthcare). La prehibridación e hibridación se llevaron a cabo a 65°C por 12 h usando el kit comercial Rapid Hyb buffer (GE Healthcare). Las hibridaciones se realizaron utilizando 100 ng de sonda. Las membranas fueron lavadas en condiciones de alta astringencia [2X SSC (1X SSC consiste de NaCl 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M) más SDS 0.1% por 10 min; 1X SSC más SDS 0.1% por 15 min; 0.5X SSC más SDS 0.1% por 15 min; 0.1X SSC más SDS 0.1% por 15 min; 0.1X SSC más SDS 0.1% a 65°C por 30 min y finalmente el SDS fue removido con 0.1X SSC] (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 4.5 Análisis de Secuencias

Las secuencias del gen *xoxF* fueron traducidas (<http://www.fr33.net/translator.php>) y la secuencia de aminoácidos se comparó con las secuencias de proteínas de la base de datos utilizando BLASTP. El resultado se utilizó para identificar secuencias con alta similitud entre ellas. Las secuencias fueron alineadas con el programa Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). La filogenia fue inferida por el método de máxima probabilidad con la secuencia deducida de aminoácidos. Se determinaron de manera preliminar árboles filogenéticos por medio de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ (Jones *et al.*, 1992) a una matriz de distancias apareadas y posteriormente seleccionando la topología con valor mayor de probabilidad. Todos los análisis de las secuencias se llevaron a cabo con el programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.* 2016). Con el fin de lograr un mejor agrupamiento visual todos los árboles filogenéticos se presentan enraizados con una secuencia lo suficientemente distante para considerarse como grupo externo.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A partir de tres individuos de la cactácea *N. macrocephala* se obtuvieron 73 aislados metilotróficos facultativos capaces de crecer en medio MMS (medio con sales minerales y metanol al 0.5 %), así como en medios ricos. Los aislamientos provenientes de la región rizosférica representaron el 32.9 %, los de la endófitica el 41.1 % y los de la región epífita el 26.0 % (Tabla2).

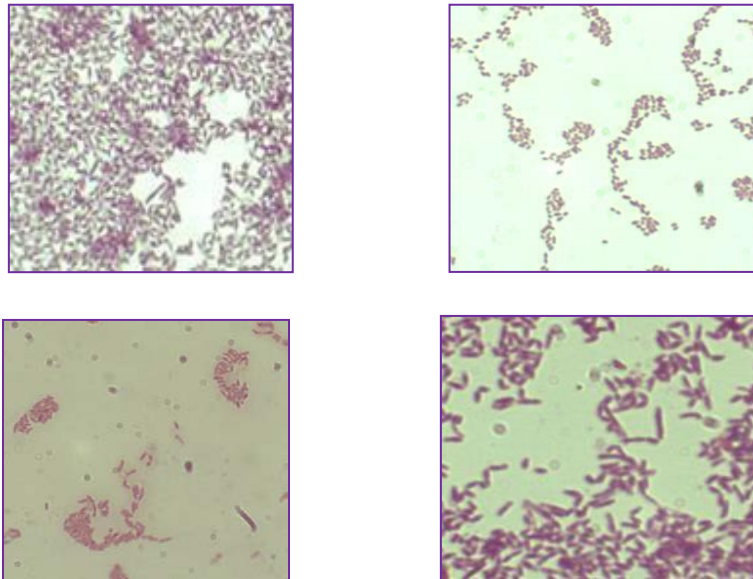
El crecimiento de las bacterias metilotróficas en medio MMS-metanol típicamente es muy lento variando entre 7 y 15 días, por lo que los ensayos nometilotróficos se realizaron en el medio glicerol-peptona(GP).

### Caracterización Fenotípica.

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas.

### Morfología microscópica

La morfología microscópica que mostraron las bacterias con la tinción de Gram fue muy diversa y entre las formas que observamos se incluyen bacterias bacilares, cocos y pleomórficas de diferentes tamaños (Fig. 4)



**Figura 4.** Morfología microscópica de algunas de las bacterias aisladas de *N. macrocephala*, observadas con tinción de Gram por microscopía óptica.

El número total de aislamientos bacterianos de *N. macrocephala* agrupados por sitio de aislamiento en la planta y respuesta a la tinción de Gram se resume en la Tabla 2.

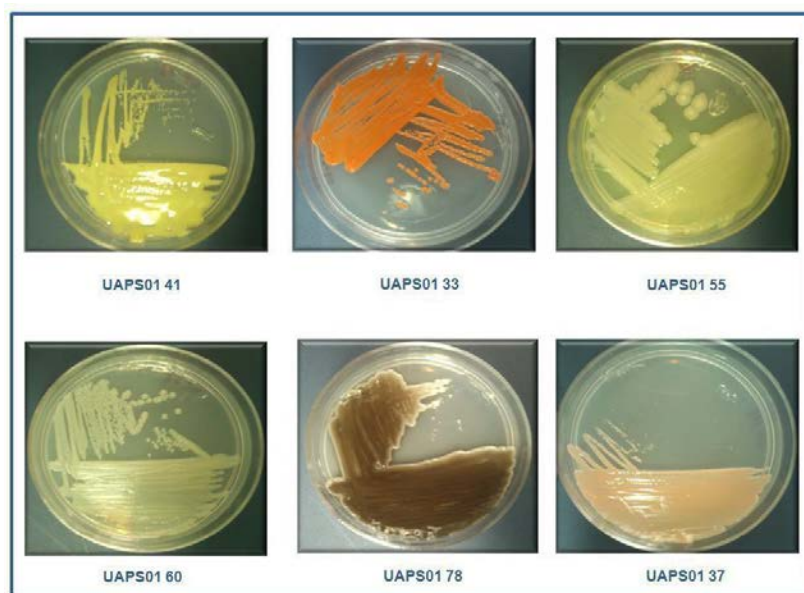
**Tabla 2. Procedencia de los aislamientos metilotróficos.**

Sitio en Planta	Aislamientos	Gram-negativos	Gram-positivos	Gramvariable
Región rizosférica	24	18	4	2
Región epífita	30	8	22	0
Región endófito	19	13	6	-
<b>Total</b>	<b>73</b>	<b>39</b>	<b>32</b>	<b>2</b>

### Morfología colonial

En medio sólido MMS las colonias aisladas de bacterias metilotróficas son muy pequeñas aproximadamente de  $\leq 1$  mm de diámetro y son blancas traslúcidas con una muy ligera pigmentación amarilla, anaranjada o rosa para algunas de las cepas.

Las cepas presentaron características fenotípicas muy diversas de color, consistencia, bordes, aspecto, y tamaño, como fue posible observar en las diferentes pruebas que se realizaron tanto en medio sólido glicerol-peptona (GP, Fig. 5), como en las diferentes pruebas bioquímicas.



**Figura 5.** Fenotipos diferentes observados en medio sólido glicerol-peptona (GP). Aislamientos bacterianos recuperados de *N. macrocephala*

## **Características bioquímicas y fisiológicas de los aislados**

### **Pruebas Bioquímicas**

Aunque en total se obtuvieron 73 aislamientos, sólo se realizaron pruebas fenotípicas con 66 ya que siete cepas fueron purificadas posteriormente. En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas a las 66 cepas nombradas con la nomenclatura correspondiente al número de aislamiento recuperado y anteponiendo la clave UAPS01.

**Tabla 3. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos.**

<b>Aislado</b>	<b>catalasa</b>	<b>oxidasa</b>	<b>ureasa</b>	<b>movilidad</b>	<b>DNAsa</b>	<b>coagulasa</b>	<b>esculina</b>	<b>gelatina</b>	<b>celulasa</b>	<b>almidón</b>	<b>caseína</b>	<b>nitros/nitritos</b>
UAPS01-01	+	-	-	+	-	50%	+	+	50%	+	-	+
UAPS01-02	+	-	-	+	-	50%	+	+	50%	+	-	+
UAPS01-03	+	-	-	+	-	50%	+	+	50%	+	-	+
UAPS01-04	+	-	-	+	-	-	+	+	50%	50%	-	+
UAPS01-05	+	-	-	-	-	50%	+	+	50%	50%	-	+
UAPS01-06	+	-	-	-	-	-	+	+	-/50%	50%	-	+
UAPS01-07	+	-	-	-	-	-	+	+	50%	50%	-	+
UAPS01-08	+	-	-	-	-	-	+	+	50%	+	-	+
UAPS01-12	+	-	-	-	-	-	+	+	50%	+	-	+
UAPS01-13	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
UAPS01-14	-	-	-	-	-	-	50%	+	-	50%	-	+
UAPS01-15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-
UAPS01-16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-
UAPS01-17	+	-	-	+	-	-	+	+	-/50%	+	-	/50%
UAPS01-18	+	-	-	+	-	-	+	+	-/50%	+	-	/50%
UAPS01-19	-	-	-	-	-	-	+	+	50%	+	-	+
UAPS01-20	+	-	-	-	-	-	-50%	+	-	-50%	-	-
UAPS01-21	+	-	-	-	-	-	-50%	+	-	-50%	-	-
UAPS01-22	+	-	-	-	-	-	-50%	50%	-	-50%	-	-
UAPS01-23	+	-	-	-	-	50%	-50%	50%	-	-50%	-	-
UAPS01-26	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-50%	-	50%
UAPS01-27	+	-	+	+	-	-50%	+	+	+	+	-	50%
UAPS01-29	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	50%
UAPS01-30	+	-	-	-	-	-	+	+	50%	+	-	50%
UAPS01-31	+	-	-	-	-	-50%	+	+	50%	+	-	50%
UAPS01-32	+	-	-	-	-	-50%	+	+	50%	+	-	50%
UAPS01-33	+	-	-	-	-	-50%	+	+	+	+	-	50%
UAPS01-34	+	-	-	-	-	-50%	+	+	-	-50%	-	50%
UAPS01-35	+	-	-	-	-	-50%	-	50%	-	-50%	-	-
UAPS01-36	+	-	-	-	-	-	-	50%	-	-50%	-	-
UAPS01-37	+	-	-	-	-	-	-	50%	50%	+	-	50%
UAPS01-39	+	-	-	-	-	-	+	+	-50%	50%	-	50%
UAPS01-40	+	-	-	-	-	-	50%	+	-	50%	-	50%
UAPS01-41	+	-	-	-	-	-	+	+	-	50%	-	+
UAPS01-42	+	-	-	-	-	-	-50%	50%	-	50%	-	-
UAPS01-44	+	-	-	-	-	-50%	+	+	-	50%	-	+
UAPS01-45	+	-	-	+	-	-	+	+	-	50%	-	-

Aislado	Cat.	Oxi.	Ure.	Mov.	DNAasa	Coag.	E .	G.	Cel.	Alm.	Cas.	Nitr.nitri.
UAPS01-46	+	-	-	-	-	50%	+	+	+	+	-	+
UAPS01-47	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
UAPS01-48	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
UAPS01-49	+	-	-	+	-	-50%	+	+	-	+	-	-
UAPS01-50	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
UAPS01-52	+	-	-	-	-	50%	+	+	50%	+	-	+
UAPS01-53	+	-	-	-	-	50%	+	+	50%	+	-	+
UAPS01-54	+	-	-	-	-	50%	+	+	50%	+	-	-
UAPS01-55	+	+	-	+	-	50%	+	+	-	50%	-	50%
UAPS01-56	+	-	-	+	-	50%	+	+	-50%	50%	-	50%
UAPS01-58	+	-	-	+	-	-	+	+	-50%	+	-	50%
UAPS01-59	+	-	-	-	-	-	+	+	-50%	+	-	50%
UAPS01-60	+	-	-	-	-	-	-50%	+	-	50%	-	-
UAPS01-61	+	-	-	-50%	-	-	+	+	-	50%	-	+
UAPS01-62	+	-	-	-50%	-	-	+	+	-	50%	-	+
UAPS01-63	+	-	-	-50%	-	-	+	+	-	50%	-	+
UAPS01-64	+	-	-	-50%	-	-	+	+	-	+	-	+
UAPS01-65	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
UAPS01-66	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
UAPS01-67	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
UAPS01-68	+	-	-	-50%	-	-	+	+	-	+	-	+
UAPS01-69	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
UAPS01-72	+	-	-	-	-	+	+	+	-50%	50%	-	50%
UAPS01-74	+	-	-	-	-	+	+	+	-50%	50%	-	50%
UAPS01-77	+	-	-	-	-	-	+	+	-50%	50%	-	+
UAPS01-78	+	-	-	-	-	-	+	+	-50%	50%	-	+
UAPS01-112	+	-	-	-	-	-	+	+	+	50%	-	+
UAPS01-113	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
UAPS01-114	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-

(+) reacción positiva; (-) reacción negativa; (50%) reacción positiva al 50%; (-/50%) reacción positiva menor al 50%.

Mediante el patrón bioquímico derivado de las pruebas fenotípicas se obtuvo un primer reconocimiento taxonómico de los microorganismos a nivel de género (Tabla 4). Dicho resultado se corrobora por los resultados de la secuenciación de los genes ribosomales relacionados a las subunidades 16S y 23S.

**Tabla 4. Identificación de cepas por comportamiento bioquímico.**

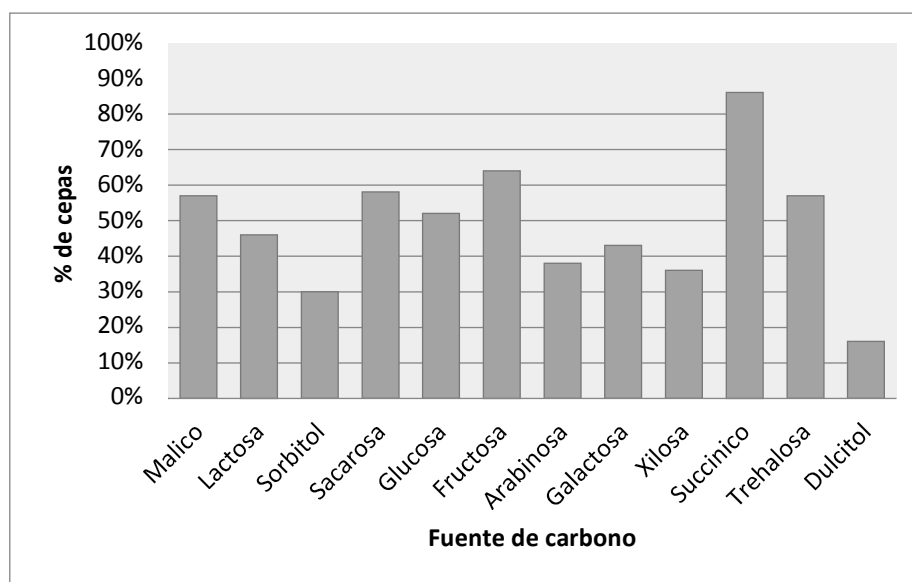
<b>Aislamiento</b>	<b>Asignación a nivel de género</b>
UAPS01-01	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-02	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-03	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-04	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-05	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-06	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-07	ND
UAPS01-08	<i>Streptomyces</i> sp.
UAPS01-12	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-13	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-14	<i>Rhodoferax</i> sp.
UAPS01-15	<i>Sphingomonas</i> sp.
UAPS01-16	<i>Bacillus</i> sp.
UAPS01-17	<i>Acidithiobacillus</i> sp.
UAPS01-18	<i>Acidithiobacillus</i> sp.
UAPS01-19	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-20	ND
UAPS01-21	<i>Sphingomonas</i> sp.
UAPS01-22	<i>Rhodospirillum</i> sp.
UAPS01-23	<i>Rhodospirillum</i> sp.
UAPS01-26	<i>Flavobacterium</i> sp.
UAPS01-27	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-29	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-30	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-31	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-32	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-33	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-34	<i>Arthrobacter</i> sp.
UAPS01-35	<i>Deinococcus</i> sp.
UAPS01-36	<i>Deinococcus</i> sp.
UAPS01-37	<i>Deinococcus</i> sp.

<b>Aislamiento</b>	<b>Asignación a nivel de género</b>
UAPS01-39	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-40	<i>Rhodoferax</i> sp.
UAPS01-41	<i>Rhodoferax</i> sp.
UAPS01-42	<i>Sphingomonas</i> sp.
UAPS01-44	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-45	<i>Acidithiobacillus</i> sp.
UAPS01-46	<i>Streptomyces</i> sp.
UAPS01-47	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-48	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-49	<i>Acinetobacter</i> sp.
UAPS01-50	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-52	<i>Streptomyces</i> sp.
UAPS01-53	<i>Streptomyces</i> sp.
UAPS01-54	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-55	<i>Pseudomonas</i> sp.
UAPS01-56	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-58	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-59	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-60	<i>Rhizobium</i> sp.
UAPS01-61	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-62	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-63	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-64	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-65	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-66	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-67	ND
UAPS01-68	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-69	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-72	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-74	ND
UAPS01-77	<i>Arthrobactersp.</i>
UAPS01-78	<i>Arthrobactersp.</i>

<u>Aislamiento</u>	<u>Asignación a nivel de género</u>
UAPS01-112	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-113	<i>Nocardia</i> sp.
UAPS01-114	<i>Nocardia</i> sp.

## Crecimiento en diferentes fuentes de carbono

Los aislamientos crecieron de manera diferencial en las fuentes de carbono probadas (Fig. 6). De ellas las menos utilizadas fueron el dulcitol y el sorbitol con un 16% y un 30% de aislamientos, respectivamente. El ácido succínico fue la fuente de carbono más utilizada (86% de las cepas). Con base a estos resultados todos los aislamientos son considerados como metilotróficos facultativos por su capacidad metabólica de utilizar además de compuestos C1 otras fuentes multicarbonadas (Lidstrom, 1992). En el caso particular de la utilización del ácido succínico, posiblemente bacterias obtenidas en este estudio podrían estarlo utilizando en su ambiente tal como ha sido reportado en otras plantas (Kamilova *et al.*, 2006).

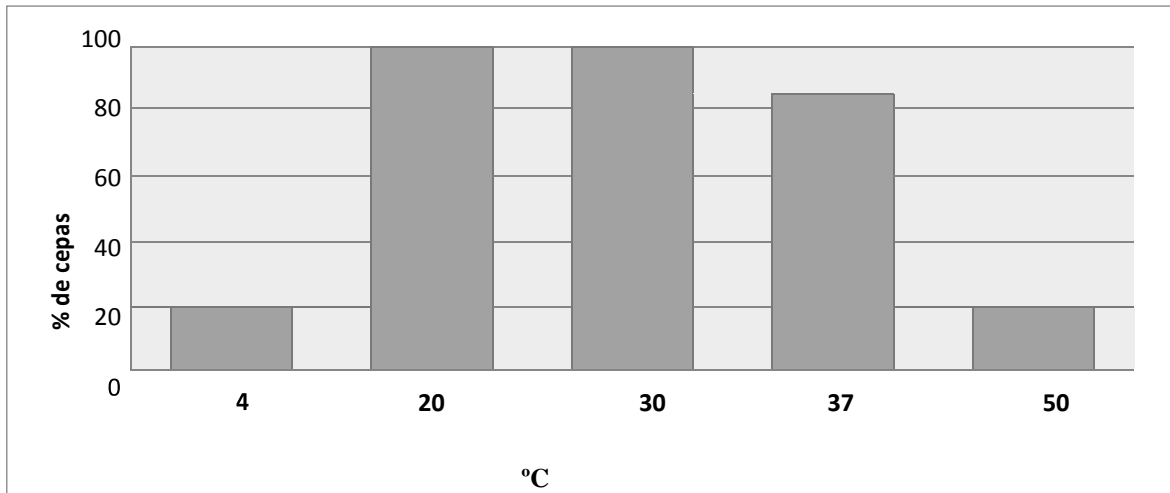


**Figura 6. Crecimiento con diferentes fuentes de C.** Fuentes de carbono utilizadas, las barras indican el porcentaje de cepas que utilizaron las distintas fuentes de carbono.



## Crecimiento a diferentes temperaturas

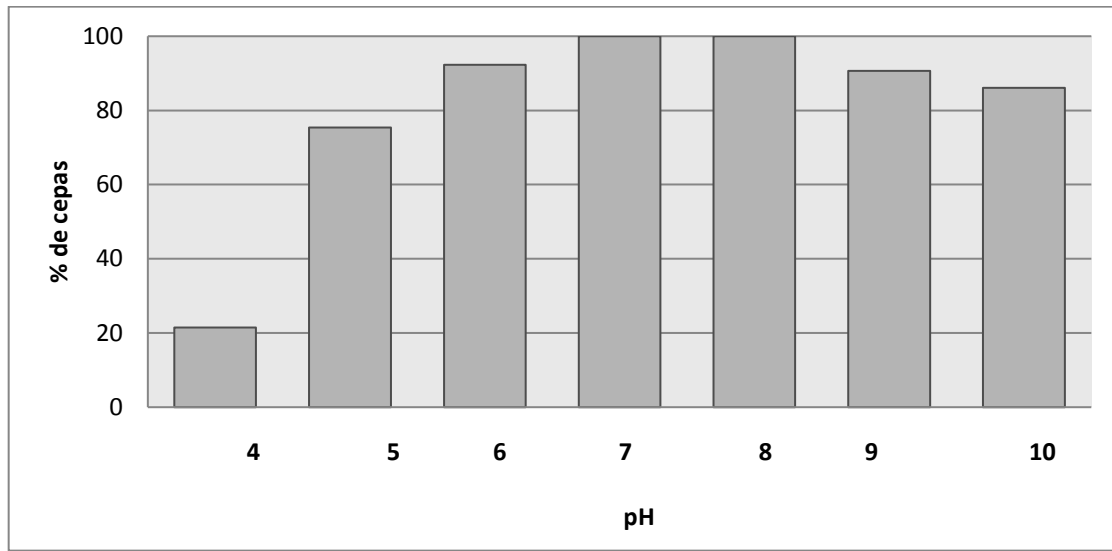
El rango de temperatura óptimo de crecimiento de la mayoría de las bacterias metilotróficas aisladas fue entre 20 y 37 °C por lo que entran dentro de la clasificación de mesófilas. Sin embargo, 14 cepas (20%) también mostraron crecimiento a 4 °C y 12 cepas (16.9%) a 50 °C (Fig. 7).



**Figura 7. Crecimiento a diferentes temperaturas.** Las barras representan el porcentaje de cepas bacterianas que crecieron a las temperaturas que se indican en la gráfica.

### Crecimiento bacteriano a diferentes valores de pH

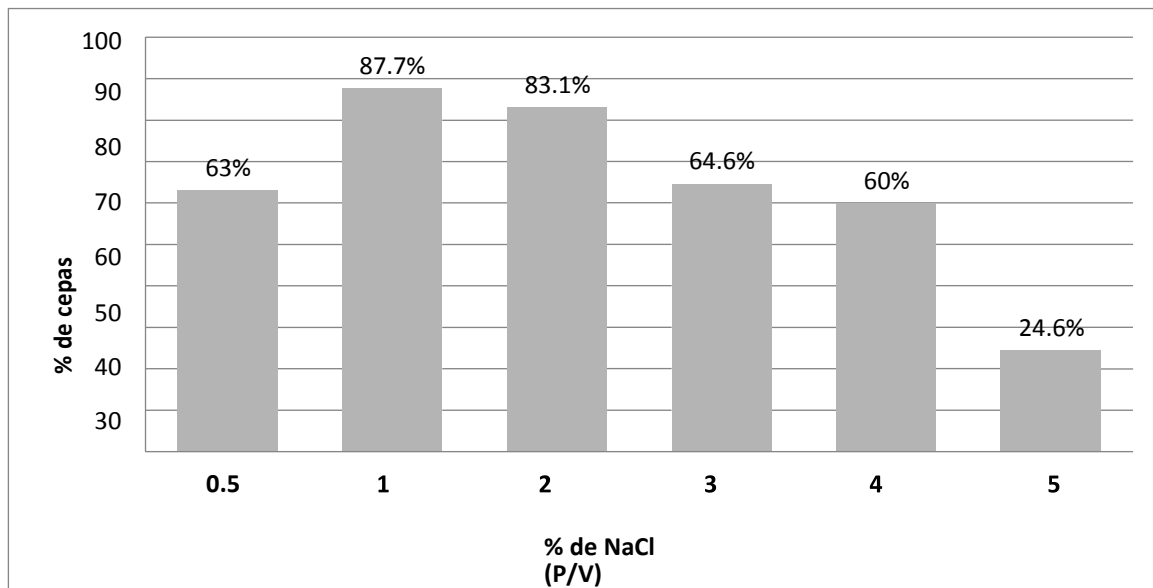
El pH en el que se desarrollan la gran mayoría de los aislamientos presenta amplios márgenes, oscilando entre 5 y 10 unidades (Fig. 8). Es importante destacar que 14 cepas (21.5%) fueron capaces de crecer a pH4.



**Figura 8. Crecimiento a diferentes valores de pH.** Se muestra en la gráfica el porcentaje de cepas que crecieron a los diferentes valores de pH analizados

### Tolerancia a la presencia de cloruro de sodio en el medio

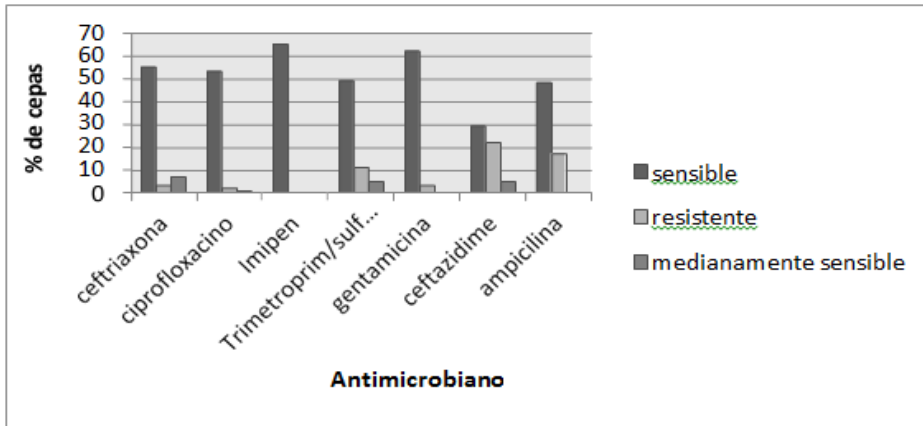
Con respecto a la tolerancia a la salinidad un 43% de las bacterias aisladas soportaron concentraciones de cloruro de sodio superiores a la salinidad del agua de mar ( $\geq 0.46$  M o 2.7% de NaCl). Solo un 25% aproximadamente de los aislados toleran una concentración de NaCl de 5% (0.85 M) (Fig. 9), sin embargo, todas se clasifican como bacterias halotolerantes.



**Figura 9. Tolerancia a NaCl.** La gráfica muestra el porcentaje de cepas que pueden crecer a las diferentes concentraciones de NaCl que se probaron.

## Comportamiento frente a diferentes antimicrobianos

La gran mayoría de los aislados bacterianos mostraron sensibilidad a los antimicrobianos probados, particularmente al imipenem al cual el 100% de los aislados fueron sensibles (Fig. 10). Con respecto a los otros antimicrobianos se observa que hay un porcentaje muy bajo de resistencia a ceftazidima (cefalosporina), a ampicilina (beta-lactámico) y a trimetoprim/sulfometoxazol.



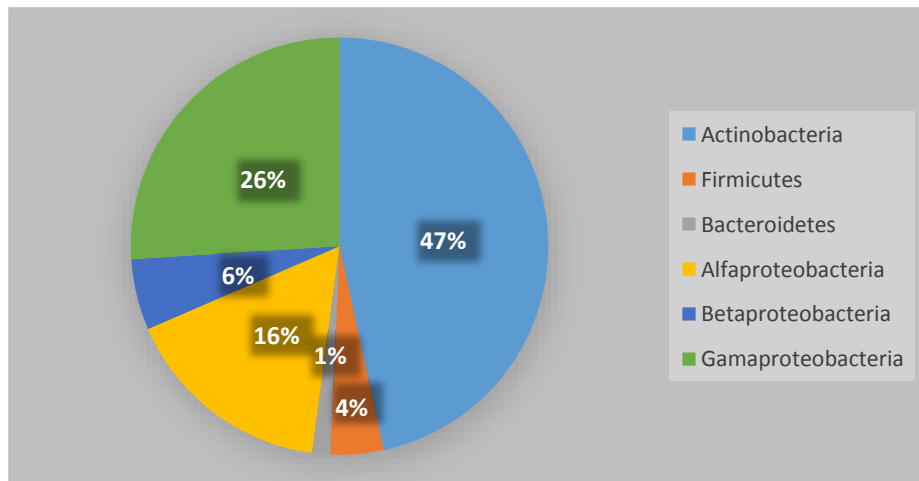
**Figura 10. Respuesta a los antimicrobianos.** Gráfica obtenida a partir de los halos de inhibición reportados de acuerdo a la bibliografía consultada y los diámetros seleccionados por los autores (Swenson *et al.* 1995).

## Taxonomía por secuencia de genes ribosomales

### Análisis de las secuencias del gen 16S rRNA

Los resultados de la comparación de las secuencias 16S rRNA ubicaron a los aislados en distintos géneros de los grupos microbianos Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Alfa proteobacteria, Beta proteobacteria y Gama proteobacteria (Figs. 11, 11A-11L y Tabla 5).

**Figura 11. Distribución taxonómica de los aislamientos\*.**



\*Basada en secuencia del gen 16S rRNA

**Tabla 5. Asignación taxonómica por secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA**

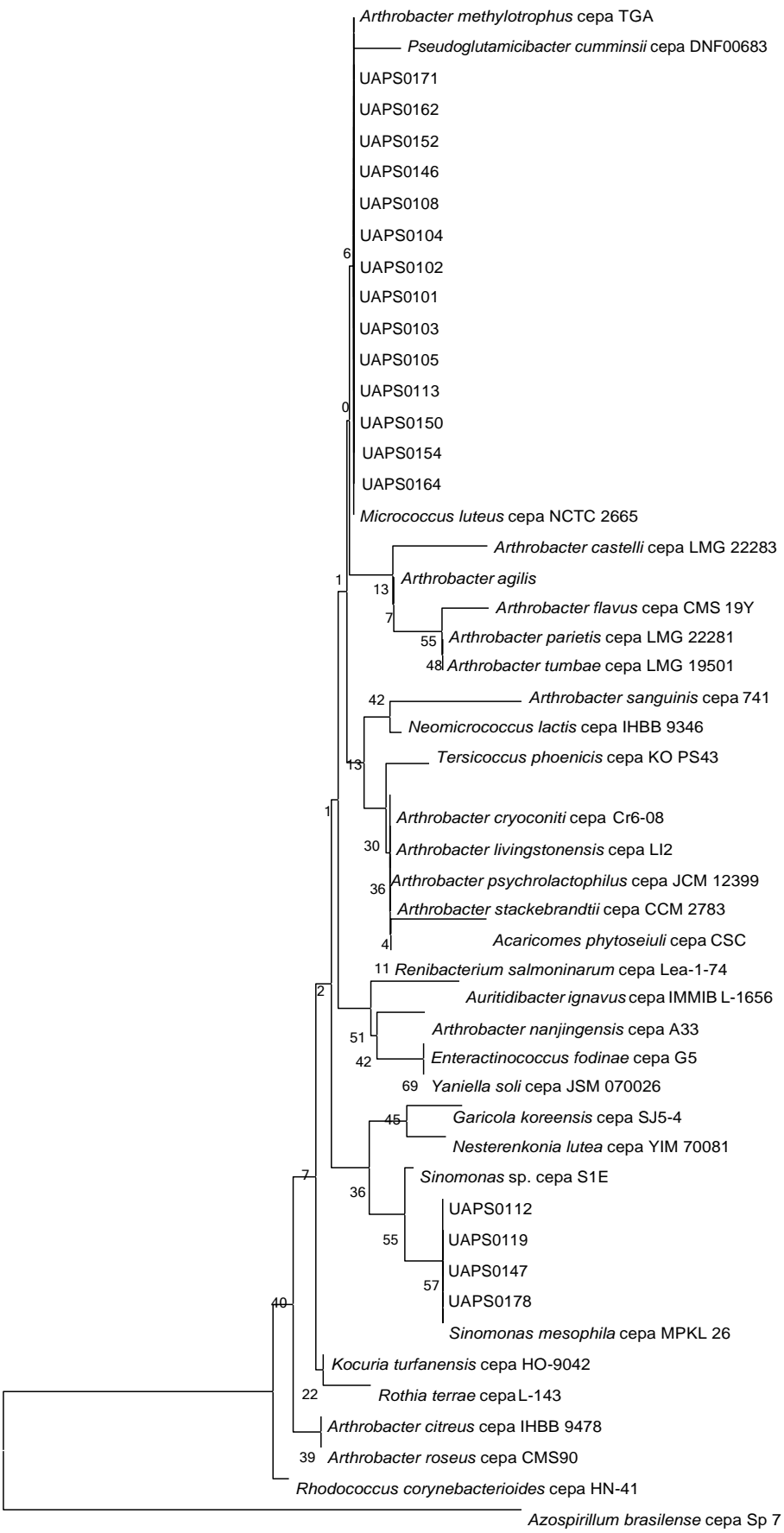
Género	Número de cepas	Grupo Taxonómico
<i>Arthrobacter</i>	13	Actinobacteria
<i>Cellulomonas</i>	3	Actinobacteria
<i>Microbacterium</i>	1	Actinobacteria
<i>Lysinomonas</i>	1	Actinobacteria
<i>Modestobacter</i>	3	Actinobacteria
<i>Nocardioides</i>	2	Actinobacteria
<i>Rhodococcus</i>	6	Actinobacteria
<i>Sinomonas</i>	4	Actinobacteria
<i>Staphylococcus</i>	2	Firmicutes
<i>Cohnella/Thermobacillus</i>	1	Firmicutes
<i>Pedobacter</i>	1	Bacteroidetes
<i>Microvirga</i>	5	Alfaproteobacteria
<i>Inquilinus</i>	2	Alfaproteobacteria
<i>Methylobacterium</i>	2	Alfaproteobacteria
<i>Rhizobium</i>	1	Alfaproteobacteria
<i>Sphingomonas</i>	1	Alfaproteobacteria
<i>Subaequorebacter/Geminicoccus</i>	1	Alfaproteobacteria
<i>Massilia</i>	4	Betaproteobacteria
<i>Acinetobacter</i>	18	Gamaproteobacteria
<i>Pseudomonas</i>	1	Gamaproteobacteria

Los organismos aislados fueron agrupados taxonómicamente a los Phyla Actinobacteria, Proteobacteria (Alfa, Beta y Gama), Firmicutes y Bacteroidetes. Siendo Actinobacteria el grupo taxonómico con mayor cantidad de aislamientos (Fig. 11).

A continuación se muestran los árboles filogenéticos generados a partir de los alineamientos de secuencias de aminoácidos de base de datos y la secuencias deducidas del gen 16S rRNA.

## Phylum Actinobacteria

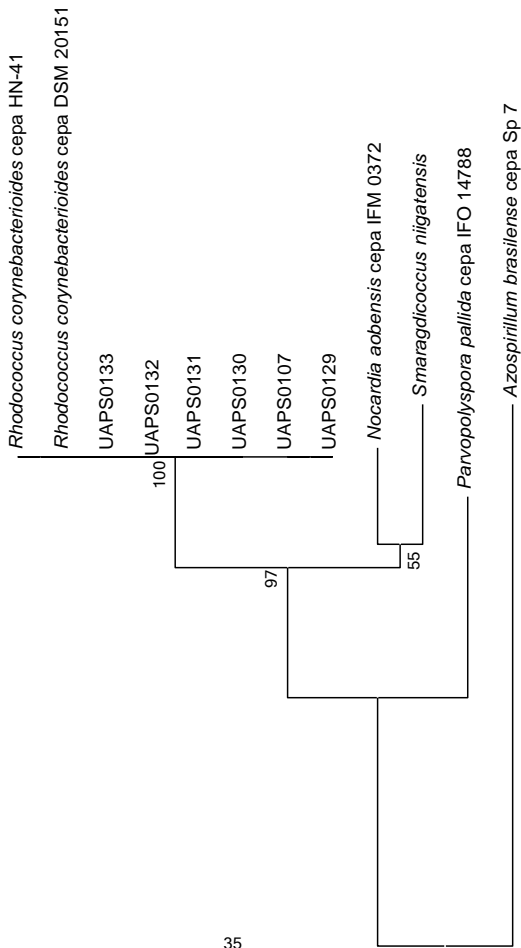
Este grupo taxonómico es el más abundante dentro de nuestros aislados con un 46.6% del total de bacterias recuperadas. Obtuvimos representantes de seis familias pertenecientes a este taxón, la familia Micrococcaceae con los géneros *Arthrobacter* y *Sinomonas*, familia Nocardiaceae con el género *Rhodococcus*, familia Nocardioidaceae con el género *Nocardioides*, familia Cellulomonadaceae con el género *Cellulomonas*, la familia Microbacteriaceae con los géneros *Microbacterium* y *Lysinimonas*, y la familia Geodermatophilaceae con el género *Modestobacter* (Figs. 12A-12F y Tabla 5). El grupo *Actinobacteria* es de los más abundantes en BSC de zonas áridas, y en suelos y rizósfera de estas regiones (Abed *et al.*, 2012; Cary *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2001; Kuske *et al.*, 1997; Moria *et al.*, 2005; Steven *et al.*, 2014). Estos microorganismos y en particular los del género *Arthrobacter*, poseen características adaptativas que los hacen resistentes a condiciones adversas, por lo que pueden permanecer y ser competitivos en regiones áridas y semiáridas (Dsouza *et al.*, 2015). De manera semejante a nuestro resultados, en diferentes cactáceas de la región Tehuacán- Cuicatlán se detectó abundancia de los grupos taxonómicos Actinobacteria y Proteobacteria (Aguirre *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2012).



0.020

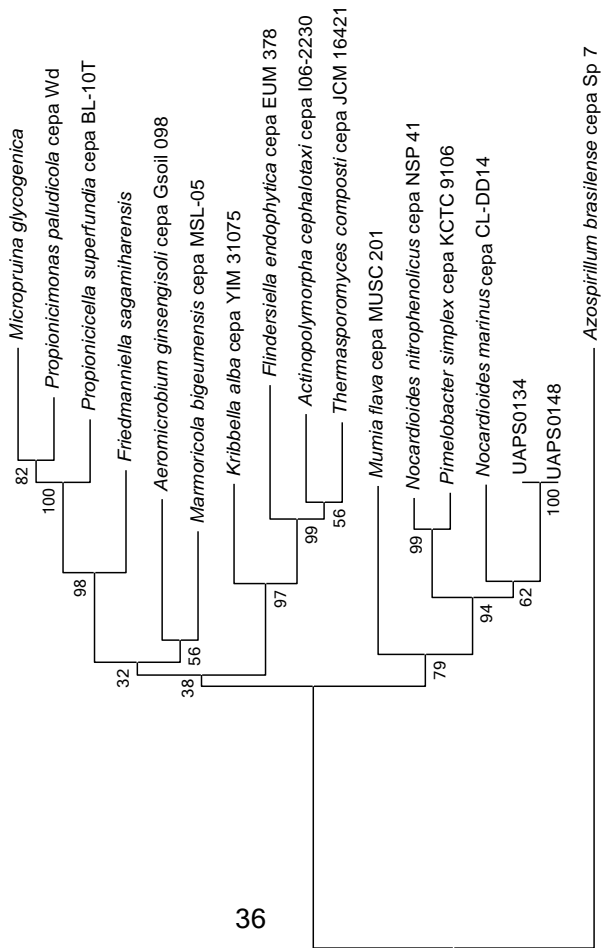
**Figura 12A.** Familia Micrococcaceae



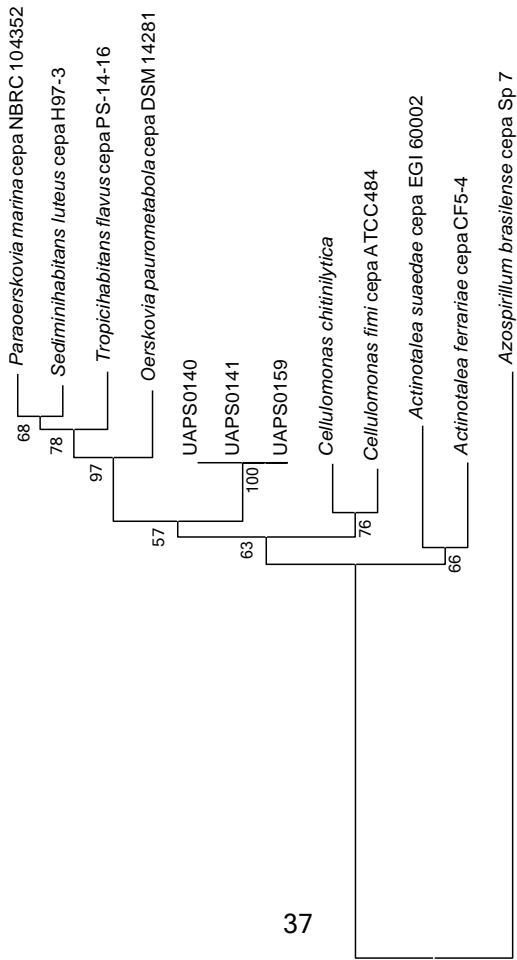


**Figura 12B.** Familia Nocardiaceae

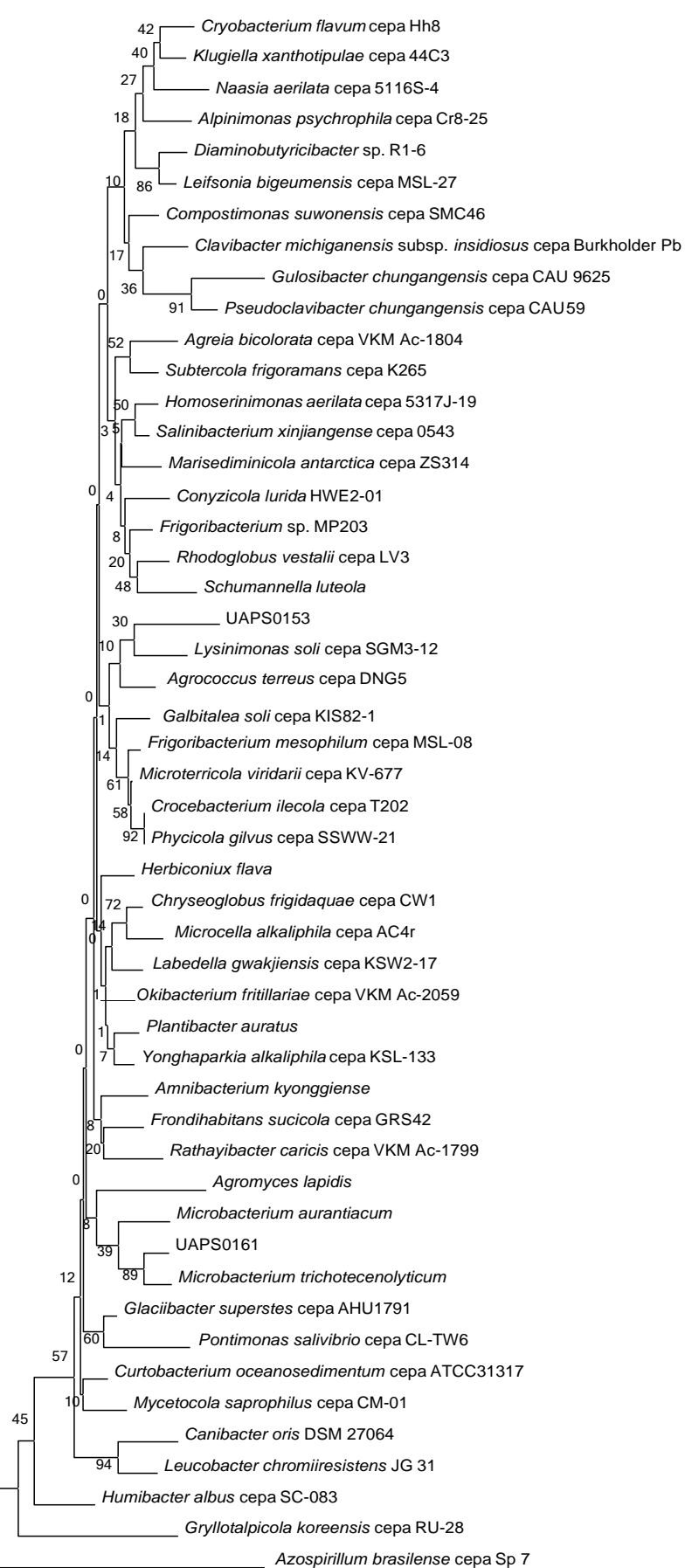
0.020



**Figura 12C.** Familia Nocardioidaceae

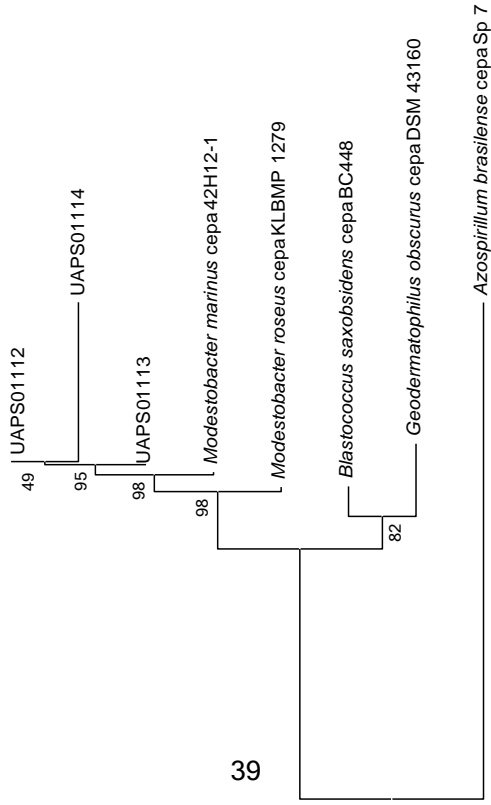


**Figura 12D.** Familia Cellulomonadaceae



0.020

Figura 12E. Familia Microbacteriaceae



0.050

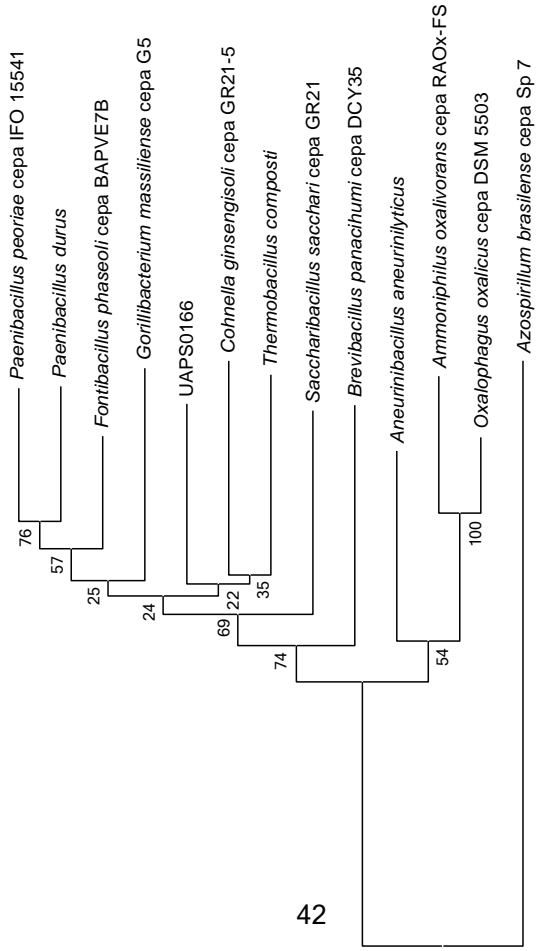
**Figura 12F.** Familia Geodermatophilaceae

## **Phylum Firmicutes**

Reportamos cuatro cepas clasificadas en este Phylum, tres aislados pertenecientes a la familia Staphylococcaceae y un aislado de la familia Paenibacillaceae (Figs. 12G, 12H y Tabla 5). En un estudio de diversidad bacteriana en suelos de Norte y Sudamérica se encontró que después de las *Actinobacteria* y *Proteobacteria* los siguientes Phyla más abundantes fueron *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Lauber *et al.*, 2009), aunque cabe mencionar que estos resultados no son exclusivos de ambientes áridos o semiáridos.



**Figura 12G.** Familia Staphylococcaceae



**Figura 12H.** Familia Paenibacillaceae

0.020



## **Phylum Bacteroidetes**

De este grupo taxonómico sólo detectamos una cepa (Fig. 12I y Tabla 5). En ambientes similares, miembros de este phylum han sido detectados en “biological soil crusts” (BSC, Garcia *et al.*, 2003) y en la meseta del desierto de Colorado (Boyer *et al.*, 2001).

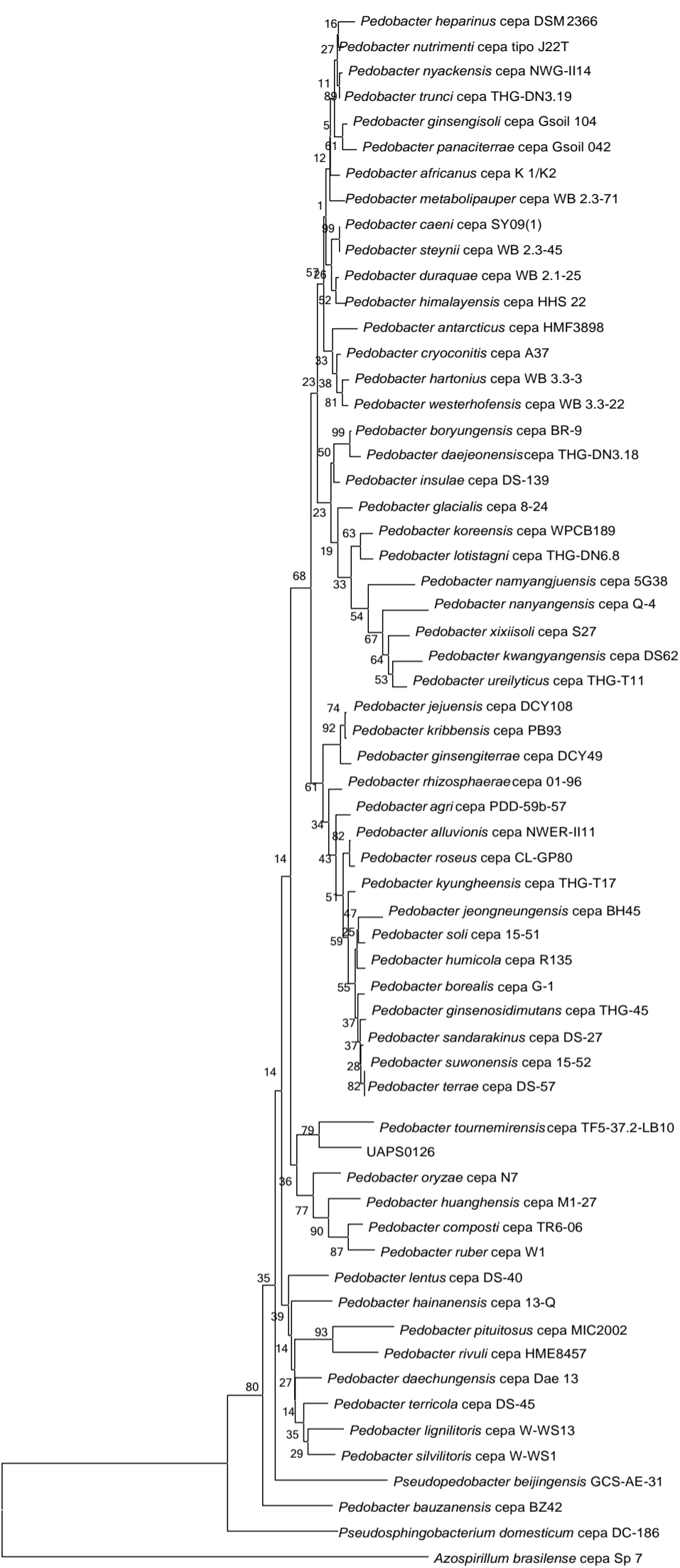
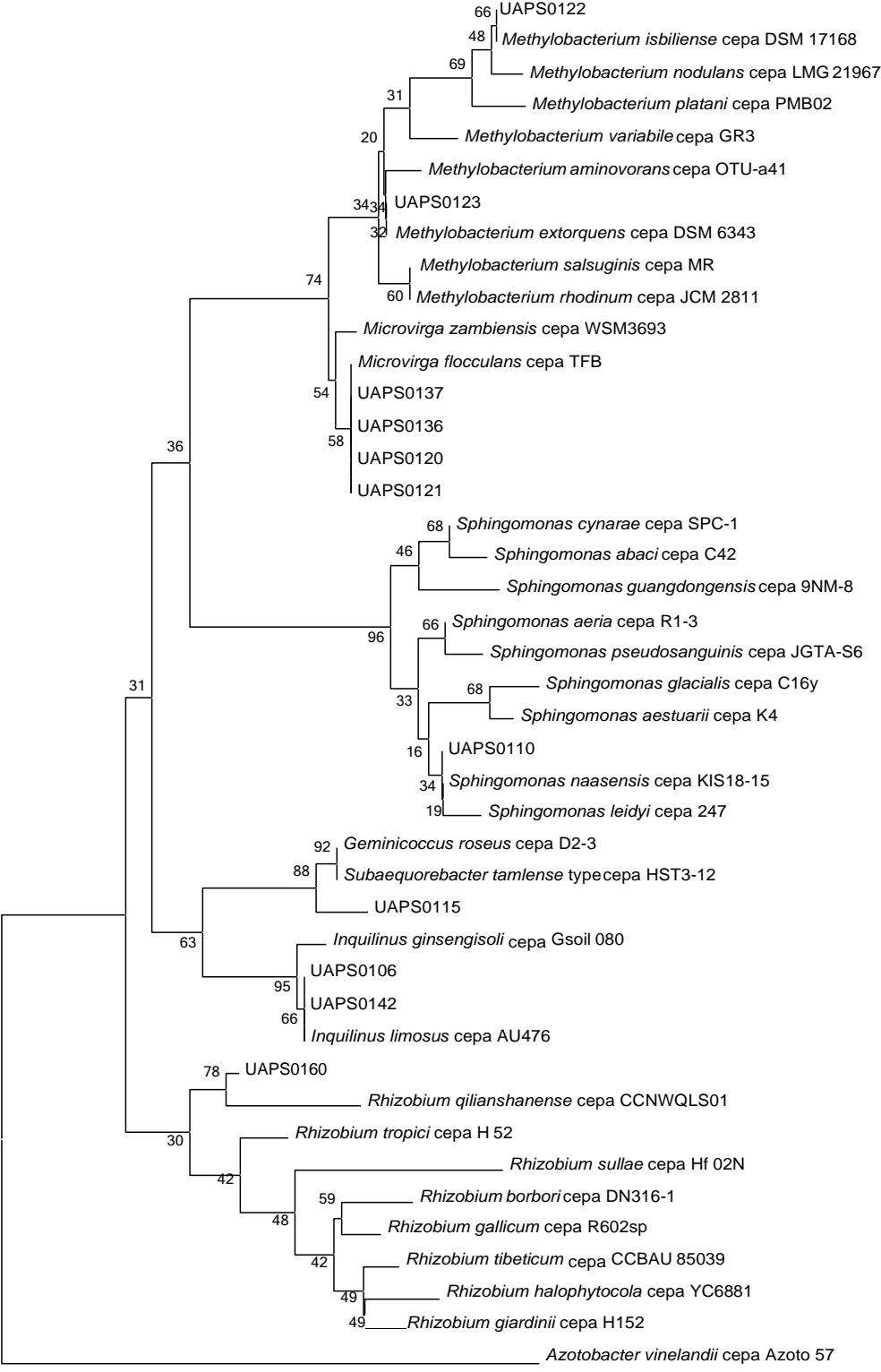


Figura 121. Familia Sphingobacteriaceae

## Phylum Proteobacteria

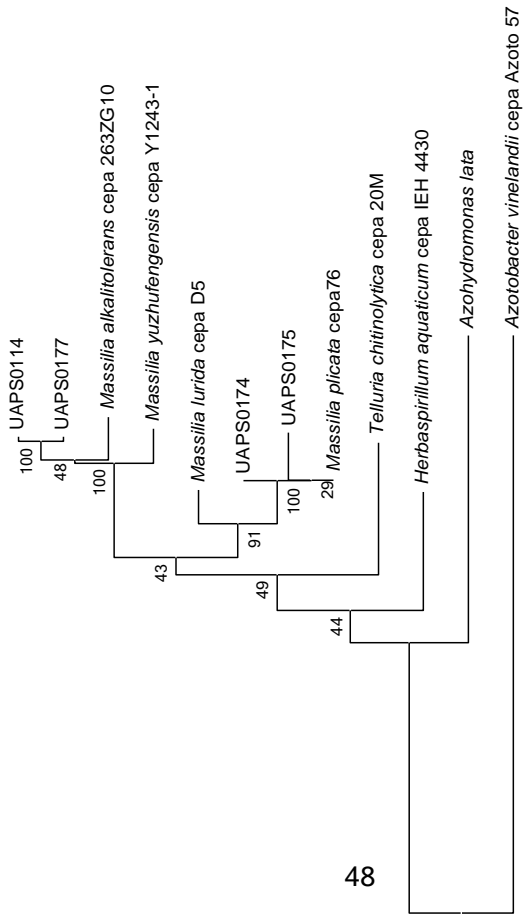
Los organismos aislados del Phylum Proteobacteria pertenecen a las clases Alfa, Beta y Gamaproteobacteria. En la clase Alfaproteobacteria se clasificaron doce cepas relacionadas con organismos de las familias *Sphingomonadaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Rhodospirillaceae* y uno no clasificado en alguna familia descrita (*Subaequorebacter/Geminicoccus*) (Fig. 12J y Tabla 5).

De los aislados pertenecientes a la familia *Methylobacteriaceae* el género *Methylobacterium* es conocido por ser un importante grupo bacteriano asociado a plantas, y es de los organismos más abundantes en la filósfera (Knief *et al.*, 2012). Las especies de este género se caracterizan por poseer la doble capacidad de ser productoras de citocininas y enzimas tales como pectinasas y celulasas (Madhaiyan *et al.*, 2006). Dentro del género *Methylobacterium* la especie *M. extorquens* ha sido ampliamente estudiada como modelo de metilotrofía asociada al gen *mxoF*, locus que ha sido empleado como sonda para detectar metilótrofos en el ambiente (Neufeld *et al.*, 2007). En este trabajo obtuvimos dos cepas pertenecientes al género *Methylobacterium* y obtuvimos secuencia nucleotídica del *orf* de metanol deshidrogenasa de una de ellas.



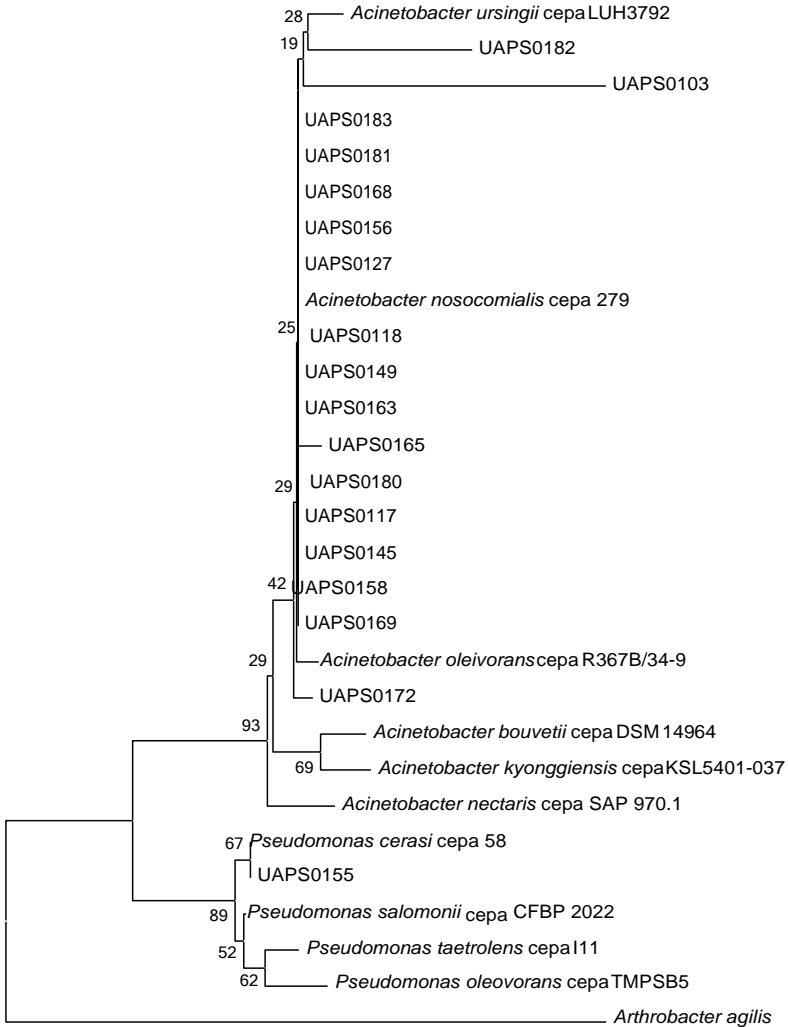
**Figura 12J.** Phylum Alphaproteobacteria

En la clase Betaproteobacteria las cuatro secuencias fueron cercanas a miembros cultivables de la familia *Oxalobacteraceae* todas ellas pertenecientes al género *Massilia* (Fig. 12K y Tabla 5). Se ha visto que la abundancia de esta familia es una característica particular de comunidades microbianas de BSC como en el desierto de Sonora donde se especula que esta presencia se debe a la habilidad de las bacterias de degradar oxalato, un compuesto acumulado o excretado por muchas plantas de ambientes áridos, por líquenes y hongos (Moria *et al.*,2005).



**Figura 12K.** Phylum Betaproteobacteria

Finalmente, el 26% de las bacterias recuperadas pertenecen a la clase Gamaproteobacteria de las cuales 18 son de la familia Moraxellaceae, género *Acinetobacter* y una cepa ubicada en la familia Pseudomonadaceae (Fig. 12L y Tabla 5). La frecuente presencia de cepas del género *Acinetobacter* en ambientes áridos o semiáridos podría estar favorecida por su adaptación natural a condiciones ambientales extremas (Doughary *et al.*, 2011).



0.020

**Figura 12L.** Phylum Gamaproteobacteria



## **Secuencias nucleotídicas**

Las secuencias 16S rRNA se depositaron en GeneBank con los siguientes números de acceso:

KT936080 – KT936091, KT936093, KT936095, KT936096, KT936105, KT936109 -  
KT936114, KT936119, KT936125 - KT936127, KT936134, KT936135, KT936140,  
KT936141, KT936144, KT9361455 y KY00648 - KY00653. (Tabla 6).

Las secuencias *xoxF* se depositaron con los números de acceso: KT932117 - KT932121,  
KT932123, KT932124, KT932126 - KT932128 y KY884986 - KY884988 (Tabla 6).

**Tabla 6. Bacterias metilotróficas cultivables aisladas de *N. macrocephala*.**

Aislado	Género	Clase Taxonómica	16S rRNA Acc. Num	Origen	Hibridación con <i>mxoF</i> <i>xoxF</i>		Amplicón <i>mxoF-xoxF</i>	Crecimiento con metanol- Ca <sup>2+</sup> /Ce <sup>3+</sup>
UAPS01-01	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria	KT936092	Epífita	ND	ND	NA	NO
UAPS01-02	<i>Arthrobacter</i>		KT936093	Rizosférica	ND	P	NA	SI
UAPS01-03	<i>Arthrobacter</i>		KT936094	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-04	<i>Arthrobacter</i>		KT936095	Epífita	ND	S	NA	NO
UAPS01-05	<i>Arthrobacter</i>		KT936096	Rizosférica	ND	P	KT932119 <sup>D</sup>	SI
UAPS01-08	<i>Arthrobacter</i>		KT936097	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-13	<i>Arthrobacter</i>		KT936098	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-46	<i>Arthrobacter</i>		KT936099	Epífita	ND	ND	NA	NO
UAPS01-50	<i>Arthrobacter</i>		KT936100	Rizosférica	ND	ND	+	NO
UAPS01-52	<i>Arthrobacter</i>		KT936101	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-54	<i>Arthrobacter</i>		KT936102	Epífita	ND	ND	NA	NO
UAPS01-64	<i>Arthrobacter</i>		KT936103	Endofítica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-71	<i>Arthrobacter</i>		KT936104	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-40	<i>Cellulomonas</i>		KT936106	Endofítica	ND	ND	+	NO
UAPS01-41	<i>Cellulomonas</i>		KT936107	Endofítica	ND	ND	+	NO
UAPS01-59	<i>Cellulomonas</i>		KT936108	Endofítica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-53	<i>Microbacterium</i>		KT936116	Endofítica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-61	<i>Microbacterium</i>		KT936117	Epífita	ND	ND	NA	NO
UAPS01-62	<i>Micrococcus</i>		KT936118	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-112	<i>Modestobacter</i>		KT936120	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-113	<i>Modestobacter</i>		KT936121	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-114	<i>Modestobacter</i>		KT936122	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-34	<i>Nocardioioides</i>		KT936123	Epífita	ND	ND	NA	NO
UAPS01-48	<i>Nocardioioides</i>			Endofítica	ND	ND	NA	NO

UAPS01-07	<i>Rhodococcus</i>		KT936128	Endofítica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-29	<i>Rhodococcus</i>		KT936129	Endofítica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-30	<i>Rhodococcus</i>		KT936130	Endofítica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-31	<i>Rhodococcus</i>		KT936131	Endofítica	ND	ND	+	NO
UAPS01-32	<i>Rhodococcus</i>			Endofítica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-33	<i>Rhodococcus</i>		KT936133	Endofítica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-12	<i>Sinomonas</i>		KT936136	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-19	<i>Sinomonas</i>		KT936137	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-47	<i>Sinomonas</i>		KT936138	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-78	<i>Sinomonas</i>		KT936139	Rizosférica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-16	<i>Staphylococcus</i>	Firmicutes	KT936142	Endofítica	ND	ND	NA	NO
UAPS01-67	<i>Staphylococcus</i>		KT936143	Epífita	ND	ND	NA	NO
UAPS01-66	<i>Thermobacillus</i>		KT936146	Epífita	ND	ND	NA	NO
UAPS01-26	<i>Pedobacter</i>	Bacteroidetes	KT936125	Rizosférica	ND	N	NA	SI
UAPS01-20	<i>Microvirga</i>	$\alpha$ -proteobacteria	KT936105	Epífita	ND	N	KY884987	SI
UAPS01-21	<i>Microvirga</i>		KT936119	Epífita	S	S	NA	SI
UAPS01-35	<i>Microvirga</i>		KT936111	Epífita	ND	S	NA	SI
UAPS01-36	<i>Microvirga</i>		KT936112	Epífita	ND	S	NA	SI
UAPS01-37	<i>Microvirga</i>		KT936113	Epífita	ND	P	NA	SI
UAPS01-06	<i>Inquilingus</i>		KT936134	Rizosférica	N	P	KY884986	SI
UAPS01-42	<i>Inquilingus</i>		KT936135	Rizosférica	P	P	KT932126 <sup>D</sup>	SI
UAPS01-22	<i>Methylobacterium</i>		KT936114	Endophytic	P	P	NA	SI
UAPS01-23	<i>Methylobacterium</i>		KT936111	Rizosférica	S	P	KY884988	SI
UAPS01-60	<i>Rhizobium</i>		KT936127	Rizosférica	P	P	NA	NO
UAPS01-10	<i>Sphingomonas</i>		KT936140	Endofítica	N	P	NA	NO
UAPS0115	<i>Subaequorebacter/</i>		KT936141	Endofítica	N	P	KT932127 <sup>D</sup>	SI
	<i>Geminicoccus</i>							
UAPS01-14	<i>Massilia</i>	$\beta$ -proteobacteria	KT936109	Epífita	P	P	KT932123 <sup>D</sup>	NO

UAPS01-74	<i>Massilia</i>	KT936144	Epífita	P	P	NA	NO
UAPS01-75	<i>Massilia</i>	KT936145	Epífita	S	P	KT932128 <sup>D</sup>	NO
UAPS01-77	<i>Massilia</i>	KT936110	Epífita	N	P	KT932124 <sup>D</sup>	SI
UAPS01-17	<i>Acinetobacter</i> $\gamma$ -proteobacteria	KT936080	Epífita	S	P	KT932117	SI
UAPS01-18	<i>Acinetobacter</i>	KT936081	Epífita	P	S	NA	NO
UAPS01-27	<i>Acinetobacter</i>	KT936082	Epífita	ND	N	NA	NO
UAPS01-45	<i>Acinetobacter</i>	KT936083	Epífita	P	N	NA	NO
UAPS01-49	<i>Acinetobacter</i>	KT936084	Epífita	P	N	NA	NO
UAPS01-56	<i>Acinetobacter</i>	KT936085	Epífita	P	N	NA	NO
UAPS01-58	<i>Acinetobacter</i>	KT936086	Rizosférica	P	N	NA	NO
UAPS01-63	<i>Acinetobacter</i>	KT936087	Epífita	P	N	NA	SI
UAPS01-65	<i>Acinetobacter</i>	KT936088	Epífita	ND	N	NA	NO
UPAS01-68	<i>Acinetobacter</i>	KT936089	Epífita	P	S	NA	NO
UAPS01-69	<i>Acinetobacter</i>	KT936090	Epífita	S	S	KT932118 <sup>D</sup>	NO
UAPS01-72	<i>Acinetobacter</i>	KT936091	Epífita	P	S	NA	NO
UAPS01-79	<i>Acinetobacter</i>	KY400648	Rizosférica	ND	S	KT932120	SI
UAPS01-80	<i>Acinetobacter</i>	KY400649	Endofítica	ND	P	KT932121	SI
UAPS01-81	<i>Acinetobacter</i>	KY400650	Epífita	ND	P	NA	NO
UAPS01-82	<i>Acinetobacter</i>	KY400651	Endofítica	ND	P	NA	SI
UAPS01-83	<i>Acinetobacter</i>	KY400652	Endofítica	ND	P	NA	NO
UAPS01-84	<i>Acinetobacter</i>	KY400653	Rizosférica	ND	P	NA	NO
UAPS01-55	<i>Pseudomonas</i>	KT936126	Epífita	P	P	NA	SI

N, hibridación negativa; P, hibridación positiva; S, hibridación ligera; ND, no determinada; NA, amplificación negativa con oligonucleótidos *mxaf*916 y *mxar*1360; D, secuencias *XoxF* que cubren la región *Asp301*. Acc. Num=número de acceso de GenBank.

## Análisis de las secuencias del gen 23S rRNA

Tradicionalmente el gen 23S rRNA no ha sido tan utilizado en análisis filogenéticos y rara vez es usado en estudios de clasificación taxonómica por la escasa base de datos y por la carencia relativa de cebadores universales funcionales. Sin embargo, el gen 23S rRNA posee también regiones conservadas útiles para el diseño de oligonucleótidos con un grado similar de universalidad que el caso de los diseñados para el gen 16S rRNA (Hunt *et al.*, 2006). El análisis de las secuencias del 23S rRNA que obtuvimos en general concuerdan con los resultados obtenidos del análisis de las secuencias del gen 16S rRNA. Las diferencias pueden ser atribuidas a que la base de datos para el gen 23S rRNA no es tan

amplia en comparación con la del gen 16S rRNA (Anexo 6). Un caso de discordancia fue el de la cepa UAPS01-06 cuya asignación taxonómica por secuenciación del gen 16S rRNA fue *Massilia* y por 23S rRNA su asignación fue *Herbaspirillum*, sin embargo, son géneros filogenéticamente muy cercanos pues ambos pertenecen a la misma familia *Oxalobacteraceae*. La misma situación se presentó para otras siete cepas, pero se clasificaron en la misma familia.

### **Crecimiento en metanol dependiente de $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Ce}^{3+}$**

Todos los aislados de bacterias metilotróficas crecieron con metanol como fuente de carbono y energía y  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Ce}^{3+}$  (REE) como cofactor (Tabla 7). Diferentes aislados mostraron diferentes tasas de crecimiento metilotrófico. Observamos que el crecimiento máximo fue en presencia de  $\text{Ce}^{+3}$  en un rango de 72-144 h de incubación. Muchos de los aislados no mostraron preferencia por ningún cofactor, pero muchos de ellos aparentemente mejoraron su crecimiento metilotrófico a ese cofactor. Para este ensayo se probaron representantes de todos los grupos taxonómicos aislados. Esas cepas incluyeron dos aislamientos de Actinobacteria, uno de Bacteroidetes, diez de Alfabroteobacteria, uno de Betaproteobacteria y ocho de Gammaproteobacteria.

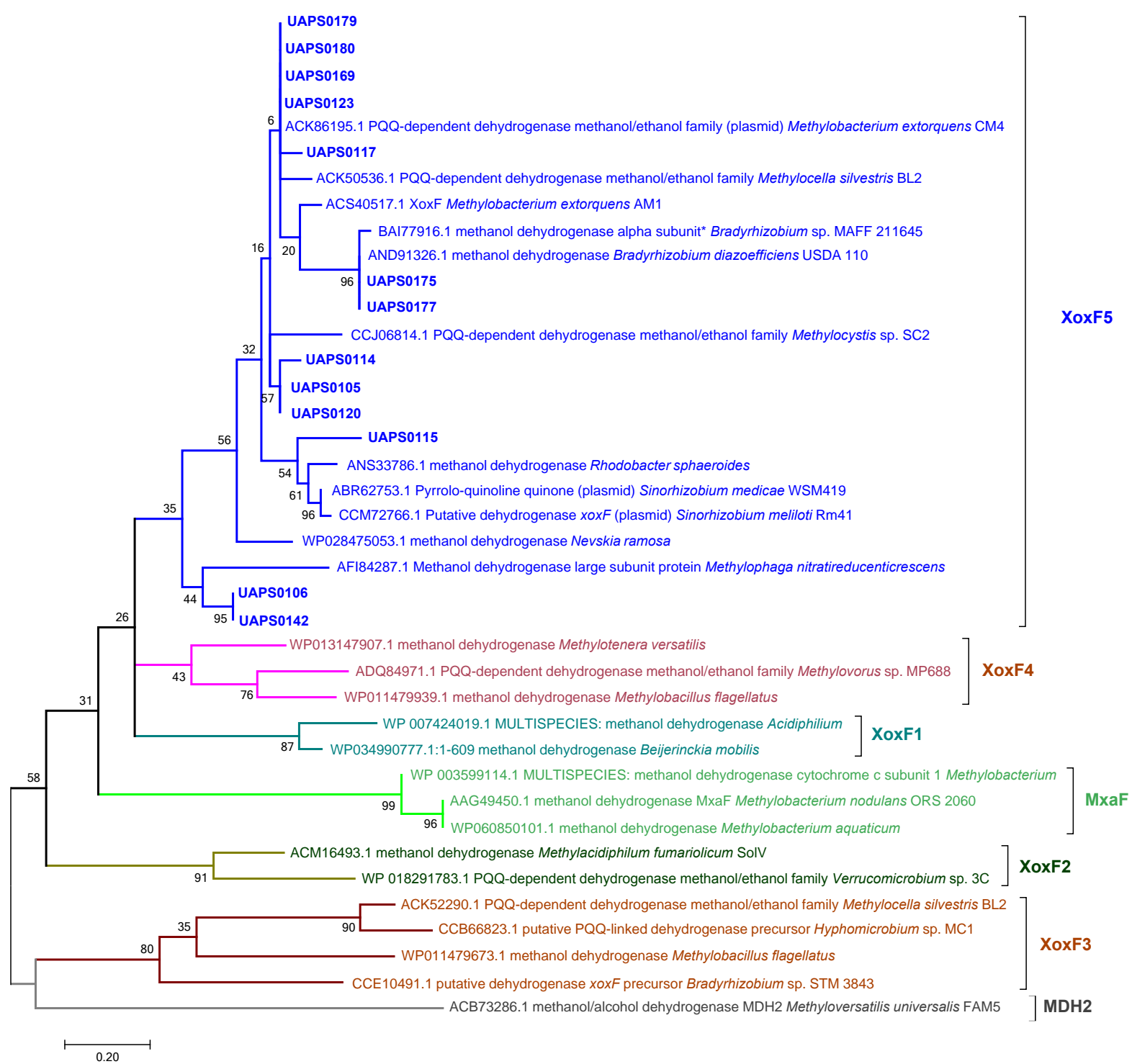
**Tabla 7. Crecimiento metilotrófico con Ca<sup>2+</sup> o Ce<sup>3+</sup> como cofactor para la enzima metanol deshidrogenasa.**

Tiempo	Género	Cepa	Crecimiento con	
			Ca <sup>2+</sup>	Ce <sup>3+</sup>
72 h	<i>Sphingomonas</i>	UAPS01-10	0.7883	0.7637
	<i>Methylobacterium</i>	UAPS01-23	1.0710*	0.7660
	<i>Rhizobium</i>	UAPS01-60	0.8717	0.9367
96 h	<i>Methylobacterium</i>	UAPS01-22	0.4123	0.3007
	<i>Arthrobacter</i>	UAPS01-02	0.8563	1.3843*
	<i>Arthrobacter</i>	UAPS01-05	0.7910	1.1037
	<i>Subaequorebacter/</i>			
	<i>Geminicoccus</i>	UAPS01-15	0.2057	0.7513*
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS01-17	1.0703*	0.7873
	<i>Microvirga</i>	UAPS01-20	0.9390*	0.4777
120 h	<i>Microvirga</i>	UAPS01-21	0.9967*	0.7640
	<i>Pedobacter</i>	UAPS01-26	0.9957*	0.7133
	<i>Microvirga</i>	UAPS01-37	1.1033	0.8533
	<i>Inquilius</i>	UAPS01-42	0.6683	0.9637
	<i>Pseudomonas</i>	UAPS01-55	0.6140	0.6230
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS01-63	1.2073	1.2163
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS01-69	0.9680	1.4060*
	<i>Massilia</i>	UAPS01-77	0.6817	1.0697*
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS01-80	1.3707	1.1673
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS01-82	0.9920	1.0623
144 h	<i>Acinetobacter</i>	UAPS01-83	0.8610	1.1247
	<i>Microvirga</i>	UAPS01-36	0.6087	0.2263
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS01-79	0.3757	0.8020

Los datos corresponden a la absorbancia a 600 nm de la media de tres réplicas. Los registros corresponden a los tiempos de máximo crecimiento en presencia de Ce<sup>3+</sup>. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cultivos MMS con Ca<sup>2+</sup> y Ce<sup>3+</sup> para la misma cepa de acuerdo a prueba no pareada de t, p < 0.05.

### **Loci asociado a metanol deshidrogenasa**

La actividad de la enzima metanol deshidrogenasa (MDH-MxaFI) se reportó primero en *M. extorquens* (Anthony, 1982 y 2004) y ha sido considerada un importante atributo para el crecimiento metilotrófico. Esta enzima es común en el grupo de las Alphaproteobacteria. Otras bacterias metilotróficas del tipo *Burkholderiales* (Kalyuzhnaya *et al.* 2008) así como muchos gram positivos de alto y bajo GC, carecen de MDH-MxaFI, empleando otras enzimas para la oxidación del metanol (Arfman, 1992; Bystrykh *et al.*, 1997). En este trabajo se amplificaron los genes que codifican para la enzima metanol deshidrogenasa. Se obtuvieron amplicones (de aproximadamente 550 bp) con los oligonucleótidos *mxoF* en 34.2% de los aislamientos. Todas las secuencias de aminoácidos deducidas de estas amplificaciones tuvieron mayor similitud a la enzima metanol deshidrogenasa XoxF que a la metanol deshidrogenasa MDH-MxaFI (Fig. 13).



**Figura 13.** Relación filogenética de las secuencias de metanol deshidrogenasas de los aislamientos.



El análisis de las secuencias confirma que de los aislamientos obtenidos cinco Alfarproteobacteria, tres Betaproteobacteria, cuatro Gamaproteobacteria y una Actinobacteria poseen secuencias similares a *xoxF*. Así mismo, el codón Asp301 característico de la enzima metanol deshidrogenasa XoxF y que interviene en la coordinación del lantánido fue detectado en todos los amplicones que cubren esa región (Fig. 14).

<b>XoxF2</b>	<i>M. fumarolicum</i>	DTGKARWAYQMPWDSWDY <b>D</b> GVNEMILPDLT-VKGKKT <b>P</b> CLVHFDRNGFGYVLD <b>R</b> RTGQLIEA
UAPS0105		--GMAKWVYQMP <b>H</b> DEWDY <b>D</b> GVNEMILADQ <b>D</b> -IGGQRRQVLVHFDRNGFGYTL <b>D</b> RINGELLVA
UAPS0106		HGEWVYQMP <b>H</b> DEWDY <b>D</b> GVNEMILV <b>D</b> K <b>P</b> FDGKDRKLLVHFDRNGFGYTL <b>D</b> R <b>L</b> TGELLVA
UAPS0114		DTGMAQWVYHMT <b>P</b> HDEWDY <b>D</b> GVNEMILADQ <b>D</b> -IGGQRRQVLVHFDRNGFGYTL <b>D</b> RITGELLVA
UAPS0115		DTGMAQWVYHMT <b>P</b> HDEWDY <b>D</b> GVNEMILADQ <b>D</b> -IGGQRRQVLVHFDRNGFGYTL <b>D</b> RITGELLVA
UAPS0120		XVYQMP <b>H</b> DEWDY <b>D</b> GVNEMILADQ <b>D</b> -IGGQRRQVLVHFDRNGFGYTL <b>D</b> RINGELLVA
UAPS0142		-TGMAKWVYQMP <b>H</b> DEWDY <b>D</b> GVNEMILV <b>D</b> K <b>P</b> -FDGKDRKLLVHFDRNGFGYTL <b>D</b> R <b>L</b> TGELLVA
UAPS0169		-TGMAKWVYQMP <b>H</b> DEWD <b>X</b> DGINEMIL <b>T</b> DQ <b>K</b> -IDGKDRPLL <b>T</b> H <b>F</b> DRNGFGYTL <b>D</b> RATGELLVA
UAPS0175		-----WVYQMP <b>H</b> DEWDY <b>D</b> GVNEMIL <b>S</b> DQ <b>S</b> -INGQARKLL <b>T</b> H <b>F</b> DRN <b>L</b> GYTL <b>D</b> RATGELLVA
UAPS0177		----AKWVYQMP <b>H</b> DEWDY <b>D</b> GVNEMIL <b>S</b> DQ <b>S</b> -INGQARKLL <b>T</b> H <b>F</b> DRN <b>L</b> GYTL <b>D</b> RATGELLVA
<b>MxaF</b>	<i>M. extorquens</i>	DTGEAKFGYQ <b>K</b> T <b>P</b> HDEWDY <b>A</b> GVNV <b>M</b> ML <b>S</b> E <b>Q</b> K <b>D</b> K <b>D</b> G <b>K</b> ARKLL <b>T</b> H <b>P</b> DRNGI <b>V</b> YTL <b>D</b> R <b>T</b> DGALV <b>S</b> A

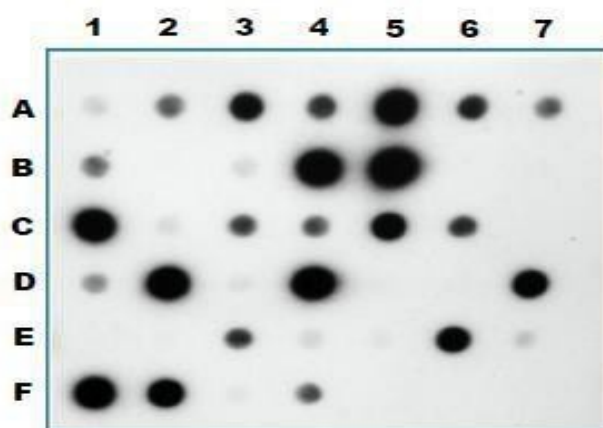
**Figura 14.** Alineamiento parcial de aminoácidos de las enzimas metanol deshidrogenasas de los aislados de *N. macrocephala* y XoxF. El aminoácido Asp301 (**D**) ha sido detectado en todas las deshidrogenasas XoxF y éste es necesario para su coordinación con los lantánidos (REE).

Beck *et al.* en el 2014 reportan que las secuencias de ADN genómico de comunidades metilotróficas indican que todos los metilótrofos que utilizan PQQ tienen genes para la síntesis de XoxF-MDH y muchos menos tienen genes para la enzima MxaFI-MDH, es decir, hay más probabilidad de aislar metilótrofos que codifican *xoxF* que *mxoF* como lo reportamos nosotros en este trabajo.

Realizamos comparaciones de secuencias de genes relacionados al metabolismo metilotrófico de cepas perteneciente a los géneros que estamos reportando. Se alinearon secuencias de los grupos taxonómicos Actinobacteria, Betaproteobacteria y Gamaproteobacteria, con lo que se detectaron regiones conservadas que nos permitieron el diseño de oligonucleótidos. Sin embargo, con esos cebadores no fue posible obtener productos de amplificación de ningún gen asociado a la oxidación del metanol. Chistoserdova *et al.*, en 2009 reportaron que comparaciones de secuencias de metanol deshidrogenasas alternativas no son comúnmente detectadas por las sondas ambientales *mxoF* y por tanto tendrían que ser corregidas en las bases de datos como alcohol deshidrogenasas, afirman que esto tendría implicaciones para entender la evolución de la oxidación del metanol sugiriendo por tanto, una convergencia hacia la función enzimática de la oxidación del metanol en las proteína MxaF y Mdh2.

### Hibridación dot blot

Entre las 25 cepas de las cuales no obtuvimos amplicones con los oligonucleótidos *mxoFmxoF*, once claramente hibridaron con la sonda *xoxF* de *M. extorquens* (Tabla 6; Fig. 15), de ellas una pertenecía al phylum Actinobacteria, cuatro a Alfacaproteobacteria, una a Betaproteobacteria y cinco a Gamaproteobacteria, este resultado indica que al menos gran cantidad de las metilótrofas aisladas de *N. macrocephala* poseen el locus *xoxF*.



**Figura 15.** Hibridación Dot-Blot con *xoxF*. Líneas A1, UAPS0104; A2, UAPS0105; A3, UAPS0106; A4, UAPS0181; A5, UAPS0110; A6, UAPS0102; A7, UAPS0184; B1, UAPS0182; B2, UAPS0149; B3, UAPS0121; B4, UAPS0122; B5, UAPS0123; B6, UAPS0126; B7, UAPS0127; C1, UAPS0114; C2, UAPS0136; C3, UAPS0137; C4, UAPS0180; C5, UAPS0115; C6, UAPS0142; C7, UAPS0145; D1, UAPS0150; D2, UAPS0174; D3, UAPS0118; D4, UAPS0155; D5, UAPS0156; D6, UAPS0158; D7, UAPS0177; E1, UAPS0165; E2, UAPS0120; E3, UAPS0160; E4, UAPS0168; E5, UAPS0169; E6, UAPS0175; E7, UAPS0172; F1, UAPS0117; F2, UAPS0183; F3, UAPS0163; F4, *M. extorquens* JCM2802 (100 ng); F5, *Ustilago maydis* 207; F6 y F7, vacío.

Los catorce aislados restantes no hibridaron con la sonda *xoxF5* ni fueron amplificados con los oligonucleótidos *mxoFmxoF*, entre ellos uno pertenecía a Actinobacteria, uno a Bacteroidetes, dos a Alfacaproteobacteria y diez a Gamaproteobacteria. La hibridación con la sonda *mxoF* fue muy débil, pero algunas de las señales indicarían que el organismo podría tener el loci *mxoF* (Anexo 8).

## CONCLUSIONES

1. Aun cuando nuestro estudio se basó únicamente en el enfoque cultivable de bacterias metilotróficas asociadas a *N. macrocephala* encontramos representativas de varios phyla en los que se han reportado bacterias con metabolismo C1 (Alfa-, Beta- y Gamaproteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria). El taxón mas representado fue el del grupo Actinobacteria.
2. Con respecto a la diversidad de los *loci* de la enzima metanol deshidrogenasa encontramos la presencia del gene *xoxF* en 34% de los aislamientos por medio de amplificación y en el 32% por hibridación. Así mismo, la posible presencia de *mxoF* en el 18% de los aislamientos, por hibridación. Los aislamientos restantes (16%) posiblemente tienen algunas de las diferentes enzimas metanol deshidrogenasas que con menor frecuencia se han identificado en estudios metagenómicos de diferentes ambientes.
3. Todas las secuencias de metanol deshidrogenasa obtenidas de los diferentes taxones correspondieron al grupo *xoxF5*. Este grupo es uno de los más detectados en distintos ambientes.
4. Sabemos que un estudio de diversidad con un enfoque cultivable no nos muestra en toda su magnitud la diversidad bacteriana metilotrófica existente en el ambiente de la cactacea *N. macrocephala*. Sin embargo, con los resultados obtenidos detectamos diversidad de bacterias con esta capacidad metabólica, siendo éste el primer estudio de diversidad de bacterias metilotróficas en el ambiente de una cactácea.

## PERSPECTIVAS

1. Determinar el crecimiento bacteriano metilotrófico por espectrofotometría probando otro lantánido además del Ce (La).
2. Medir en algunas de las cepas que tienen la enzima XoxF-MDH la actividad enzimática metanol deshidrogenasa, en cultivos utilizando diferentes concentraciones de al menos dos lantánidos (Ce, La).
3. Determinar la energía de unión a distintos lantánidos y a  $\text{Ca}^{2+}$  de metanol deshidrogenasas tipo XoxF.
4. Medir la expresión del gen *xoxF* bajo diferentes condiciones de crecimiento metilotrófico por RT-PCR.
5. Secuenciar el genoma de la cepa *Sphingomonas* sp. UAPS01-10, la que dió señal intensa de hibridación con *xoxF* y de la que no logramos obtener amplicón con los oligonucleótidos *mxoF-xoxF*.

## BIBLIOGRAFÍA

Abed, M. M., Ramette, A., Hübner, V., De Dekker, P. y de Beer D. 2012. Microbial diversity of eolian dust sources from saline lake sediments and biological soil crusts in arid Southern Australia. *FEMS Microbiology Ecology* 80:294-304.

Aguilera, H. N. 1970. Suelo de las zonas áridas de Tehuacán, Pue. y sus relaciones con las cactáceas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 15:51-63.

Aguirre, J. F., Montiel, D., Hernández, C., Torres, G., Millán, V. Toro, N., Martínez, F. y Ramírez, H. C. 2012. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:891-904.

Alcorn, S. M., Orum, T. V. Teigerwalt, A. G. Foster, L. M., Fogleman, J. C. y Brenner, J. 1991. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:197-212.

Andrew, D. R., Fitak, R. R., Munguia, A., Racolta, A., Vincent G. M. y Dontsova, K. 2012. Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran desert soils. *Applied and Environmental Microbiology* 78:7527-7537.

Anthony, C. 1982. *The Biochemistry of Methyloproteobacteria*. London: Academic Press. St Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, Suffolk. ISBN 0-12-058820-X.

Anthony, C. 1986. Bacterial Oxidation of Methane and Methanol. *Advances in Microbial Physiology* 27:113-210.

Anthony, C. 2000. Methanol dehydrogenase, a PQQ-containing quinoprotein dehydrogenase. *Subcellular Biochemistry* 35:73-117.

Anthony, C. 2004. The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428:2-9.

Arias, A. A., Valverde, M. T. y Santiago, J. R. 2000. *Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla*. 1ª. Ed. pp.31.

Arfman, N., Dijkhuizen, I. L., Kirchhof, G., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Bulygina, E. S. Chumakov, K. M., Govorukhina, N. I. Trotsenko, Y. A., White, D. y Sharp, R. J. 1992. *Bacillus methanolicus* sp. nov., a new species of thermotolerant, methanol-utilizing, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42:439-445.

Arriaga, L., Espinoza, J. M., Aguilar, C., Martínez, E., Gómez, L. y Loa E. (coordinadores). 2000. *Regiones terrestres prioritarias de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad México. [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rtp\\_121.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rtp_121.pdf).

Bacilio, M., Hernández, J. P. y Bashan, Y. 2006. Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils* 43:112-119.

Balch, W., Fox G., Magrum L., Woese C. y Wolfe R. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* 43:260-296.

Bashan, Y., Holguin, G. y de-Bashan L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997- 2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50:521-577.

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. y Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology* 45:493-496

- Beck, D. A. C., McTaggart, T. L., Setboonsarng, U., Vorobev, A., Kalyuzhnaya, M. G., Ivanova, N., Goodwin, L., Woyke, T., Lidstrom, M. E. y Chistoserdova, L. 2014. The expanded diversity of Methylophilaceae from Lake Washington through cultivation and genomic sequencing of novel ecotypes. *PLoS ONE* 9: e102458
- Beck, D. A. C., McTaggart, T. L., Setboonsarng, U., Vorobev, A., Goodwin, L., Shapiro, N., Woyke, T., Kalyuzhnaya, M. G., Lidstrom, M. E. y Chistoserdova, L. 2015. Multiphyletic origins of methylotrophy in Alphaproteobacteria, exemplified by comparative genomics of Lake Washington isolates. *Environmental Microbiology* 17:547-554.
- Boyle, A. M. 1949. Further studies of the bacterial necrosis of the giant cactus. *Phytopathology* 39:1029-1052.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R. y Johansen, J. R. 2001. Is the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution* 18:1057-1069.
- Bravo, H. y Sánchez, M. H. 1978. Las Cactáceas de México. Vols. I, II y III. UNAM, México.
- Byers, D. S. 1967. Climate and hydrology. In: Byers, D.S. ed. The prehistory of the Tehuacan Valley. I. Environment and subsistence. University of Texas Press. Austin: 48-65.
- Bystrykh, L. V., Govorukhina, N. I., Dijkhuizen, L. y Duine, J. A. 1997. Tetrazolium-dye-linked alcohol dehydrogenase of the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica* is a three-component complex. *European Journal of Biochemistry* 247:280-287.
- Carrillo, G. A., Bashan, Y., Díaz, R. E. y Bethlenfalvay, G. J. 2000. Effects of resource island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran desert. *Restoration Ecology* 8:65-73.
- Caruso, T., Chan, Y., Lacap, D. C., Lau, M. C. Y., McKay, C. P. y Pointing, S. B. 2011. Stochastic and deterministic processes interact in the assembly of desert microbial communities on a global scale. *ISME Journal* 5:1406-1413.
- Cary, S. G., McDonald, I. R., Barret, J. E. y Cowan, D. A. 2010. On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nature Reviews Microbiology* 8:129-138.
- Casas, A., Valiente, A., Viveros, J. L., Caballero, J., Cortés, L., Dávila, P., Lira, R. y Rodríguez, I. 2001. Plant resources of the Tehuacan-Cuicatlan Valley. *Economic Botany* 55:129-166.
- Cicerone, R. J., and R. S. Oremland. 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* 2:299-327.
- Colby J. y Zatman L. J. 1973. Trimethylamine metabolism in obligate and facultative methylotrophs. *Biochemical Journal* 132:101-112.
- Coleman, D., Desgarennes, D., Fonseca, G. C., Gross, S., Clingenpeel, S. y Woyke, T. 2016. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *New Phytologist* 209:798-811.
- Chanal, A., Chapon, V., Benzerara, K., Barakat, M., Christen, R., Achouak, W., Barras, F. y Heulin, T. 2006. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environmental Microbiology* 8:514-525.
- Chistoserdova, L. y Lidstrom, M.E. 1997. Molecular and mutational analysis of a DNA region separating two methylotrophy gene clusters in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* 143:1729-1736.

- Chistoserdova, L. 2011. Modularity of methylotrophy, revisited. *Environmental Microbiology* 13:2603-2622.
- Dávila, P. J., Villaseñor, R., Medina, A., Ramírez, A., Salinas, J., Sánchez, K. y Tenorio, P. 1993. Listados florísticos de México. X. Flora del Valle de Tehuacán- Cuicatlán. Instituto de Biología. UNAM: 195.
- De Boer, L., Dkhuizen, L., Grobber, G., Goodfellow, M., Stackebrandt, E., Parlett, J. H., Whitehead, D. y Witt, D. 1990. *Amycolatopsis methanolica* sp. nov., a facultatively methylotrophic actinomycete. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40:194-204.
- De Rijk, P., Van de Peer, Y., Van den Broeck, I. y De Wachter, R. 1995. Evolution according to large ribosomal subunit RNA. *Journal of Molecular Evolution* 41:366-375.
- De Vries, G. E., Arfman, N., Terpstra, P. y Dijkhuizen, L. 1992. Cloning, expression, and sequence analysis of the *Bacillus methanolicus* Cl methanol dehydrogenase gene. *Journal of Bacteriology* 174:5346-5353.
- Dezward, J. M. M., Nelisse, P. N. y Kuenen, J. G. 1996. Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov.: an obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiology Ecology* 20:261-270.
- Doughari, H. M., Ndakidemi, P. A., Human, I. S. y Benade, S. 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes and Environments* 26:101-112.
- Dsouza, M., Taylor, M. W., Turner, S. J. y Aislabie, J. 2015. Genomic and phenotypic insights into the ecology of *Arthrobacter* from Antarctic soils. *BMC Genomics*. DOI: 10.1186/s12864-015-1220-2.
- Dumont, M. G. y Murrell, J. C. 2005. Community-level analysis: key genes of aerobic methane oxidation. *Methods in Enzymology* 397:413-27.
- Esparza, L., Valverde, T. y Vilchis, E. 2002. Demographic analysis of a rare columnar cactus (*Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Mexico. *Biological Conservation* 103:349-359.
- Fall, R. y Benson, A. A. 1996. Leaf methanol: the simplest natural product from plants. *Trends in Plant Science* 1:296-301.
- Firsova, Y.E., Torgonskaya, M.L. y Trotsenko, Y.A. 2015. Functionality of the *xoxF* gene in *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4. *Microbiology* 84:796-803.
- Fitriyanto, N.A., Fushimi, M., Matsunaga, M., Pertiwinigrum, A., Iwama, T. y Kawai, K. 2011. Molecular structure and gene analysis of Ce<sup>3+</sup>-induced methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111:613-617.
- Fogleman, J. C. y Foster, J. L. 1989. Microbial colonization of injured cactus tissue (*Stenocereus gummosus*) and its relationship to the ecology of cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 55:100-105.
- Fonseca, C. G., Coleman, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. G. y Partida, L. P. 2016. The cacti microbiome: Interplay between habitat-filtering and host-specificity. *Frontiers in Microbiology* 7:1-16.
- Foster, J. L. M. y Fogleman, J. C. 1993. Identification and ecology of the bacterial communities associated with the necroses of three species of cacti. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1-6.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 246 pp.

- García, E. y McKell, C.M. 1970. Contribution of shrubs to the nitrogen ecology of a desert-wash plant community. *Ecology* 51:81-88.
- García, F., López, A. y Nübel, U. 2001. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1902-1910.
- García, F., Johnson, S.L., Yougkin, D. y Belnap, J. 2003. Small-scale vertical distribution of bacterial biomass and diversity in biological soil crusts from arid lands in the Colorado Plateau. *Microbial Ecology* 46:312-321.
- Godínez, A. H. y A. Flores-Martínez. 1999. Germinación de semillas de 32 especies de plantas de la costa de Guerrero: su utilidad para la restauración ecológica. *Polibotánica* 11:1-29.
- Godínez, H. y Valiente, A. 2004. Demography of the columnar cactus *Neobuxbaumia macrocephala*: a comparative approach using population projection matrices. *Plant Ecology* 174:109-118.
- González, J.M., Laiz, L. y Saiz, C. 2003. Classifying bacterial isolates from hypogean environments: application of a novel fluorimetric method for the estimation of G +C mol % content in microorganisms by thermal denaturation temperature. In: Saiz-Jiménez C. (ed.). *Molecular biology and cultural heritage*. Swets & Zeitlinger, B.V. Lisse: 47-54.
- Goodwin, P. M. y Anthony, C. 1995. The biosynthesis of periplasmic electron transport proteins in methylotrophic bacteria. *Microbiology* 141:1051-1064.
- Green, P. N. 2006. *Methylobacterium*. In: *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. y Stackebrandt, E. (Eds.). 5:257-265.
- Hanson, R. S. y Hanson, T. E. 1996. Methanotrophic Bacteria. *Microbiological Reviews* 60:439-471.
- Hedrick, D. B., Peacock, J. R., Stephen, S. J. Macnaughton, J., Brüggemann y White, D. C. 2000. Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *Journal of Microbiological Methods* 41:235-248.
- Hoben, H. J. y Somasegaran, P. 1982. Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of *Rhizobium* spp. in Inoculants Made from Presterilized Peat. *Applied and Environmental Microbiology* 44:1246-1247.
- Horiguchi, H., Yurimoto, H., Toh-Kheng, T. G., Nakagawa, T., Kato, N. y Sakai, Y. 2001. Peroxisomal catalase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*: transport efficiency and metabolic significance. *Journal of Bacteriology* 183:6372-6383.
- Hunt, D. 1992. CITES Cactaceae Checklist. Royal Botanical Gardens at Kew, London.
- Hunt, D. E., Klepac-Ceraj, V., Acinas, S. G., Gautier, C. y Bertilsson, S. 2006. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 72:2221-2225.
- Jones, D. T., Taylor, W.R. y Thornton J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8:275-282.
- Kalyuzhnaya, M. G., Hristova, K. R., Lidstrom, M. E. y Chistoserdova, L. 2008. Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. *Journal of Bacteriology* 190:3817-23.
- Kamilova, F., Kravchenko, L., Shaposhnikov, A., Azarova, T., Makarova, N. y Lugtenberg. B. 2006. Organic acids, sugars and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Plant-Microbe Interactions* 19:250-256.

- Kassen, R. y Rainey, P. B. 2004. The ecology and genetics of microbial diversity. *Annual Review of Microbiology* 58:207-31.
- Keltjens, J. T., Pol, A., Reimann, J. y Op den Camp, H. J. 2014. PQQ dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 6163-6183.
- Knief, C., Ramette, A., Frances, L., Alonso, C. y Vorholt, J. A. 2010. Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *ISME Journal* 4:719-728.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., Von Mering, C. y Vorholt, J. 2012. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *The ISME Journal* 6:1378-1390.
- Koenig, R. L., Morris, R. O. Polacco, J. C. 2002. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 184:1832-1842.
- Koneman, E. 2006. Diagnóstico microbiológico. 5a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Konstantinidis, K. T., Ramette, A. y Tiedje, J. M. 2006. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7286-7293.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. 2016. MEGA: Molecular Evolutionary 5 Genetic Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Kuske, C. R., Barns, S. M. y Busch, J. D. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3614-3621.
- Kutschera, U. 2007. Plant associated methylobacteria as coevolved phytosymbionts: a hypothesis. *Plant Signalling* 2:74-78.
- Larsen, N., Gary, G. J., Olsen, J., Maidak, B. L., McCaughey, M. J. Overbeek, R., Macke, T. J. Marsh, M. L. y Woese, C. R. 1993. The ribosomal database Project. *Nucleic Acids Research* 21:3021-3023.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R. y Fierer, N. 2009. Pyrosequencing based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75:5111-5120.
- Lee, S. D. y Seong, C. N. 2014. *Nocardioides opuntiae* sp nov., isolated from soil of a cactus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:2094-2099.
- Lidstrom, M. E. 1991. The methylotrophic bacteria. In: *The Prokaryotes*, 2nd edn, pp. 441-445. Edited by A. Balows & others. New York: Springer.
- Lidstrom, M. 1992. The genetics and molecular biology of methanol-utilizing bacteria. In: *Methane and Methanol Utilizers* (Murrell, J.C. and Dalton, H., Eds.). 183-206, Plenum, New York.
- Lidstrom, M.E. 2006. Aerobic methylotrophic Prokaryotes. In A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer, K.-H. (ed.). *The Prokaryotes* 2:618-634. Springer, New York.
- Lopez, B. R., Bashan, Y. y Bacilio, M. 2011. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Archives of Microbiology* 193:527-541.
- Ludwig, W. y Schleifer, K. H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 15:155-173.



- McDonald, I. R., Hall, H. Pickup, R. W. y Murrell, J. C. 1996. Methane oxidation potential and preliminary analysis of methanotrophs in blanket bog peat using molecular ecology techniques. *FEMS Microbiology Ecology* 21:197-211
- McDonald, I. R. y Murrell, J. C. 1997. The Methanol dehydrogenase structural gene *mxhF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3218-3224.
- McTaggart, T. L., Beck, D. A. C., Setboonsarng, U., Shapiro, N., Woyke, T. Lidstrom, M. E., Kalyuzhnaya, M.G. y Chistoserdova, L. 2015. Genomics of methylotrophy in Gram-positive methylamine-utilizing bacteria. *Microorganisms* 3:94-112.
- Madhaiyan, M., Reddy, B. V. S., Anandham, R., Senthilkumar, M., Poonguzhali, S., Sundaram, S. P. y Sa, T. M. 2006. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. *Current Microbiology* 53:270-276.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthilkumar, M., Sundaram, S. P. y Sa, T. 2009. Nodulation and plant-growth promotion by methylotrophic bacteria isolated from tropical legumes. *Microbiological Research* 164:114-120.
- Mascarúa, M. A., Villa. R. y Caballero, J. 1988. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from cactaceous plants. *Plant and Soil* 106:91-95
- Moria, L.N., Pérez, A. y Garcia, F. 2005. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert (Organ Pipe Cactus National Monument, AZ). *FEMS Microbiology Ecology* 54:233-245.
- Nakagawa, T., Mitsui, R., Tani, A., Sasa, K., Tashiro, S., Iwama, T., Hayakawa, T. y Kawa, K. 2012. A catalytic role of XoxF1 as La<sup>3+</sup>-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. *PLoS ONE* 7:e50480. doi:10.1371/journal.pone.0050480.
- Neufeld, J. D., Schäfer, H., Cox, M. J., Boden, R., McDonald, I. R. y Murrell, J. C. 2007. Stable-isotope probing implicates *Methylophaga* spp and novel Gammaproteobacteria in marine methanol and methylamine metabolism. *ISME Journal* 480-491.
- Park, H., Lee, H., Ro, Y. T. y Kim, Y. M. 2010. Identification and functional characterization of a gene for the methanol: N, N'-dimethyl- 4-nitrosoaniline oxidoreductase from *Mycobacterium* sp. strain JC1 (DSM 3803). *Microbiology* 156:463-471.
- Pol, A., Barends, T. R. M., Dietl, A., Khadem, A. F., Eygensteyn, J., Jetten, M. S. M. y Op den Camp, H. J. M. 2014. Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots. *Environmental Microbiology* 16:255-264.
- Prosser, J. I., Bohannon, B. J. M., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., Green, J. L., Green, L. E., Killham, K., Lennon, J. J., Osborn, A. M., Solan, M., van der Gast, C. J. y Young, J. P. W. 2007. Essay-The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* 5:384-392.
- Puente, M. E. y Bashan, Y. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis* 15:49-60
- Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y. y Lebsky, V. K. 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and wearhering of igneous rocks. *Plant Biology*. 6:629-642.
- Puente, M. E., Li, C. Y. y Bashan, Y. 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Root colonization and wearhering of igneous rocks. *Plant Biology*. 6:643-650.



Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 51:221-27.

Woese, C. R. 1994. There must be a prokaryote somewhere -microbiologists search for itself. *Microbiological Reviews* 58:1-9.

Yurimoto, H., Oku, M. y Sakai, Y. 2011. Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. *International Journal of Microbiology*. Volume 2011, Article ID 101298, 8 pages doi:10.1155/2011/101298.

Zavarzin, G. A. Zhilina, T. N. y Kevbrin, V. V. 1999. The alkaliphilic microbial community and its functional diversity. *Microbiology* 68:503-521.

## ANEXOS

### Anexo 1. Medio de cultivo Glicerol-Peptona (GP)

---

#### Medio GP (Glicerol-peptona)

Reactivos	gramos/litro
Glicerol	10g
Peptona de caseína	10g
Agar bacteriol+ogico	15g
pH	7

---

### Anexo 2. Medio mínimo Metanol-Sales minerales (MMS)

---

#### Medio MMS (Methanol Mineral Salts)

Reactivos	gramos/litro
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.62g
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.05g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20g
NaCl	0.10g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5ug
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5.0ug
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10ug
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10ug
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10ug
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	70ug
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5.0ug
Agar	16g
Metanol	5 ml
pH	7

### Anexo 3. Extracción de DNA: Kit wizard genomic DNA purification.

Para la extracción del DNA genómico de las bacterias de este estudio se utilizó el kit Wizard Genomic DNA purification. Células lavadas con MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 Mm fueron lisadas con 600

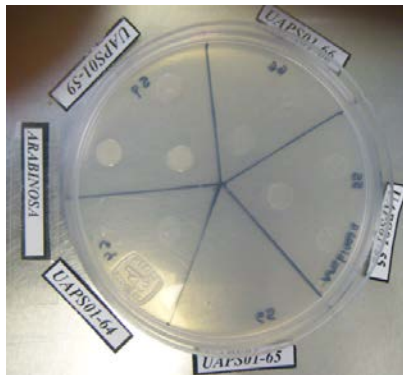
$\mu\text{l}$  de Nuclei lysis solution por 5 min a  $80^\circ\text{C}$ , después se adicionaron  $3\ \mu\text{l}$  de la solución RNAasa y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. Para la precipitación de las proteínas se añadieron  $200\ \mu\text{l}$  de Protein Precipitation Solution reaccionando por 5 min, posterior a una centrifugación se separó el sobrenadante claro y transparente para adicionarle  $600\ \mu\text{l}$  de isopropanol para la separación del DNA genómico el cual fue posteriormente lavado etanol al 70 % con una punta limpia, se secó el paquete celular de DNA durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar el etanol totalmente. Por último se rehidrató el paquete celular de DNA con  $100\ \mu\text{l}$  de Rehydration Solution por 1 hora a  $65^\circ\text{C}$ .

#### Anexo 4. Goteo en Placa

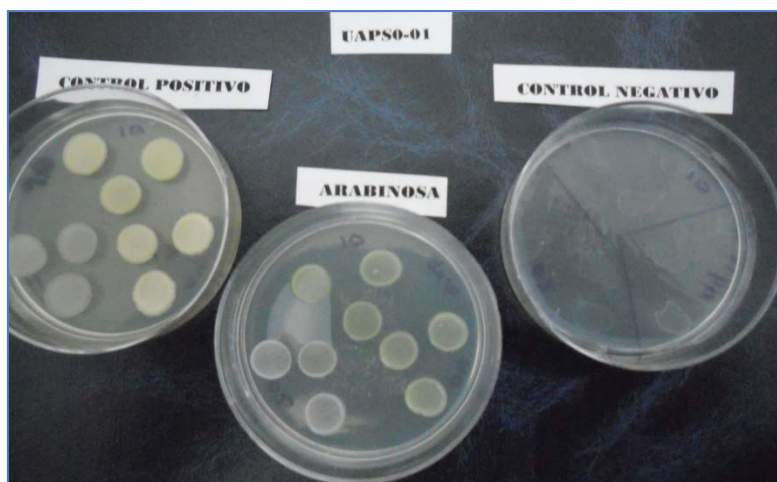
Método utilizado para cuantificar bacterias viables. (Hoben *et al.*, 1982)

1. Realizar diluciones 1:10 del cultivo bacteriano en tubos eppendorf 1.5 ml en  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mM
2. Posteriormente hacer diluciones seriadas 1:10 hasta  $10^{-8}$
3. Colocar  $20\ \mu\text{l}$  por triplicado de cada dilución sobre el agar GP en placa
4. Incubar las placas desde 24 horas a 10 días hasta observar crecimiento bacteriano.
5. Cuantificar colonias y multiplicar por el factor de dilución y por el volumen de la gota para obtener las unidades formadoras de colonia por mililitro.

#### Anexo 5. Imagen ensayo Goteo en placa



- a. Imagen donde se observa el crecimiento por triplicado en arabinosa de cinco metilotróficas (solo muestro como ejemplo imagen de una de las fuentes de carbono probada y solo de 5 cepas)



- b. Imagen donde se observa el crecimiento por triplicado en arabinosa de la cepa UAPS01-01 comparando su crecimiento con un control positivo (GP) y un control negativo (medio mínimo sin fuente de carbono).

## Anexo 6. Asignación taxonómica por secuencia del gen 23S rRNA

---

UAPS01-01	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-02	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-03	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-04	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-05	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-06	<i>Herbaspirillum</i>
UAPS01-07	<i>Clavibacter</i>
UAPS01-08	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-10	<i>Sphingomonas</i>
UAPS01-12	<i>Cellulomonas</i>
UAPS01-13	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-14	<i>Hermiiniomonas</i>
UAPS01-15	<i>Acidothermus</i>
UAPS01-16	ND
UAPS01-17	<i>Acinetobacter</i>
UAPS01-18	<i>Acinetobacter</i>
UAPS01-19	<i>Sanguibacter</i>
UAPS01-20	<i>Paenibacillus</i>
UAPS01-21	<i>Rhodopseudomonas</i>
UAPS01-22	<i>Methylobacterium</i>
UAPS01-23	<i>Methylobacterium</i>

UAPS01-26	<i>Pedobacter</i>
UAPS01-27	<i>Acinetobacter</i>
UAPS01-29	ND
UAPS01-30	<i>Rhodococcus</i>
UAPS01-31	<i>Rhodococcus</i>
UAPS01-32	<i>Rhodococcus</i>
UAPS01-33	<i>Rhodococcus</i>
UAPS01-34	<i>Nocardioides</i>
UAPS01-35	<i>Methylobacterium</i>
UAPS01-36	ND
UAPS01-37	ND
UAPS01-39	ND
UAPS01-40	<i>Cellulomonas</i>
UAPS01-41	<i>Cellulomonas</i>
UAPS01-42	<i>Azospirillum</i>
UAPS01-44	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-45	ND
UAPS01-46	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-47	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-48	<i>Nocardioides</i>
UAPS01-49	<i>Acinetobacter</i>
UAPS01-50	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-52	ND
UAPS01-53	<i>Microbacterium</i>
UAPS01-54	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-55	<i>Pseudomonas</i>
UAPS01-56	<i>Acinetobacter</i>
UAPS01-58	<i>Acinetobacter</i>
UAPS01-59	<i>Cellulomonas</i>
UAPS01-60	<i>Rizhobium</i>
UAPS01-61	<i>Microbacterium</i>
UAPS01-62	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-63	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-64	<i>Arthrobacter</i>
UAPS01-65	<i>Staphylococcus</i>
UAPS01-66	<i>Acinetobacter</i>
UAPS01-67	<i>Staphylococcus</i>
UAPS01-68	<i>Acinetobacter</i>
UAPS01-69	<i>Acinetobacter</i>
UAPS01-72	<i>Herbaspirillum</i>
UAPS01-74	<i>Herbaspirillum</i>
UAPS01-77	<i>Herminiimona</i>

UAPS01-78	<i>Spirillospora</i>
UAPS01-112	<i>Geodermatophilus</i>
UAPS01-113	<i>Geodermatophilus</i>
UAPS01-114	<i>Geodermatophilus</i>

### Anexo 7. Hibridacion Dot blot

El DNA genómico de las cepas metilotróficas fue transferido a membranas de nylon por dot blot utilizando 1 µg of DNA por cada gota, como control positivo utilizamos 100 ng de DNA genómico de la cepa tipo *M. extorquens* JCM2802, como control negativo 1 µg of DNA genómico de *U. maydis* 207. Las sondas fueron obtenidas por amplificación por PCR a partir del DNA genómico de la cepa tipo *Methylobacterium extorquens* JCM2802 con los oligonucleótidos mxaf 1003 y mxar 1561 (Mac Donald and Murray, 1997) para amplificar *mxaf* y con los oligonucleótidos xoxFf361 and xoxFr603 para amplificar *xoxF*. Las sondas fueron marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y usando random primers (Amersham Rediprime II DNA Labeling System, GE Healthcare). La prehibridación e hibridación se llevaron a cabo a 65°C por 12 h usando el kit comercial Rapid Hyb buffer (GE Healthcare). Las hibridaciones se realizaron utilizando 100 ng de sonda. La membranas fueron lavadas en condiciones de alta astringencia [2X SSC (1X SSC consiste de NaCl 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M) más SDS 0.1% por 10 min; 1X SSC más SDS 0.1% por 15 min; 0.5X SSC más SDS 0.1% por 15 min; 0.1X SSC más SDS 0.1% por 15 min; 0.1X SSC más SDS 0.1% a 65°C por 30 min y finalmente el SDS fue removido con 0.1X SSC] (Sambrook *et al* , 1989).

### Anexo 8. Imagen hibridación Dot Blot con la sonda *mxaf*.

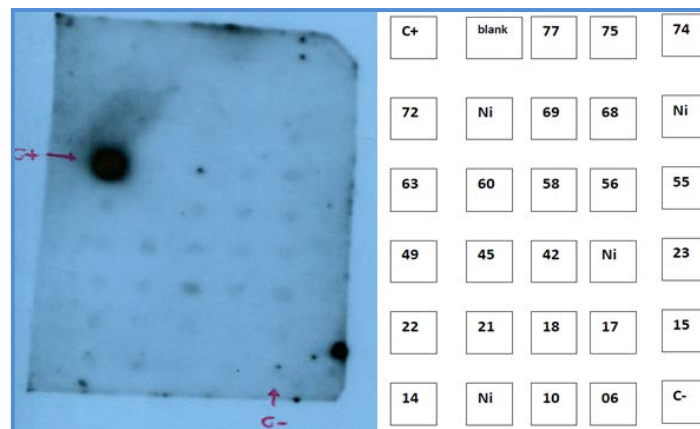


Imagen con señal débil de posibles bacterias metilotróficas con el loci *mxaf*. (Ni) indica las cepas que no se incluyeron en la publicación. C- control negativo *U. maydis* C+ control positivo *M. extorquens* (cepa de la cual se obtuvo por PCR la sonda *mxaf*).



## **Anexo 9.** Tabla de nucleótidos degenerados

---

Código de nucleótidos IUPAC	Base
R	A o G
Y	C o T
S	G o C
W	A o T
K	G o T
M	A o C
B	C o G o T
D	A o G o T
H	A o C o T
V	A o C o G
N	cualquier base

## Microbes and Environments

**Decision Letter (ME17070.R1)****From:** kent@jamstec.go.jp**To:** luis.fuentes@correo.buap.mx, uisltepetl@yahoo.com**CC:** kent@jamstec.go.jp**Subject:** Microbes and Environments - Decision on Manuscript ID ME17070.R1**Body:** 10-Jun-2017

Dear Prof. Dr. Fuentes-Ramirez:

After your fine revision according to the reviewers' comments, I acknowledge that your manuscript is now highly improved.

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Culturable facultative methylotrophic bacteria from the cactus *Neobuxbaumia macrocephala* possess the locus *xoxF* and consume methanol in the presence of  $Ce^{3+}$  and  $Ca^{2+}$ ." in its current form for publication in the Microbes and Environments. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Microbes and Environments, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Ken Takai

On behalf of

EDITORIAL OFFICE FOR MICROBES AND ENVIRONMENTS (M&E)  
Department of Subsurface Geobiological Analysis and Research (D-SUGAR)  
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC)  
2-15 Natsushima-cho, Yokosuka 237-0061, Japan  
E-mail: kent@jamstec.go.jp

**Date Sent:** 10-Jun-2017 Close Window



**Culturable facultative methylotrophic bacteria from the cactus *Neobuxbaumia macrocephala* possess the locus *soxF* and consume methanol in the presence of  $Ce^{3+}$  and  $Ca^{2+}$ .**

Journal:	<i>Microbes and Environments</i>
Manuscript ID	ME17070.R1
Manuscript Type:	Regular Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bustillos, Rocio; Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias Corona, Ivan; Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias Castaneda, Miguel; Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias Aguila, Carolina; Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias Seynos, Eduardo; Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias Hernandez, Ismael; Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Instituto de Biotecnologia Munoz, Jesus; Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias Medina, Liliana; Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Instituto de Biotecnologia Fuentes-Ramirez, Luis; Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias
Keywords:	Rare-earth elements, lanthanides, pectin metabolism, Tehuacan, <i>soxF5</i>
Categories:	Soil Microbial Ecology, Extremophile

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1 Culturable facultative methylotrophic bacteria from the cactus *Neobuxbaumia*  
2 *macrocephala* possess the locus *xoxF* and consume methanol in the presence of  $Ce^{3+}$   
3 and  $Ca^{2+}$ .

4

5 María del Rocío Bustillos-Cristales<sup>1</sup>, Ivan Corona-Gutierrez<sup>1</sup>, Miguel Castañeda-Lucio<sup>1</sup>,  
6 Carolina Águila-Zempoaltécatl<sup>1</sup>, Eduardo Seynos-García<sup>1</sup>, Ismael Hernández-Lucas<sup>2</sup>,  
7 Jesús Muñoz-Rojas<sup>1</sup>, Liliana Medina-Aparicio<sup>2</sup>, and Luis Ernesto Fuentes-Ramírez<sup>\*1</sup>.

8 <sup>1</sup> Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

9 Edif. 103-J, Ciudad Universitaria, CP 72570, Puebla, Pue., Mexico.

10 <sup>2</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Chamilpa  
11 2001, CP 62210, Cuernavaca, Mor., Mexico.

12 Topics of the manuscript: Ecology of bacteria in natural environments

Corresponding Author: Luis Ernesto Fuentes Ramírez

luis.fuentes@correo.buap.mx

Phone: +52 2222 295500 ext. 2522

Fax: +52 2222 295650

Abbrev. REEs, rare earth elements

1 Running head: *Methylotrophs from cactus possess xoxF*

2 ABSTRACT

3 Methanol-consuming culturable bacteria was isolated from plant surface,  
4 rhizosphere and inside the stem of *Neobuxbaumia macrocephala*. All the 38 isolates  
5 were facultative methylotrophic microorganisms. Their classification included the  
6 Classes Actinobacteria, Sphingobacteriia, Alpha-, Beta- and Gammaproteobacteria.  
7 Deduced amino acid sequences of methanol dehydrogenase obtained by PCR  
8 belonging to Actinobacteria, Alpha-, Beta- and Gammaproteobacteria showed high  
9 similarity to rare-earth elements (REEs)-dependent XoxF methanol dehydrogenases,  
10 particularly to the group XoxF5. The sequences included Asp<sup>301</sup>, the REEs-  
11 coordinating amino acid, present in all known XoxF dehydrogenases and absent in  
12 MxaF methanol dehydrogenases. Besides, a quantity of the isolates showed positive  
13 hybridization with a *xoxF* probe but not with a *mxoF* probe. Isolates of all the taxonomic  
14 groups showed methylotrophic growth in the presence of Ce<sup>3+</sup> or Ca<sup>2+</sup>. The presence of  
15 *xoxF*-like sequences in methylotrophic bacteria from *N. macrocephala* and its potential  
16 relationship with their adaptability to xerophytic plants are discussed.

17 Key words: Rare-earth elements, lanthanides, pectin metabolism, Tehuacan, *xoxF5*

18

19 INTRODUCTION

20 Methanol, one of the most common C1 compounds delivered by plants is  
21 released through the stomata. This compound is also produced in the decay of pectin  
22 and lignin from dead plant tissue (1, 25, 54). Methanol and organic molecules without  
23 C-C bonds are utilized as carbon and energy source by methylotrophic organisms.

1 These organisms are classified as facultative or obligate methylotrophs depending on  
2 their capability for using compounds with multiple C and C-C bonds. Methylotrophic  
3 microorganisms are ubiquitous and include organisms of the Classes *Actinobacteria*,  
4 *Spirochaetes*, *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- and *Deltaproteobacteria*, of the Phyla  
5 *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Nitrospirae*, *Verrucomicrobia*,  
6 *Cyanobacteria* and *Planctomycetes*, and even of the domain *Archaea* (7, 10, 19, 29,  
7 32, 36, 37, 42, 45, 50).

8 Many methylotrophic bacteria are commonly associated to plants. Nevertheless,  
9 until now there are not reports in *Cactaceae*. Several methylotrophs show positive  
10 effects when inoculated in plants (44, 45, 46, 63). These responses have been  
11 attributed to different mechanisms such as, nitrogen fixation, decreasing metal toxicity,  
12 contributing pyrroloquinoline quinone (PQQ), elicitation of plant defense, decreasing  
13 the plant level of ethylene, and synthesis of molecules like phytohormones, vitamin  
14 B12, polysaccharides, and osmoprotectants (13, 46, 47, 48, 57, 66, 70). Methanol and  
15 methane-catabolizing microorganisms oxidize methanol through different  
16 dehydrogenases and the methanol dehydrogenase MxaFI-MDH is the most studied  
17 one. It is a heterotetramer encoded by the genes *mxoF* and *mxoI*, and its activity  
18 depends on PQQ and  $\text{Ca}^{2+}$  as cofactors (11). MxaFI-MDH is typically carried by  
19 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and a few *Betaproteobacteria*. Some  
20 *Betaproteobacteria* also possess the PQQ methanol dehydrogenase MDH2, which  
21 shows sequence similarity to MxaFI-MDH (31, Fig. 1). Low GC gram-positive  
22 methylotrophs typically have a NADPH-dependent methanol dehydrogenase (8), and a  
23 methanol:NDMA (N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline) oxidoreductase has been reported in  
24 the Class *Actinobacteria* (30, 55). Other dehydrogenases phylogenetically related to  
25 MxaFI-MDH include a diverse but related group of enzymes that has been called XoxF.

1 It has been recently demonstrated that the XoxF dehydrogenases oxidize methanol  
2 and depend on rare-earth elements instead of  $\text{Ca}^{2+}$  as cofactors (24, 34, 53, 58).  
3 Sequence analysis shows that XoxF enzymes are grouped in at least five classes (64).

4 *Neobuxbaumia macrocephala* is a xerophytic branching columnar *Cactaceae*  
5 with a height from 3 to 15 m. This plant is endemic to the Tehuacán-Cuicatlán  
6 Biosphere Reserve and its distribution is confined to a few patches with calcareous  
7 soils (51, 59, 67). *N. macrocephala* has meager populations in comparison to other  
8 *Neobuxbaumia* species that can reside in other semi-arid habitats (21).

9 Bacteria of rhizospheric and non-rhizospheric soil bacteria associated to cacti  
10 mostly include *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria*, *Cyanobacteria*,  
11 *Planctomycetes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* and *Acidobacteria* (3, 5, 41, 65). The  
12 knowledge of the ecological interactions among cacti and microorganisms is scarce,  
13 including those of *N. macrocephala*. In order to design any future restoration strategy  
14 for endangered plant species, it would be desirable to retrieve broad knowledge of its  
15 biology. The diversity of cultured methylotrophic bacteria associated to this plant was  
16 explored as a first step with the aim of gaining insight into the ecology of *N.*  
17 *macrocephala* with microorganisms, and as a prerequisite for future inoculation  
18 experiments of this plant.

19

## 20 METHODOLOGY

### 21 Sampling

22 Rhizospheric soil, surface and endophytic samples were obtained from six plant  
23 specimens from the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve. Approximately 10 g of

1 | rhizospheric soil (profundity 15-25 cm) were retrieved from a distance within 1 m from  
2 | the sampled specimen. *ca.* 5 cm<sup>2</sup> of stem surface were sampled with sterile swabs  
3 | soaked in sterile 10 mM MgSO<sub>4</sub> solution. The swabs were deposited in 1 mL of the  
4 | same solution. For endophytic samples, *ca.* 5 cm<sup>2</sup> of stem surface were disinfected  
5 | with 70% ethanol, and *ca.* 1 cm<sup>3</sup> of tissue was extracted with a sterile scalpel. All the  
6 | samples were kept in sterile plastic sealed bags and transported under chilled  
7 | conditions to the lab.

8

#### 9 | Isolation and DNA extraction

10 | For endophytes isolation, approximately 2 mm of surface plant tissues including the  
11 | cuticle were discarded under sterile conditions. The remaining plant material was  
12 | macerated in a sterile mortar and resuspended in 10 mM MgSO<sub>4</sub> (1:10 weight:vol).  
13 | Epiphytic suspensions and soil dilutions in 10 mM MgSO<sub>4</sub> were inoculated on plates  
14 | (1.6% agar) of methanol mineral salts medium (MMSM; 28) containing 0.5% methanol;  
15 | 6.89 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4.56 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.228 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.811 mM MgSO<sub>4</sub>; 1.71 mM  
16 | NaCl; 3.7 μM FeCl<sub>3</sub>; 3.8 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20 nM CuSO<sub>4</sub>; 41.5 nM MnSO<sub>4</sub>; 38 nM  
17 | Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0.163 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0.243 μM ZnSO<sub>4</sub>; and 21 nM CoCl<sub>2</sub>, and incubated at 30°C  
18 | for 8-10 days. Isolated bacterial colonies were streaked in the same medium and  
19 | incubated at 30°C until growth was observed. Isolated colonies were grown in the  
20 | same medium and also in GP containing per liter Casein peptone 10 g, glycerol 10 g,  
21 | and agar 15 g. DNA was extracted from cells growing in MMSM medium with DNA  
22 | Isolation Kit for Cells and Tissues (Roche Inc.) following the recommended instructions  
23 | of the supplier.

24



1

2

3  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ce}^{3+}$ -methanol dependent growth

4 The isolates were grown in GP plates at 30 °C for four days. One loopful of bacterial  
5 cells was washed twice in 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , resuspended in 10 mL of the same solution  
6 and 5  $\mu\text{l}$  of the suspension were inoculated in 5 mL of modified MMSM added with 30  
7  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  or lacking  $\text{Ca}^{2+}$  and added with 30  $\mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$ . The cells were incubated at  
8 30 °C under shaking for five days. Bacterial growth was determined by absorbance at  
9 600 nm after 72, 96, 120 and 144 h of inoculation. The cultures of three independent  
10 replicates grown in either  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Ce}^{3+}$ -MMSM broths were statistically compared by  
11 unpaired t-test,  $p < 0.05$ .

12

13 Dot blot hybridization

14 Genomic DNAs were transferred to nylon filters by dot blot, 1  $\mu\text{g}$  of DNA per dot,  
15 except for *M. extorquens* JCM2802, 100 ng. 1  $\mu\text{g}$  of *U. maydis* 207 was used as  
16 negative control. DNA  $^{32}\text{P}$ -labeled probes, 100 ng, specific for *mxoF* and for *xoxF5*  
17 were used for the hybridizations. The probes were obtained by PCR amplification of  
18 *Methylobacterium extorquens* JCM2802 genomic DNA with the primers *mxo* f1003 and  
19 *mxo* r1561 (49); and *xox*Ff361 and *xox*Fr603 (Table 1), for *mxoF* and for *xoxF5*,  
20 respectively. The sizes of the probes were *ca.* 560 bases for *mxoF* and *ca.* 240 bases  
21 for *xoxF5*. The probes were labeled with  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  by polymerase extension using  
22 random primers (Amersham Rediprime II DNA Labeling System, GE Healthcare).  
23 Prehybridization and hybridization was carried out at 65 °C for 12 h using Rapid Hyb

1 buffer (GE Healthcare). The membranes were washed under high stringency  
2 conditions [2X SSC (1X SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) plus 0.1%  
3 SDS for 10 min, 1X SSC plus 0.1% SDS for 15 min, 0.5X SSC plus 0.1% SDS for 15  
4 min, 0.1X SSC plus 0.1% SDS for 15 min, 0.1X SSC plus 0.1% SDS at 65°C for 30 min  
5 and finally the SDS was removed with 0.1X SSC] (60).

6

#### 7 DNA amplification and sequencing

8 16S rRNA genes were amplified with the primers B27F (5'-TAG AGT TTG ATC CTG  
9 GCT CAG-3') and B1392R (5'-CAG GGG CGG TGT GTA-3') using the following  
10 conditions: one initial denaturation at 95°C 3 min, 26 cycles 94°C 30 s, 57°C 45 s, 72°C  
11 1 min, and a final extension at 72°C 10 min. Methanol dehydrogenase genes were  
12 amplified with the primers *mxoF*916 and *mxoF*1360 (Table 1) designed to  
13 amplify preferentially *mxoF*, *xoxF4* and *xoxF5*, using the following conditions: one initial  
14 denaturation at 95°C 3 min, 35 cycles 94°C 20 s, 55°C 45 s, 72°C 1 min, and one final  
15 extension 72°C 10 min. The design of the primers *mxoF*916 and *mxoF*1360  
16 was based on alignments of *mxoF*, *xoxF4* and *xoxF5* public sequences. Alignments of  
17 other *xoxF* subfamilies did not show conserved long enough regions for designing  
18 potentially acceptable primers. Sanger DNA sequencing were performed at Instituto de  
19 Biotecnología (UNAM, [www.ibt.unam.mx](http://www.ibt.unam.mx)) with the primers used for PCR amplification.

20

#### 21 Sequences analysis

22 Sequence analysis were performed with MEGA 7.0 (39). The sequences were aligned  
23 with database sequences of related microorganisms by ClustalW. Pairwise distances

1 and neighbor joining trees were used to determine the genus identity of the 16S rRNA  
2 sequences. Phylogeny of methanol dehydrogenases was inferred with maximum  
3 likelihood method with deduced amino acid sequences. Initial trees were determined  
4 by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances, and  
5 then selecting the topology with greatest log likelihood value. Confidence was  
6 determined by bootstrapping with 500 iterations.

7

#### 8 Nucleotidic sequences

9 16S rRNA sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers  
10 KT936080 – KT936091, KT936093, KT936095, KT936096, KT936105, KT936109 -  
11 KT936114, KT936119, KT936125 - KT936127, KT936134, KT936135, KT936140,  
12 KT936141, KT936144, KT936145, and KY00648 – KY00653; and *xoxF* sequences  
13 under the accession numbers KT932117 – KT932121, KT932123, KT932124,  
14 KT932126 - KT932128 and KY884986 – KY884988 (Table 2).

15

## 16 RESULTS

17 Thirty-eight bacterial isolates (Classes *Alphaproteobacteria*,  
18 *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Sphingobacteriia*) were  
19 obtained using methanol as the sole carbon and energy source (Table 2). All of them  
20 also showed facultative growth using other carbon and energy sources. None of  
21 obligate methylotrophic bacteria was found. Twenty-two strains were isolated from  
22 plant surface (one *Actinobacteria*, four *Alphaproteobacteria*, four *Betaproteobacteria*,  
23 and thirteen *Gammaproteobacteria*); six isolates were endophytic (three

1 *Alphaproteobacteria* and three *Gammaproteobacteria*); and ten were rhizospheric (two  
2 *Actinobacteria*, one *Sphingobacteriia* (Phylum *Bacteroidetes*), four  
3 *Alphaproteobacteria*, and three *Gammaproteobacteria*). The identity of the  
4 methylotrophic bacteria from the plant surface, from inside the plant, or rhizosphere  
5 were as follows: *Arthrobacter*, one epiphyte and two rhizospheric; *Pedobacter*, one  
6 rhizospheric, *Microvirga*, four epiphytes; *Inquilius*, two rhizospheric;  
7 *Methylobacterium*, one epiphyte, and one rhizospheric; *Rhizobium*, one rhizospheric;  
8 *Sphingomonas*, one endophyte; *Subaequorebacter/Geminicoccus*, one endophyte;  
9 *Massilia*, four epiphytes; *Acinetobacter*, twelve epiphytes, three rhizospheric, and three  
10 endophytes; and *Pseudomonas*, one epiphyte (Table 2, Fig. S1).

11 All the methylotrophic isolates tested showed growth with methanol as carbon  
12 and energy source and  $\text{Ca}^{2+}$  or REE,  $\text{Ce}^{3+}$ , as cofactors (Table 3). Different isolates  
13 showed distinct methylotrophic growth rates. Hence the time of their maximum growth  
14 in the presence of  $\text{Ce}^{3+}$  ranged from 72 to 144 h of incubation. Most of the isolates did  
15 not show preference for either cofactor, but for some of them it was apparent that one  
16 of the cofactors improved the methylotrophic growth. For this assay, 22 isolates were  
17 chosen to include all taxonomical groups. Those strains included two *Actinobacteria*,  
18 one *Sphingobacteriia*, ten *Alphaproteobacteria*, one *Betaproteobacteria* and eight  
19 *Gammaproteobacteria*.

20 Amplicons (approximately 550 bp long) with *mxoF*-targeted primers were  
21 obtained in 34.2% (13) of the isolates. All the sequences were more similar to XoxF-  
22 like methanol dehydrogenases, rather than MDH-like methanol dehydrogenases (Fig.  
23 1). After sequence analysis, five *Alphaproteobacteria*, three *Betaproteobacteria*, four  
24 *Gammaproteobacteria*, and one *Actinobacteria* isolates were found to possess *xoxF5*

1 like sequences. Furthermore, Asp<sup>301</sup> characteristic of XoxF dehydrogenases was  
2 detected in all of the amplicons that covered that region (Fig. 2, Table 2).

3 Among the twenty-five isolates from which amplicons could not be obtained with  
4 the *mxaf* and *xoxF*-targeted primers, eleven isolates clearly hybridized with a *xoxF5*  
5 probe from *M. extorquens* (Table 2; Fig. 3), one *Actinobacteria*, four  
6 *Alphabroteobacteria*, one *Betaproteobacteria*, and five *Gammaproteobacteria*. The  
7 remaining fourteen isolates did not hybridize to the *xoxF5* probe nor were amplified  
8 with the *mxaf**xoxF* primers, including one *Actinobacteria*, one *Sphingobacteriia*, two  
9 *Alphaproteobacteria*, and ten *Gammaproteobacteria*. The hybridization with the *mxaf*  
10 probe was very faint, but some dots indicate that the organism might possess *mxaf*  
11 loci (Fig. S2).

## 13 DISCUSSION

14 Methanol and methane are very common carbon compounds produced by  
15 plants (25, 35). Methylotrophy is distributed in many different taxa (38). In this work,  
16 bacteria of the Classes *Actinobacteria*, *Sphingobacteriia*, *Alpha*-, *Beta*- and  
17 *Gammaproteobacteria* were isolated in a methanol based medium. This mostly plant-  
18 originated compound is a very common C-source in nature, so numerous plant-  
19 associated microorganisms have the capability to use it.

20 Among the methylotrophs cultivated from *N. macrocephala* and its rhizosphere,  
21 most of them were isolated from the stem surface. We hypothesize that this relates to  
22 the presence of stomata and consequently to the main source of methanol proceeding  
23 from inner plant tissues (25). All the dehydrogenase sequences obtained were similar  
24 to *xoxF5* genes that are phylogenetically related to other *xoxF* subfamilies and to

1 *mxoF*. These *xoxF5*-like sequences were obtained from the isolates belonging to the  
2 *Classes of Actinobacteria, and Alpha-, Beta-, and Gammaproteobacteria. Previously,*  
3 *mxoF*-like sequences have been found in these classes and the phyla *Bacteroidetes*  
4 *and Verrucomicrobia* (6, 12, 36). Aspartic acid 301, the amino acid responsible for  
5 REEs coordination (34) was found in all of the sequences that ~~had been amplified~~  
6 ~~with the *mxoF*-*xoxF* primers and that~~ covered that region. In contrast, none of the  
7 sequences s showed amino acids different to Asp in that position. Additionally, none of  
8 the amplicons with *mxoF*-*xoxF*-targeted primers were in fact *mxoF* but *xoxF5*. So, it is  
9 striking that the sequenced amplicons really code for XoxF dehydrogenases.  
10 Nevertheless, we cannot rule out that some of the isolates possessed *mxoF* since the  
11 faint dot-blot hybridization with a *mxoF* probe. The positive hybridizations with the *xoxF*  
12 probe indicated that those strains might possess *xoxF5*. Although we cannot exclude  
13 that sequences of other *xoxF* subfamilies could cross-hybridize with the probe, the  
14 hybridization and washing stringency conditions reduce that possibility. Some of the  
15 isolates that did not hybridized with the *xoxF5* and *mxoF* probes nor were amplified  
16 with *mxoF*-*xoxF* primers might possess other sequences of the *xoxF* subfamilies or  
17 other methanol dehydrogenases like MDH2 or NAD-dependent methanol  
18 dehydrogenase. Although we also designed primers and attempted unsuccessfully the  
19 amplification of methanol:NDMA oxidoreductase (Table S1, Results not shown), its  
20 presence cannot be excluded. In some of the cases in which we detected hybridization  
21 to *mxoF* or to *xoxF5*, we were unsuccessful to obtain amplicons of the methanol  
22 dehydrogenase genes. This inconsistency might be related to the design of the  
23 primers. All the isolates tested in the methylotrophy assay grew using  $\text{Ce}^{3+}$ , as  
24 expected, but interestingly could also use  $\text{Ca}^{2+}$  as cofactor. So it is still unclear if XoxF  
25 enzymes can accept  $\text{Ca}^{2+}$  besides REE, as suggested by Keltjens *et al.* 2014 (34).

1           The ubiquity of *xoxF*, of their peptides and of bacteria carrying them in nature  
2 has been shown in different studies, including the *N. macrocephala*-related ecosystem.  
3 | XoxF has been detected in the phyllospheres of rice, clover, soybean and *Arabidopsis*  
4 (18, 37). Similarly, a study in a particular marine environment also showed high  
5 abundance of XoxF (61). Besides in an autecological approach, semi in-situ SIP assay  
6 detected high expression of a *xoxF*-like locus in *Methylotenera mobilis* (68).  
7 Furthermore, the methanol oxidation in *Methylomicrobium buryatense*, possessing  
8 both, *xoxF* and *mxoA* functional loci, seems to be accomplished mainly by XoxF (15).

9 |           Whether there is a biogeography of the subfamilies of *xoxF* is still unknown.  
10 New studies of methylotrophy with non-culture and culture approaches in different  
11 environments are necessary. A pioneer ecological study of the different *xoxF*  
12 subfamilies in coastal marine water only detected sequences of the clusters *xoxF4* and  
13 *xoxF5* (64). In a different environment, the methanol dehydrogenase peptides XoxF  
14 and MxaF of *Methylobacterium*, microorganism that only possesses *xoxF5* and *mxoA*  
15 sequences, were abundantly detected in the phyllosphere of soybean, clover, rice and  
16 *A. thaliana* (18, 37). The present culture-dependent study shows the presence of  
17 microorganisms possessing sequences of the subfamily *xoxF5* in the semi-arid  
18 environment of *N. macrocephala*.

19           The study with some XoxF enzymes has shown high affinity for methanol (34,  
20 58). If the enzymes of more diverse microorganisms show similar behavior, XoxF could  
21 be crucial for methylotrophic bacteria that thrive in plants showing slow metabolic  
22 properties and producing methanol at low rates, like cacti. The presence of XoxF might  
23 be favored in environments where sand, and therefore REEs, are abundant like arid  
24 lands (58).

1 Besides the participation in the methylotrophic metabolism, XoxF might be  
2 involved in the regulation of stress responses and in the denitrification metabolism (23,  
3 52). The putative role in the stress response could be particularly important in the semi-  
4 arid areas and in the plant surfaces.

5

6 Although the typical methanol dehydrogenase from Actinobacteria is the  
7 methanol:NDMA oxidoreductase, they do not exclusively carry it. The synthesis of  
8 PQQ by Actinobacteria in the presence of methanol suggested the possible presence  
9 of a PQQ-dependent methanol dehydrogenase (29). In other study, a *Brevibacterium*  
10 *casei* strain, an actinobacterial methylotrophic human mouth microorganism, carried a  
11 *mxoF* methanol dehydrogenase sequence (6; see Fig. 1), and more recently,  
12 metagenomic studies in the desert of Atacama detected *Pseudonocardia* PQQ  
13 methanol dehydrogenase genes (43). The presence of *xoxF* genes in *Actinobacteria*  
14 isolated in this study might be originated by lateral transfer events as has been  
15 detected in the locus *mxoF* of methanotrophic bacteria (9, 40) and in methylotrophic  
16 *Alphaproteobacteria* (9).

17 The methylotrophic isolates from the environment of *N. macrocephala* belonged  
18 to *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Sphingobacteriia*. Among all of them,  
19 *Acinetobacter* spp. (*Gammaproteobacteria*) were the organisms most frequently  
20 isolated. It has been reported that *Acinetobacter* uses methanol as carbon source (27,  
21 71) and a methanol dehydrogenase sequence coding Asp<sup>301</sup> has been previously  
22 detected in this genus (27). Similarly to this work, other studies have shown  
23 *Proteobacteria* and *Actinobacteria* as some of the most common taxa in rhizosphere  
24 and soil from cacti and other plants from arid lands (3, 14, 16, 33).



1

2

3           Methylotrophic bacteria are ubiquitous and have meaningful roles in  
4 ecosystems. Water is limiting most of the time in arid environments, hence perennial  
5 plants from those environments show restrained growth, particularly throughout the dry  
6 season. The community of methylotrophic culturable bacteria associated to the semi-  
7 arid thriving cactus *N. macrocephala* include *xoxF*-like dehydrogenases-possessing  
8 microorganisms. Their ecological role in xerophytic plants is matter for forthcoming  
9 work. We are aware that the cultivation procedures do not necessarily produce a real  
10 picture of the bacterial diversity, so future application of non-culture approach will  
11 enrich the knowledge of methylotrophic diversity in this environment. In future  
12 inoculation experiments, we pretend to detect isolates of methylotrophic bacteria that  
13 could stimulate the growth of *N. macrocephala*, particularly in the vulnerable juvenile  
14 stage.

15

16

17

18 Acknowledgments.

19 This work was partially funded by projects CONACYT CB-2009-128235-Z and BUAP-  
20 VIEP. We thank to Antonino Báez (Instituto de Ciencias, BUAP) for editing the  
21 manuscript. We are grateful to Ángeles Domínguez, Liliana López (Instituto de  
22 Ciencias, BUAP) and Aracely Jacinto for statistical and technical assistance. We are  
23 grateful to Rebeca Martínez and Mónica Martínez (Instituto de Ciencias, BUAP) for

1 providing DNA of *U. maydis* 207. We acknowledge the suggestions of anonymous  
2 referees. *In memoriam* of Jesús Caballero, an exemplary scientist and excellent friend.

3

4

## 5 REFERENCES

- 6 1. Abanda-Nkpwatt, D., M. Müsch, J. Tschiersch, M. Boettner, and W. Schwab.  
7 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and  
8 seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the  
9 methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57:4025–4032.
- 10 2. Aguirre-Garrido, J.F., D. Montiel-Lugo, C. Hernández-Rodríguez, G. Torres-  
11 Cortes, V. Millán, N. Toro, F. Martínez-Abarca, and H.C Ramírez-Saad. 2012.  
12 Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from  
13 semi-arid highlands in central Mexico. *Anton. Leeuw. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*  
14 101:891–904.
- 15 3. Andrew, D.R., R.R. Fitak, A. Munguia-Vega, A. Racolta, V.G. Martinson, and K.  
16 Dontsov. 2012. Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran desert soils.  
17 *Appl. Environ. Microbiol.* 78:7527-7537.
- 18 4. Anesti, V., I.R. McDonald, M. Ramaswamy, W.G. Wade, D.P. Kelly, and A.P.  
19 Wood. 2005. Isolation and molecular detection of methylophilic bacteria  
20 occurring in the human mouth. *Environ. Microbiol.* 7:1227–1238.
- 21 5. Antony, C.P., D. Kumaresan, L. Ferrando, R. Boden, H. Moussard, A.  
22 Fernández-Scavino, Y.S. Shouche, and J.C. Murrell. 2010. Active

- 1           methylotrophs in the sediments of Lonar Lake, a saline and alkaline ecosystem  
2           formed by meteor impact. ISME J. 4:1470-1480.
- 3           6. Arfman, N., H.J. Hektor, L.V. Bystrykh, N.I. Govorukhina, L. Dijkhuizen, and J.  
4           Frank. 1997. Properties of an NAD(H)-containing methanol dehydrogenase and  
5           its activator protein from *Bacillus methanolicus*. Eur. J. Biochem. 244:426-433.
- 6           7. Beck, D.A.C., McTaggart, T.L., Setboonsarng, U., Vorobev, A., Goodwin, L.,  
7           Shapiro, N., Woyke, T., Kalyuzhnaya, M.G., Lidstrom, M.E., and Chistoserdova,  
8           L. 2015 Multiphyletic origins of methylotrophy in Alphaproteobacteria,  
9           exemplified by comparative genomics of Lake Washington isolates. Environ,  
10          Microbiol. 17:547–554.
- 11          8. Borodina, E., D.P. Kelly, F.A Rainey, N.L. Ward-Rainey, and A.P. Wood. 2000.  
12          Dimethylsulfone as a growth substrate for novel methylotrophic species of  
13          *Hyphomicrobium* and *Arthrobacter*. Arch. Microbiol. 173:425–437.
- 14          9. Chistoserdova, L. 2011. Modularity of methylotrophy, revisited. Environ.  
15          Microbiol. 13:2603–2622.
- 16          10. Chistoserdova, L., and M.E. Lidstrom. 1997. Molecular and mutational analysis  
17          of a DNA region separating two methylotrophy gene clusters in  
18          *Methylobacterium extorquens* AM1. Microbiology 143:1729-1736.
- 19          11. Choi, O., J. Kim, J.-G. Kim, Y. Jeong, J.S. Moon, C.S. Park, and I. Hwang.  
20          2008. Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by  
21          *Pseudomonas fluorescens* B16. Plant Physiol. 146:657–668.

- 1 12. Chowdhury, S.P., M. Schmid, A. Hartmann, and A.K. Tripathi. 2009. Diversity of  
2 16S-rRNA and *nifH* genes derived from rhizosphere soil and roots of an  
3 endemic drought tolerant grass, *Lasiurus syndicus*. Eur. J. Soil Biol. 45 114-122.
- 4 13. Chu, F., Lidstrom, M.E. 2016. XoxF acts as the predominant methanol  
5 dehydrogenase in the Type I methanotroph *Methylomicrobium buryatense*. J.  
6 Bacteriol. 198:1317-1325.
- 7 14. Connon, S.A., E.D. Lester, H.S. Shafaat, D.C. Obenhuber, and A. Ponce. 2007.  
8 Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils. J. Geophys. Res.  
9 Biogeosciences 112:G04S17.
- 10 15. Delmotte, N., C. Knief, S. Chaffron, G. Innerebner, B. Roschitzki, R.  
11 Schlapbach, C. von Mering, and J. Vorholt. 2009. Community proteogenomics  
12 reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. Proc. Natl. Acad.  
13 Sci. 106:16428–16433.
- 14 16. de Vries, G.E., N. Arfman, P. Terpstra, and L. Dijkhuizen. 1992. Cloning,  
15 expression, and sequence analysis of the *Bacillus methanolicus* Cl methanol  
16 dehydrogenase gene. J. Bacteriol. 74:5346-5353.
- 17 17. Esparza-Olguin, L., T. Valverde, and M.C. Mandujano. 2005. Comparative  
18 demographic analysis of three *Neobuxbaumia* species (*Cactaceae*) with  
19 differing degree of rarity. Popul. Ecol. 47:229–245.
- 20 18. Farhan, M., Kalidass, B., Bandow, N., Turpin, E.A., DiSpirito, A.A. y Semrau,  
21 J.D. 2008. Cerium regulates expression of alternative methanol  
22 dehydrogenases in *Methylosinus trichosporium* OB3b. Appl. Environ. Microbiol.  
23 81:7546 –7552. doi:10.1128/AEM.02542-15.

- 1 19. Firsova, Y.E., Torgonskaya, M.L., and Trotsenko, Y.A. 2015. Functionality of  
 2 the *xoxF* gene in *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4. Microbiology  
 3 (Russia) 84:796–803.
- 4 20. Fitriyanto, N.A., M. Fushimi, M. Matsunaga, A. Pertiwiningrum, T. Iwama, and  
 5 K. Kawai. 2011. Molecular structure and gene analysis of Ce<sup>3+</sup>-induced  
 6 methanol dehydrogenase of *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. J. Biosci.  
 7 Bioeng. 111:613-617.
- 8 21. Galbally, L.E., and W. Kirstine. 2002 The production of methanol by flowering  
 9 plants and the global cycle of methanol. J. Atmos. Chem. 43:195–229.
- 10 22. Ghosh, A., A. Goyal, and K.J. Rakesh. 2007. Study of methanol-induced  
 11 phenotypic changes in a novel strain of *Acinetobacter lwoffii*. Arch. Microbiol.  
 12 188:533–539.
- 13 23. Green, P.N. 2006. *Methylobacterium*, p. 257-265. In: M. Dworkin, S. Falkow, E.  
 14 Rosenberg, K. –H. Schleifer and E. Stackebrandt (ed.), The Prokaryotes, vol. 5.  
 15 Springer, New York.
- 16 24. Hazeu, W., J.C. de Bruijn, and J.P. van Dijken. 1983. *Nocardia* sp. 239, a  
 17 facultative methanol utilizer with the ribulose monophosphate pathway of  
 18 formaldehyde fixation. Arch. Microbiol. 135:205-210.
- 19 25. Hektor, H.J., H. Kloosterman, and L. Dijkhuizen. 2000. Nicotinoprotein methanol  
 20 dehydrogenase enzymes in Gram-positive methylotrophic bacteria. J. Mol.  
 21 Catal. B-Enzym. 8:103–109.
- 22 26. Kalyuzhnaya, M.G., K.R. Hristova, M.E. Lidstrom, and L. Chistoserdova. 2008a.  
 23 Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of

- 1 *Burkholderiales*: implications for environmental detection of methylotrophy and  
2 evidence for convergent evolution. J. Bacteriol. 190:3817–3823.
- 3 27. Kalyuzhnaya, M.G., A. Lapidus, N. Ivanova, *et al.* 2008b. High-resolution  
4 metagenomics targets specific functional types in complex microbial  
5 communities. Nat. Biotechnol. 26:1029-1034.
- 6 28. Kaplan, D., M. Maymon, C.M. Agapakis, A. Lee, A. Wang, B.A. Prigge, M.  
7 Volkogon, and A.M. Hirsh. 2013. A survey of the microbial community in the  
8 rhizosphere of two dominant shrubs of the Negev desert highlands,  
9 *Zygophyllum dumosum* (Zygophyllaceae) and *Atriplex halimus*  
10 (Amaranthaceae), using cultivation-dependent and cultivation-independent  
11 methods. Am. J. Bot. 100:1–13.
- 12 29. Keltjens, J.T., A. Pol, J. Reimann, and H.J.M. Op den Camp. 2014. PQQ-  
13 dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference.  
14 Appl. Microbiol. Biotechnol. 98:6163–6183.
- 15 30. Keppler, F., J.T.G. Hamilton, M. Brass, M., and T. Röckmann. 2006. Methane  
16 emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. Nature 439:187-191.
- 17 31. Kist, J., and R.L. Tate III. 2013. Phylogeny of bacterial methylotrophy genes  
18 reveals robustness in *Methylobacterium mxoF* sequences and *mxo* operon  
19 construction. Soil Biol. Biochem. 59:49-57.
- 20 32. Knief, C., N. Delmotte, S. Chaffron, M. Stark, G. Innerebner, R. Wassmann, C.  
21 von Mering, C., and J. Vorholt. 2012. Metaproteogenomic analysis of microbial  
22 communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. The ISME J. 6:1378–  
23 1390.

- 1 33. Kolb, S., and Stacheter, A. 2013. Prerequisites for amplicon pyrosequencing of  
 2 microbial methanol utilizers in the environment. *Frontiers Microbiol.* 4:article  
 3 268.
- 4 34. Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA:Molecular Evolutionary  
 5 Genetic Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
- 6 35. Lau, E., M.C. Fisher, P.A. Steudler, and C.M. Cavanaugh, C.M. 2013. The  
 7 methanol dehydrogenase gene, *mxhF*, as a functional and phylogenetic marker  
 8 for proteobacterial methanotrophs in natural environments. *PLoS ONE* 8:  
 9 e56993. doi:10.1371/journal.pone.0056993
- 10 36. Lee, S.D., and C.N. Seong. 2014. *Nocardioides opuntiae* sp nov., isolated from  
 11 soil of a cactus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:2094-2099.
- 12 37. Lidstrom, M.E. 2006. Aerobic methylotrophic *Prokaryotes*, p. 618–634. In A.  
 13 Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer, K.-H. (ed.),  
 14 *The Prokaryotes*, vol. 2. Springer, New York.
- 15 38. Lynch, R.C., J.L. Darcy, N.C. Kane, D.R. Nemergut, and S.C. Schmidt. 2014.  
 16 Metagenomic evidence for metabolism of trace atmospheric gases by high-  
 17 elevation desert Actinobacteria. *Front. Biol.* 5:698.
- 18 39. Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, H.S. Lee, K. Hari, S.P. Sundaram, and T.M.  
 19 Sa. 2005. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate  
 20 germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum*  
 21 *officinarum* L.). *Biol. Fertil. Soils* 41:350–358.

- 1 40. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J.-S., Lee, K.C., and Sundaram, S. 2010.  
2 *Flavobacterium glycines* sp. nov., a facultative methylophile isolated from the  
3 rhizosphere of soybean. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:2187–2192.
- 4 41. Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, and T. Sa. 2007. Metal tolerating  
5 methylophile bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes  
6 plant growth on tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* 69:220-  
7 228.
- 8 42. Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, S.P. Sundaram, and T. Sa.  
9 2009. Nodulation and plant-growth promotion by methylophile bacteria  
10 isolated from tropical legumes. *Microbiol. Res.* 164:114-120.
- 11 43. Madhaiyan, M., S. Reddy, R. Anandham, M. Senthilkumar, S. Poonguzhali,  
12 S.P. Sundaram, and T.M. Sa. 2006. Plant growth–promoting *Methylobacterium*  
13 induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with  
14 rot pathogens. *Curr. Microbiol.* 53:270–276.
- 15 44. McDonald, I.R., and J.C. Murrell. 1997. The methanol dehydrogenase structural  
16 gene *mxoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and  
17 methylophiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3218–3224.
- 18 45. McTaggart, T.L., D.A.C. Beck, U. Setboonsarng, N. Shapiro, T. Woyke, M.E.  
19 Lidstrom, M.G Kalyuzhnaya, and L. Chistoserdova. 2015. Genomics of  
20 methylophile in Gram-positive methylamine-utilizing bacteria. *Microorganisms*  
21 3:94-112.
- 22 46. Miquelajauregui, Y., and T. Valverde. 2010. Survival and early growth of two  
23 congeneric cacti that differ in their level of rarity. *J. Arid Environ.* 74:1624-1631.



- 1 47. Mustakhimov, I., Kalyuzhnaya, M.G., Lidstrom, M.E., and Chistoserdova, L.  
 2 2013. Insights into denitrification in *Methylothermobacter mobilis* from denitrification  
 3 pathway and methanol metabolism mutants. *J. Bacteriol.* 195:2207–2211.
- 4 48. Nakagawa, T., R. Mitsui, A. Tani, K. Sasa, S. Tashiro, T. Iwama, T. Hayakawa,  
 5 and K. Kawa. 2012. A catalytic role of XoxF1 as La<sup>3+</sup>-dependent methanol  
 6 dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. *PLoS ONE*  
 7 7:e50480. doi:10.1371/journal.pone.0050480.
- 8 49. Nemecek-Marshall, M., R.C. MacDonald, J.J. Franzen, C. Wojciechowski, and  
 9 R. Fall. 1995. Methanol emission from leaves: enzymatic detection of gas  
 10 phase methanol and relation of methanol fluxes to stomata conductance and  
 11 leaf development. *Plant Physiol.* 108:1359-1368.
- 12 50. Park, H., H. Lee, Y.T. Ro, and Y.M. Kim. 2010. Identification and functional  
 13 characterization of a gene for the methanol:N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline  
 14 oxidoreductase from *Mycobacterium* sp. strain JC1 (DSM 3803). *Microbiology.*  
 15 156:463–471.
- 16 51. Pigoleva, S.V., N.S. Zakharchenko, A.V. Pigolev, Y.A. Trotsenko, and Y.I.  
 17 Buryanov. 2009. Influence of colonizing methylobacteria on morphogenesis and  
 18 resistance of sugar beet and white cabbage plants to *Erwinia carotovora*.  
 19 *Microbiology (Russia)* 45:604–609.
- 20 52. Pol, A., T.R.M. Barends, A. Dietl, A.F. Khadem, J. Eygensteyn, M.S.M. Jetten,  
 21 and H.J.M. Op den Camp. 2014. Rare earth metals are essential for  
 22 methanotrophic life in volcanic mudpots. *Environ. Microbiol.* 16:255–264.

- 1 53. Ruedas, M., T. Valverde, and J.A. Zavala-Hurtado. 2006. Analysis of the factors  
2 that affect the distribution and abundance of three *Neobuxbaumia* species  
3 (*Cactaceae*) that differ in their degree of rarity. *Acta Oecol.-Int. J. Ecol.* 29:155-  
4 164.
- 5 54. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a*  
6 *laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
7 Spring Harbor, NY.
- 8 55. Sowell, S.M., Abraham, P.E., Shah, M., Verberkmoes, N.C., Smith, D.P.,  
9 Barofsky, D.F., and Giovannoni, S.J. 2011. Environmental proteomics of  
10 microbial plankton in a highly productive coastal upwelling system. *ISME J.*  
11 5:856-865.
- 12 56. Tani, A., Y. Takai, I. Suzukawa, M. Akita, H. Murase, and K. Kimbara, K. 2012.  
13 Practical application of methanol-mediated mutualistic symbiosis between  
14 *Methylobacterium* species and a roof greening moss, *Racomitrium japonicum*.  
15 *PLoS ONE* 7(3):e33800. doi:10.1371/journal.pone.0033800
- 16 57. Taubert, M., Grob, C., Howat, A.M., Burns, O.J., Dixon, J.L., Chen, Y., and  
17 Murrell, J.C. 2015. XoxF encoding an alternative methanol dehydrogenase is  
18 widespread in coastal marine environments. *Environ. Microbiol.* 17:3937-3948.
- 19 58. Torres-Cortés, G., V. Millán, A.J. Fernández-González, J.F. Aguirre-Garrido,  
20 H.C. Ramírez-Saad, M. Fernández-López, N. Toro, and F. Martínez-Abarca.  
21 2012. Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria*  
22 *carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. *Plant Soil*  
23 357:275–288.

- 1 59. Trotsenko, Y.A., E.G. Ivanova, and N.V. Doronina. 2001. Aerobic  
 2 methylophilic bacteria as phytosymbionts. *Microbiology (Russia)* 70:725–736.
- 3 60. Valiente-Banuet, A., A. Rojas-Martínez, M. del Coro-Arizmendi, and P. Davila.  
 4 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis*  
 5 and *Neobuxbaumia macrocephala*) in Tehuacan Valley, Central Mexico. *Am. J.*  
 6 *Bot.* 84:452–455.
- 7 61. Vorobev, A., D.A.C. Beck, M.G. Kalyuzhnaya, M.E. Lidstrom, and L.  
 8 Chistoserdova. 2013. Comparative transcriptomics in three *Methylophilaceae*  
 9 species uncover different strategies for environmental adaptation. *PeerJ*1:e115;  
 10 DOI10.7717/peerj.115
- 11 62. Yim, W.J., K.Y. Kim, Y.W. Lee, S.P. Sundaram, Y. Lee, and T.M. Sa. 2014.  
 12 Real time expression of ACC oxidase and PR-protein genes mediated by  
 13 *Methylobacterium* spp. in tomato plants challenged with *Xanthomonas*  
 14 *campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Plant Physiol.* 171:1064-1075.
- 15 63. Yuan, H., J. Yao, K. Masakorala, F. Wang, M. Cai, and C. Yu. 2014. Isolation  
 16 and characterization of a newly isolated pyrene-degrading *Acinetobacter* strain  
 17 USTB-X. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21:2724–2732.

18  
 19  
 20  
 21  
 22

## 1 FIGURE CAPTIONS

2 **Fig. 1.** Phylogeny of putative methanol dehydrogenase amplicons of *N. macrocephala*  
3 *isolates*. Sequences of *N. macrocephala* isolates are shown in bold blue letters. The  
4 sequences were aligned by Muscle. The phylogeny was constructed with maximum-  
5 likelihood in MEGA 6.0 using deduced amino acid sequences. 500 iterations were used  
6 for bootstrapping.

7  
8 **Fig. 2.** Partial alignment of sequences of methanol dehydrogenases that cover the  
9 region encoding Asp<sup>301</sup>. Asp<sup>301</sup> (D) has been detected in all XoxF dehydrogenases and  
10 it is necessary for REE coordination. MxaF dehydrogenases do not possess Asp<sup>301</sup>.

11  
12 **Fig. 3.** Dot-Blot hybridization with *xoxF*. Lines A1, UAPS0104; A2, UAPS0105; A3,  
13 UAPS0106; A4, UAPS0181; A5, UAPS0110; A6, UAPS0102; A7, UAPS0184; B1,  
14 UAPS0182; B2, UAPS0149; B3, UAPS0121; B4, UAPS0122; B5, UAPS0123; B6,  
15 UAPS0126; B7, UAPS0127; C1, UAPS0114; C2, UAPS0136; C3, UAPS0137; C4,  
16 UAPS0180; C5, UAPS0115; C6, UAPS0142; C7, UAPS0145; D1, UAPS0179; D2,  
17 UAPS0174; D3, UAPS0118; D4, UAPS0155; D5, UAPS0156; D6, UAPS0158; D7,  
18 UAPS0177; E1, UAPS0165; E2, UAPS0120; E3, UAPS0160; E4, UAPS0168; E5,  
19 UAPS0169; E6, UAPS0175; E7, UAPS0172; F1, UAPS0117; F2, UAPS0183; F3,  
20 UAPS0163; F4, *M. extorquens* JCM2802 (100 ng); F5, *Ustilago maydis* 207; F6 and  
21 F7, void. 1 µg of total DNA of the bacterial strains evaluated was transferred to nylon  
22 membranes. PCR probes (100 ng) were obtained by PCR amplification of  
23 *Methylobacterium extorquens* JCM2802 with the primers *xoxF*5f361 5'-CAG GAT CCG  
24 TCC GTG AT-3' and *xoxF*5r603 5'-SGA GAT GCC GAC GAT GA-3'.

25  
26

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

For Peer Review

**Table 1. Methanol dehydrogenase primers.**

Primer*	Sequence (5'-3')	Target	Reference
mxaf1003 mxar1561	GCG GCA CCA ACT GGG GCT GGT GGG CAG CAT GAA GGG CTC CC	<i>mxaf</i>	McDonald and Murrell 1977
<i>soxF361f</i> <i>soxF603r</i>	CAG GAT CCG TCC GTG AT SGA GAT GCC GAC GAT GA	<i>M. extorquens soxF</i>	This work
<i>mxafsoxF916f</i> <i>mxafsoxF1360r</i>	GGC GAC AAC AAG TGG WCG ATG AGT CCA TGC AGA CRT GGT T	<i>mxaf, soxF4, soxF5</i>	This work

\*Numbers indicate approximate position in the gene.

**Table 2. Methyrotrophic culturable isolates from *N. macrocephala*.**

Isolate	Genus	Taxonomic Class	16S rRNA	Origin	Hybridization with		Amplicons with	Subjected to the
			Acc. Num.		<i>mxoF</i>	<i>xoxF</i>	<i>mxoF-xoxF</i> primers	
UAPS0102	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria	KT936093	Rhizospheric	ND	P	NA	<u>Yes</u>
UAPS0104	<i>Arthrobacter</i>		KT936095	Epiphytic	ND	S	NA	<u>No</u>
UAPS0105	<i>Arthrobacter</i>		KT936096	Rhizospheric	ND	P	KT932119 <sup>D</sup>	<u>Yes</u>
UAPS0126	<i>Pedobacter</i>	<u>Sphigobacteriia</u>	KT936125	Rhizospheric	ND	N	NA	<u>Yes</u>
UAPS0120	<i>Microvirga</i>	Alphaproteobacteria	KT936105	Epiphytic	ND	N	KY884987	<u>Yes</u>
UAPS0121	<i>Microvirga</i>		KT936119	Epiphytic	S	S	NA	<u>Yes</u>
UAPS0136	<i>Microvirga</i>		KT936112	Epiphytic	ND	S	NA	<u>Yes</u>
UAPS0137	<i>Microvirga</i>		KT936113	Epiphytic	ND	P	NA	<u>Yes</u>
UAPS0106	<i>Inquilinus</i>		KT936134	Rhizospheric	N	P	KY884986	<u>Yes</u>
UAPS0142	<i>Inquilinus</i>		KT936135	Rhizospheric	P	P	KT932126 <sup>D</sup>	<u>Yes</u>
UAPS0122	<i>Methylobacterium</i>		KT936114	Endophytic	P	P	NA	<u>Yes</u>
UAPS0123	<i>Methylobacterium</i>		KT936111	Rhizospheric	S	P	KY884988	<u>Yes</u>

UAPS0160	<i>Rhizobium</i>		KT936127	Rhizospheric	P	P	NA	<u>No</u>
UAPS0110	<i>Sphingomonas</i>		KT936140	Endophytic	N	P	NA	<u>No</u>
UAPS0115	<i>Subaequorebacter/</i> <i>Geminicoccus</i>		KT936141	Endophytic	N	P	KT932127 <sup>D</sup>	<u>Yes</u>
UAPS0114	<i>Massilia</i>	Betaproteobacteria	KT936109	Epiphytic	P	P	KT932123 <sup>D</sup>	<u>No</u>
UAPS0174	<i>Massilia</i>		KT936144	Epiphytic	P	P	NA	<u>No</u>
UAPS0175	<i>Massilia</i>		KT936145	Epiphytic	S	P	KT932128 <sup>D</sup>	<u>No</u>
UAPS0177	<i>Massilia</i>		KT936110	Epiphytic	N	P	KT932124 <sup>D</sup>	<u>Yes</u>
UAPS0117	<i>Acinetobacter</i>	Gammaproteobacteria	KT936080	Epiphytic	S	P	KT932117	<u>Yes</u>
UAPS0118	<i>Acinetobacter</i>		KT936081	Epiphytic	P	S	NA	<u>No</u>
UAPS0127	<i>Acinetobacter</i>		KT936082	Epiphytic	ND	N	NA	<u>No</u>
UAPS0145	<i>Acinetobacter</i>		KT936083	Epiphytic	P	N	NA	<u>No</u>
UAPS0149	<i>Acinetobacter</i>		KT936084	Epiphytic	P	N	NA	<u>No</u>
UAPS0156	<i>Acinetobacter</i>		KT936085	Epiphytic	P	N	NA	<u>No</u>
UAPS0158	<i>Acinetobacter</i>		KT936086	Rhizospheric	P	N	NA	<u>No</u>
UAPS0163	<i>Acinetobacter</i>		KT936087	Epiphytic	P	N	NA	<u>Yes</u>



UAPS0165	<i>Acinetobacter</i>	KT936088	Epiphytic	ND	N	NA	<u>No</u>
UPAS0168	<i>Acinetobacter</i>	KT936089	Epiphytic	P	S	NA	<u>No</u>
UAPS0169	<i>Acinetobacter</i>	KT936090	Epiphytic	S	S	KT932118 <sup>D</sup>	<u>No</u>
UAPS0172	<i>Acinetobacter</i>	KT936091	Epiphytic	P	S	NA	<u>No</u>
UAPS0179	<i>Acinetobacter</i>	KY400648	Rhizospheric	ND	<u>S</u>	KT932120	<u>Yes</u>
UAPS0180	<i>Acinetobacter</i>	KY400649	Endophytic	ND	P	KT932121	<u>Yes</u>
UAPS0181	<i>Acinetobacter</i>	KY400650	Epiphytic	ND	P	NA	<u>No</u>
UAPS0182	<i>Acinetobacter</i>	KY400651	Endophytic	ND	P	NA	<u>Yes</u>
UAPS0183	<i>Acinetobacter</i>	KY400652	Endophytic	ND	P	NA	<u>No</u>
UAPS0184	<i>Acinetobacter</i>	KY400653	Rhizospheric	ND	P	NA	<u>No</u>
UAPS0155	<i>Pseudomonas</i>	KT936126	Epiphytic	P	P	NA	<u>Yes</u>

N, negative hybridization; P, positive hybridization; S, slight hybridization; ND, not determined; NA, not amplified with primers *mxaf916* and *mxar1360*  
D, XoxF sequences long enough to cover Asp301.

**Table 3. Methylo trophic growth with Ca<sup>2+</sup> or Ce<sup>3+</sup> as cofactor for methanol dehydrogenase.**

Time	Genus	Strain	Growth with	
			Ca <sup>2+</sup>	Ce <sup>3+</sup>
	<i>Sphingomonas</i>	UAPS0110	0.7883	0.7637
72 h	<i>Methylobacterium</i>	UAPS0123	1.0710*	0.7660
	<i>Rhizobium</i>	UAPS0160	0.8717	0.9367
96 h	<i>Methylobacterium</i>	UAPS0122	0.4123	0.3007
	<i>Arthrobacter</i>	UAPS0102	0.8563	1.3483*
	<i>Arthrobacter</i>	UAPS0105	0.7910	1.1037
	<i>Subaequorebacter/</i>			
	<i>Geminicoccus</i>	UAPS0115	0.2057	0.7513*
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS0117	1.0703*	0.7873
	<i>Microvirga</i>	UAPS0120	0.9390*	0.4777
	<i>Microvirga</i>	UAPS0121	0.9967*	0.7640
120 h	<i>Pedobacter</i>	UAPS0126	0.9957*	0.7133
	<i>Microvirga</i>	UAPS0137	1.1033	0.8533
	<i>Inquilius</i>	UAPS0142	0.6683	0.9637
	<i>Pseudomonas</i>	UAPS0155	0.6140	0.6230
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS0163	1.2073	1.2163
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS0169	0.9680	1.4060*
	<i>Massilia</i>	UAPS0177	0.6817	1.0697*
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS0180	1.3707	1.1673
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS0182	0.9920	1.0623
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS0183	0.8610	1.1247
144 h	<i>Microvirga</i>	UAPS0136	0.6087	0.2263
	<i>Acinetobacter</i>	UAPS0179	0.3757	0.8020

Data correspond to absorbance at 600 nm, media of three replicates. The cells were incubated under shaking at 30°C. The registers correspond to their time of maximum growth in the presence of Ce<sup>3+</sup>. Growths of each strain in the presence of Ca<sup>2+</sup>/Ce<sup>3+</sup> were com-

pared and the significance of the difference between two values was assessed by unpaired t-test,  $p > 0.05$ . Values marked with an asterisk are significantly higher than their counterparts.

For Peer Review

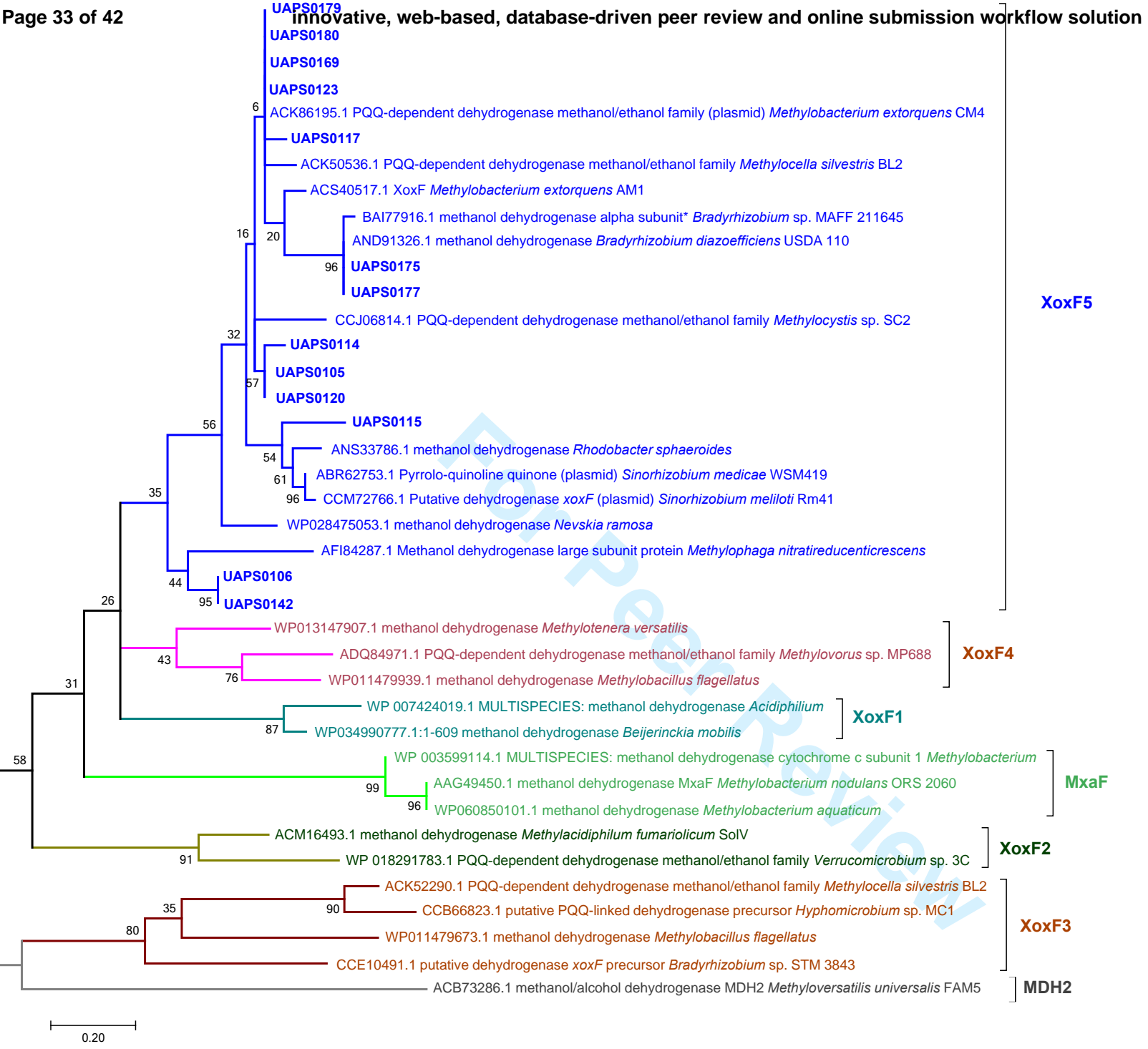
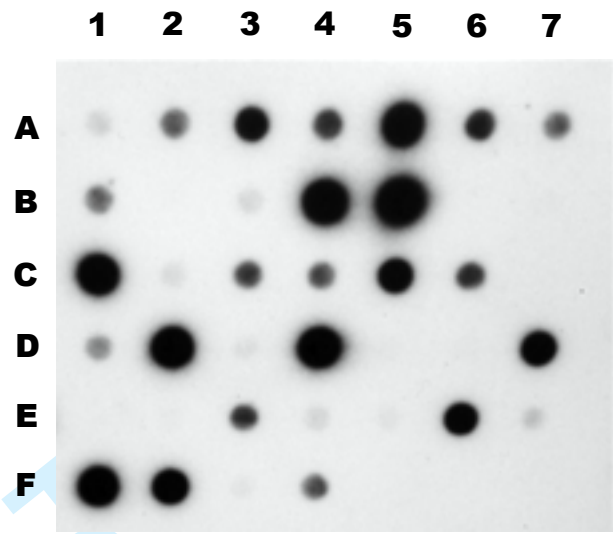


Fig. 1

XoxF2 <i>M. fumarolicum</i>	DTGKARWAYQMTPWDSWDYDGVNEMILPDLT-VKGKKT PCLVHFDRNGFGYVLD RRTGQLIEA
UAPS0105	--GMAKWVYQMTPHDEWDYDGVNEMILADQD-IGGQRRQVLVHFDRNGFGYTLDRINGELLVA
UAPS0114	DTGMAQWVYHMTPHDEWDYDGVNEMILADQD-IGGQRRQVLVHFDRNGFGYTLDRITGELLVA
UAPS0115	DTGMAQWVYHMTPHDEWDYDGVNEMILADQD-IGGQRRQVLVHFDRNGFGYTLDRITGELLVA
UAPS0142	-TGMAKWVYQMTPHDEWDYDGVNEMILVDKP-FDGKDRKLLVHFDRNGFGYTLDRITGELLVA
UAPS0169	-TGMAKWVYQMTPHDEWDYDGINEMILTDQK-IDGKDRPLLTHFDRNGFGYTLDRATGELLVA
UAPS0175	-----WVYQMTPHDEWDYDGVNEMILSDQS-INGQARKLLTHFDRNGLGYTLDRATGELLVA
UAPS0177	----AKWVYQMTPHDEWDYDGVNEMILSDQS-INGQARKLLTHFDRNGLGYTLDRATGELLVA
MxaF <i>M. extorquens</i>	DTGEAKFGYQKTPHDEWDYAGVNVMLSEQKDKDGKARKLLTHPDRNGIVYTLDRITD GALVSA

Fig. 2



**Fig. 3**

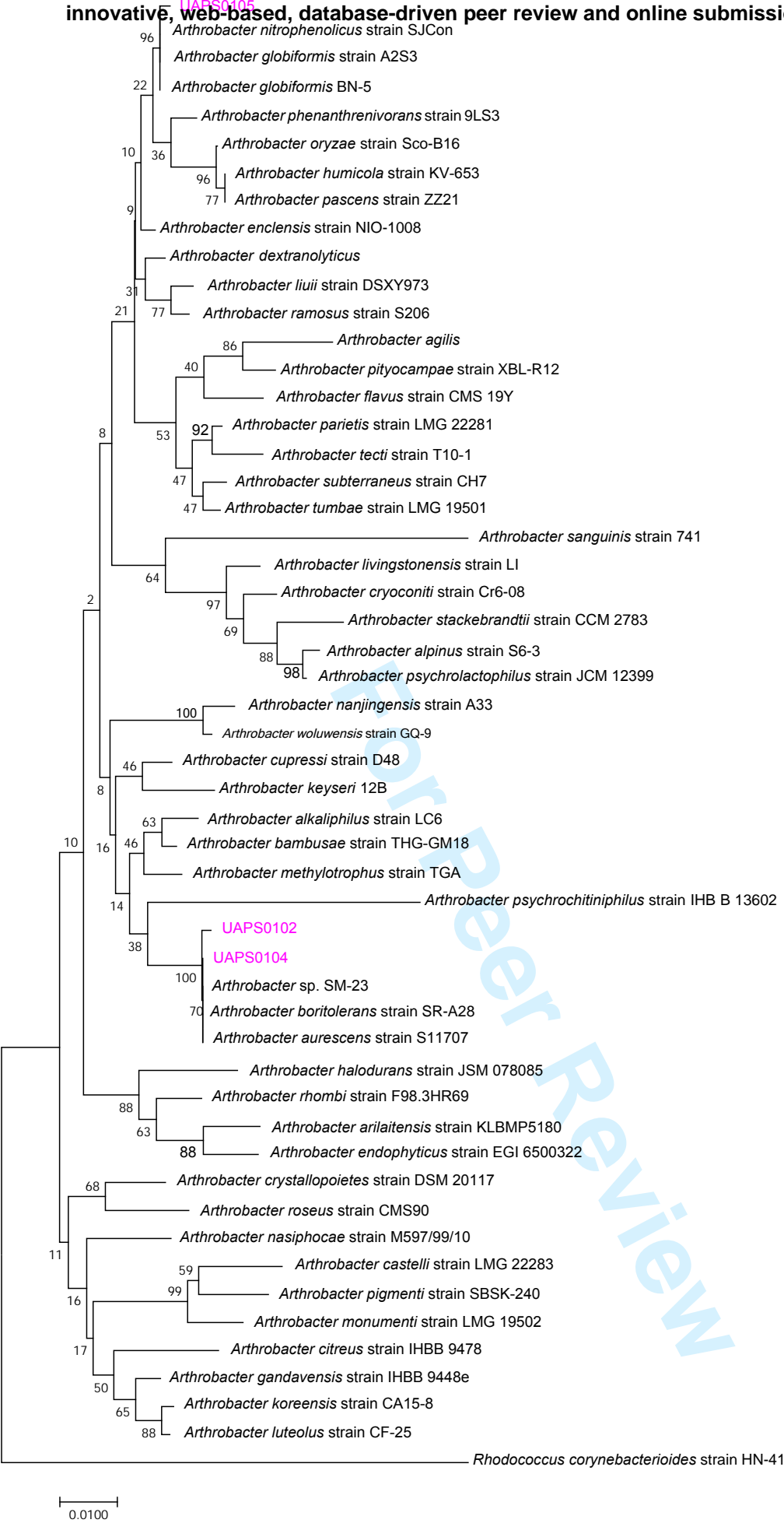


Fig. S1 % G+C content of the DNA of the strains in the class Actinobacteria

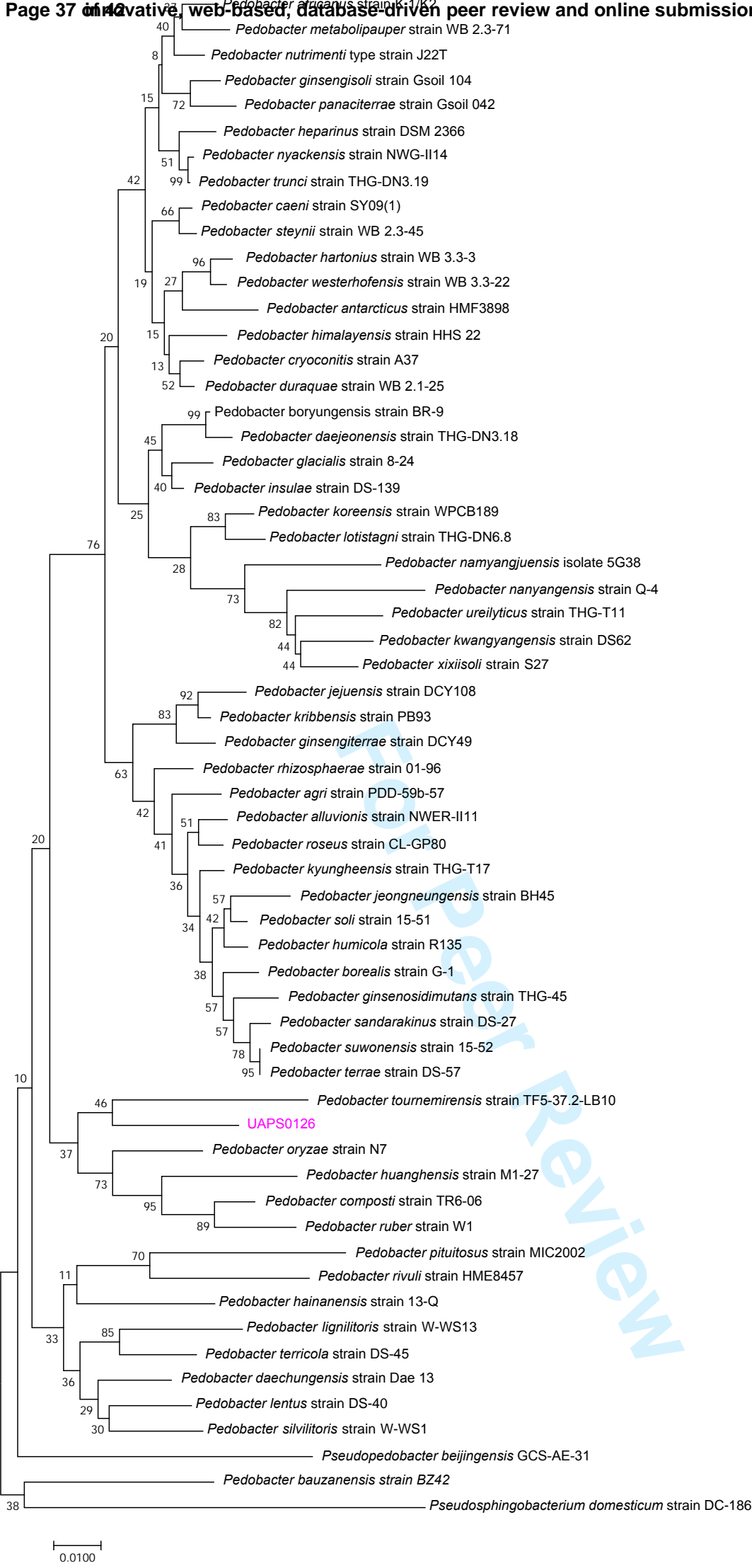


Fig. S1. 16S taxonomical identity of the Class *Sphingobacteriia* isolate



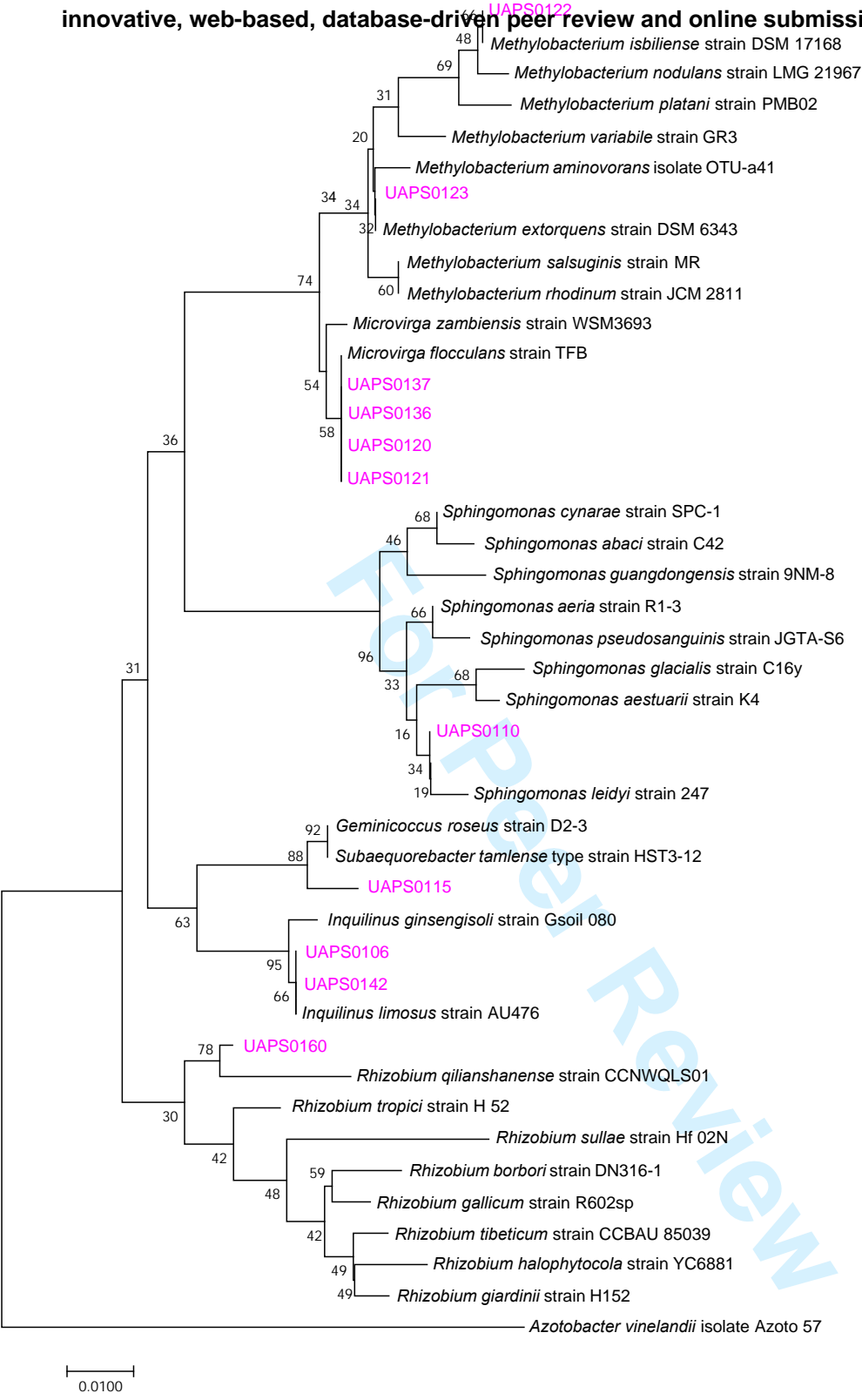


Fig. S1. 16S taxonomical identity of Class *Alphaproteobacteria* isolates

UAPS0114

UAPS0177

48  
100  
*Massilia alkalitolerans* strain 263ZG10  
*Massilia yuzhufengensis* strain Y1243-1

43  
*Massilia yuzhufengensis* strain Y1243-1

UAPS0174

91  
100  
UAPS0175

29  
*Massilia plicata* strain 76

*Telluria chitinolytica* strain 20M

44  
*Herbaspirillum aquaticum* strain IEH 4430

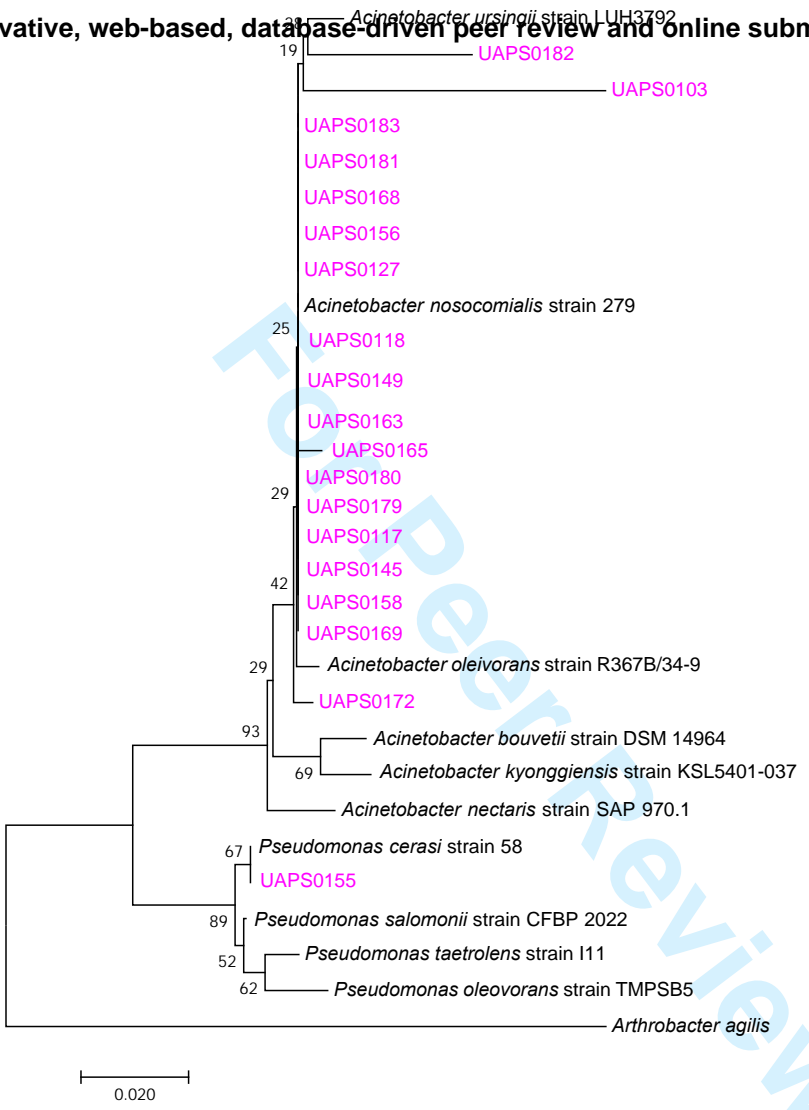
*Azohydromonas lata*

*Azotobacter vinelandii* isolate Azoto 57

0.020

**Fig. S1. % G+C of the 16S rDNA of *Massilia* strains. The tree shows the phylogenetic relationships among the strains. The scale bar represents 0.020 substitutions per site.**

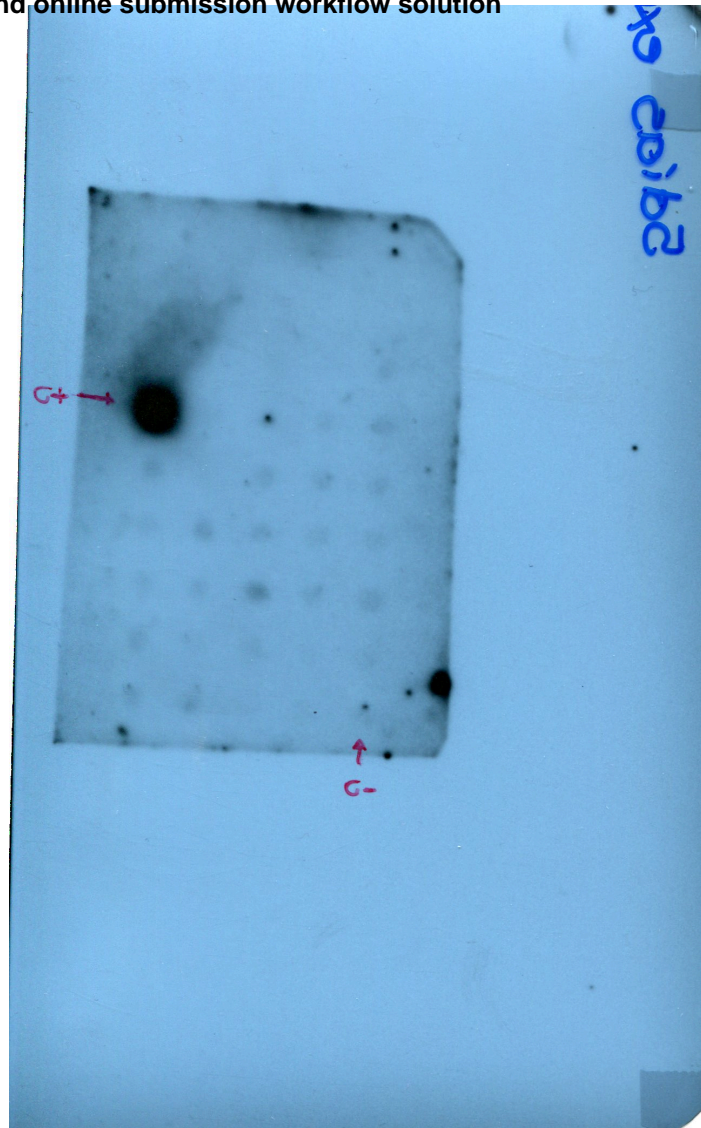
Kyorinsha, 3-46-10, Nishigahara, Kita-ku, Tokyo 114-0024, Japan



**Fig. S1. 16S taxonomical identity of Class *Gammaproteobacteria* isolates**

***mxoF* DOT BLOT ARRANGMENT**

C+	blank	77	75	74
72	Ni	69	68	Ni
63	60	58	56	55
49	45	42	Ni	23
22	21	18	17	15
14	Ni	10	06	C-



Positive control **C+** *Methylobacterium extorquens* JCM2802.

Negative control **C-** *U. maydis* 207.

Numbers indicate the reduced name of the isolates. For example, 77 means UAPS07077.

**Ni**, strain not included in this work.

**Fig. S2. *mxoF* dot blot hybridization**

**Table S1. Methanol:NDMA (N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase primers.**

Primer	Sequence (5'-3')
NDMAY270F	YCC CAA GGA CTA CAA CGT CAT
NDMAGA270F	CCA AGG ACT ACA ACG TCA TGG A
NDMA270F	CCC AAG GAC TAC AAC GTC AT
NDMA850R	CCS AGN CCR CCS GAG TTG AA