

# Aislamiento y caracterización de bacterias rojas no sulfurosas provenientes del humedal de la Mixtequilla, Veracruz (México)

María Teresa Núñez Cardona<sup>1</sup>, Magdalena Chávez Hernández<sup>1,2</sup> y Martha Signoret Poillon<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup> Departamento el Hombre y su ambiente, Laboratorio de Ecología Microbiana, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, 04960.

<sup>2</sup> Maestría en Ciencias Agropecuarias UAM-X.

## RESUMEN

Las bacterias fotosintéticas están ampliamente distribuidas en los ecosistemas acuáticos y terrestres. De manera general, se les ha dividido en bacterias rojas y verdes (sulfurosas y no sulfurosas), las bacterias rojas no sulfurosas (BRNS) son las más versátiles en cuanto a su metabolismo se refiere ya que son capaces de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y/o energía. En los últimos años se les ha utilizado para la biorremediación de agua y suelos contaminados, así como para la producción de biofertilizantes y herbicidas; son de gran utilidad en la biotecnología y en la medicina. Pese a su gran utilidad, en México se ha estudiado poco a este grupo de microorganismos. Con el fin de contribuir al conocimiento de las bacterias fotótrofas, se aislaron y caracterizaron 10 cultivos de BRNS provenientes de muestras de agua colectadas en el humedal de la Mixtequilla, Veracruz. Para la caracterización de los cultivos bacterianos se consideró su morfología celular sus propiedades pigmentarias y su capacidad para utilizar diferentes compuestos orgánicos como únicas fuentes de carbono y/o energía. De acuerdo con los resultados obtenidos, los cultivos líquidos presentaron color marrón, café, rosa y rojo (característicos de las bacterias rojas fotótrofas), en todos se observó la presencia de células con formas de bacilos y su respuesta a la tinción de Gram fue negativa, todas produjeron bacterioclorofila *a* y en algunos cultivos se detectó espiriloxantina y licopeno. Diez cultivos fueron capaces de utilizar al piruvato, succinato, propionato, glicerol, acetato, etanol y extracto de la levadura; ocho utilizaron maltosa, manosa y sacarosa. Los sustratos menos utilizados fueron lactosa, benzoato, sacarosa, metanol y cisteína. Con base en lo expuesto por algunos autores y las características registradas en los cultivos de BRNS aisladas, se presume en éstos la presencia de miembros de los géneros *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodovulum* y *Rhodobium*.

**Descriptor:** *Bacterioclorofila a*, *Bacterias rojas no sulfurosas*, *Rhodopseudomonas*, *Mixtequilla*

## ABSTRACT

Phototrophic bacteria are widely distributed in aquatic and terrestrial ecosystems. These microorganisms are divided in purple and green bacteria (sulfur and nonsulfur), All of them are anaerobic and anoxygenic. Purple non sulfur bacteria (PNSB) are metabolically the most versatile, they are able to use a broad range of organic compounds as carbon and energy sources; by the other hand, they are chemoheterotrophic in the dark with minimal oxygen quantities. In the last years PNSB has been used in biorremediation, agriculture, biotechnology and medicine. The aim of this study was to isolate and to characterize purple non sulfur bacteria from la Mixtequilla wetland. It was obtained ten pure cultures of PNSB isolated from water samples collected at the Mixtequilla. Properties such as morphology, pigment and the use of different energy donors and carbon sources were used for characterizing PNSB. Results showed that liquid cultures were red and brown in color; Gram negative rods, and all produce bacteriochlorophyll *a*. The cultures mainly use as carbon and energy sources to pyruvate, succinate, propionate, glycerol, acetate, ethanol and yeast extract; eight cultures use maltose, manose and sucrose; few cultures use lactose, benzoate, methanol and cysteine. According with these properties in the cultures there are members of the *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodovulum* and *Rhodobium* genera.

**Key words:** *bacteriochlorophyll a*, *purple non sulfur bacteria*, *Rhodopseudomonas*, *Mixtequilla*.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias fotótrofas están ampliamente distribuidas en los sistemas acuáticos aunque también han sido detectadas en ambientes extremos

que incluyen a los hipersalinos, ácidos, alcalinos y ventilas hidrotermales, entre otros [1]. Se les ha encontrado en zonas anegadas como cultivos de arroz, suelos lechosos, riveras incluso en aguas de alcantarilla [2].

Las bacterias fotosintéticas son de gran importancia para la ecología microbiana, debido al papel esencial que cumplen dentro de los ciclos biogeoquímicos, especialmente en los del azufre y el carbono, al aprovechar las distintas formas en que se encuentran estos elementos en la naturaleza [3].

Las bacterias fotosintéticas realizan la fotosíntesis en condiciones anaerobias para ello cuentan con bacterioclorofila *a* (la mayoría) o *b*, además de carotenos. Estos pigmentos están alojados en sus membranas internas las cuales pueden tener formas vesiculares, de lamelas, formar estructuras tubulares o bien paquetes. El color de sus cultivos líquidos pueden ser de rosa, rojo o marrón-café y algunas veces verde [4].

Las BRNS prefieren ambientes acuáticos ricos en materia orgánica soluble, con bajas concentraciones de oxígeno y bien iluminados. Este grupo es fisiológicamente diverso y versátil, realizan la fotosíntesis en condiciones anaerobias y pueden crecer quimioheterotróficamente, en la obscuridad [4, 5].

El estudio de las bacterias fotosintéticas en condiciones de laboratorio se inició desde el siglo XIX pero no fue sino en las últimas décadas del siglo XX cuando se puso de manifiesto la importancia del estudio de estos microorganismos. Uno de los inconvenientes para estudiarlas, es la dificultad para la obtención y conservación de cultivos puros [6, 3], para lo cual existe un número limitado de técnicas descritas.

De manera general, el grupo de las bacterias rojas fotosintéticas se divide en sulfurosas (BRS) y no sulfurosas (BRNS), en especial, estas últimas, han sido utilizadas para la protección del medio ambiente como en el tratamiento de aguas y suelos contaminados, como aditivos para alimentos y se ha observado que producen sustancias activas como la vitamina B<sub>12</sub>, ubiquinona y ácido-5 aminolevulínico [7], este último de gran utilidad para la agricultura, debido a su influencia en el desarrollo vegetal y el control de plagas por ser herbicida.

Dado a la gran importancia en la ecología y biotecnología de estos microorganismos, en el presente estudio se aislaron y caracterizaron bacterias rojas no sulfurosas que habitan en un humedal de la Mixtequilla, (Veracruz), con el fin de contribuir al conocimiento de este grupo de bacterias escasamente estudiado en México.

## EXPERIMENTAL

### a) Área de estudio

El humedal de la Mixtequilla se localiza en el Municipio Ignacio de la Llave, Veracruz (Fig. 1). Es un humedal constituido por potreros ribereños que se inundan durante la época de lluvias y pierden el agua superficial en la época de secas [8]; estos son anegados por el río Blanco (Camarón) y pequeños arroyos. El humedal colinda al Norte con los Municipios de Alvarado, al Sur con Tierra blanca e Ixmattlahuacan, al Este con Alvarado y Acula, al este y al Oeste con Tierra blanca y Tlalixcoyan [9].



Fig. 1. Área de estudio y puntos de muestreo [8].

### b) Colecta y procesamiento de las muestras

Se colectaron muestras de agua durante la época de lluvias, en tres puntos: el río Camarón y los potreros Don Rufino y el Llanete. *In situ* se hicieron registros de variables ambientales como: profundidad, temperatura, salinidad y pH del agua; finalmente, con un geoposicionador fueron ubicados geográficamente los puntos de muestreo.

Se colectaron muestras de agua con botellas estériles y 50 ml de estas fueron utilizadas para enriquecer, botellas de 250 ml de capacidad conteniendo 200 ml de medio líquido específico para el cultivo de bacterias rojas no sulfurosas. Su composición es la siguiente: 0.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.4 g NH<sub>4</sub>Cl; 0.4 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.05 g CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 1.0 ml solución de elementos traza SL6; 1.0 ml vitamina B<sub>12</sub>; 1.0 ml de cloruro férrico (1.2 g/1000 ml); 1.0 g succinato (adicionado por filtración); todo esto en 1000 ml de agua destilada [6]. Los cultivos fueron incubados durante 30 días a temperatura ambiente, con un ciclo de 16 horas de iluminación (2,200 lux) y 8 horas de oscuridad [10].

### c) Aislamiento de las BRNS

Una vez observada la coloración característica de las BRNS en los cultivos líquidos, es decir, marrón, rosa o rojo, se procedió al aislamiento y purificación de los cultivos mediante la técnica *Pour plate* [11], para ello se hicieron diluciones seriadas en tubos de ensaye conteniendo solución salina (0.7 % de NaCl); 0.1 ml de estas sirvieron para enriquecer tubos de ensaye conteniendo 20 ml de agar semisólido y el medio base antes descrito. Después de agitar con un vortex, el contenido se vació en cajas Petri y ya sólido el

agar, se aplicó una capa de parafina con aceite de parafina (1:1) estéril. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente con un ciclo de luz/obscuridad (16/8 horas) durante 30 días utilizando lámparas de luz incandescente (2,200 lux).

#### d) Morfología

Para conocer las formas celulares bacterianas presentes en los cultivos, se hicieron observaciones *in vivo*, al microscopio óptico (Olympus BX41), para ello se utilizaron portaobjetos cubiertos con una película de agar noble al 3% en los que se colocaron las células, se cubrieron con un cubreobjetos. Por otro lado, en portaobjetos limpios se hicieron preparaciones (frotis) para aplicar la tinción de Gram y con ello, conocer su respuesta a esta.

#### e) Utilización de compuestos orgánicos y donadores de electrones

Para conocer la capacidad de las BRNS para utilizar diferentes compuesto orgánicos como única fuente de energía y/o carbono se ensayaron 20 substratos que se adicionaron separadamente en medio base, antes descrito. Los compuestos orgánicos ensayados fueron: sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa, manosa, maltosa, succinato, extracto de levadura, acetato, tiosulfato de sodio, metanol, etanol, glicerol, piruvato, cisteína, glicina, manitol, metionina, propionato y benzoato; para ello se colocó 1.0 ml de cultivo masivo de BRNS en tubos de ensaye conteniendo 9.0 ml de medio base, además se inoculó uno sin alguna fuente de carbono, el cual sirvió como blanco [13].

Después de 30 días de incubación, en la condiciones antes mencionadas, se realizaron las lecturas, para ello, las muestras fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y a las células concentradas se les adicionó una mezcla de acetona:metanol (7:2), se homogeneizaron con un agitador tipo vortex, se mantuvieron en obscuridad durante 18 horas a 4° C; pasado este tiempo, nuevamente se centrifugaron a 5,000 rpm durante 20 minutos; las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV160 [14, 6]. Se consideró como respuesta positiva cuando la producción de bacterioclorofila fue mayor que en el blanco. Para cuantificar la Bchl a, se utilizó la fórmula:  $Bchl\ a\ g\ l^{-1} = ((A/CE)(VS/VCC) * 1000$  [14], donde: A=absorbancia registrada a 770 nm, CE=coeficiente de extinción de la bacterioclorofila a en acetona:metanol a 770 nm=84.1, VS=volumen del solvente, VCC=volumen de cultivo centrifugado.

#### f) Análisis de pigmentos *in vivo*

Para el análisis de los pigmentos en células intactas (*in vivo*), se centrifugaron 10 ml de medio de cultivo masivo a 5 000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron las células adicionando 3.0 ml de glicerol, se homogeneizaron con un agitador tipo vortex y se hicieron las lecturas en un espectrofotómetro Shimadzu UV160 considerando un rango de 300-1100 nm [14, 6].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar el presente estudio se colectaron muestras de agua, provenientes de los potreros Don Rufino y el Llanete (agua y fondo) y del río camarón (superficie). En la Tabla 1 se muestran las variables ambientales registradas en los puntos de muestreo.

Tabla 1. Características físico-químicas de los puntos de muestreo

Estación	Latitud	Altitud	Z (cm)	T °C Agua	S( ‰)	pH
Potrero Don Rufino	18°32'507"	95°57'200"	12	24	0.7	7
Potrero Llanete	18°32'507"	95°57'200"	40	21	0.2	7

Z=profundidad, S=salinidad y T° C: temperatura del agua.

Después de 30 días de incubación se observó en los cultivos la coloración característica de las bacterias rojas no sulfurosas (BRNS), es decir, marrón, café, rosa y rojo. Con las técnicas aplicadas para el aislamiento se obtuvieron 10 cultivos.

Las características de las células *in vivo* y la tinción de Gram revelaron la presencia de bacilos Gram negativos y siete de ellos presentaron movilidad. La morfología y la respuesta negativa a la tinción de Gram ratificó la presencia de miembros de las  $\alpha$ -Proteobacteria, a las que pertenecen las BRNS; las características morfológicas registradas en los cultivos se detallan en la Tabla 2 [5,16].

Tabla 2. Características morfológicas de los cultivos de BRNS aislados de muestras de agua del humedal de la Mixtequilla

Características morfológicas	LLS-4433	PS-33	LLS-5242	LLF-4143	RC-5532	PS-43	PF-4242	LLF-4142	Pf-4241	RC-5243
Color cultivo del	Ra	C	C	M	Ra	R	R	R	R	R
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Flagelo	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+

Ra: rosa; C: café; M: marrón; R: rojo, -: negativo y +: positivo

La capacidad de los cultivos de BRNS para utilizar los diferentes fuentes de carbono y energía se presentan en la Tabla 3

Tabla 3. Compuestos orgánicos utilizados como única fuente de carbono y energía por los cultivos de BRNS aisladas del humedal de la Mixtequilla

Sustrato	LLS-4433	PS-33	LLS-5242	LLF-4143	RC-5532	PS-43	PF-4242	LLF-4142	PF-4241	RC-5243
Piruvato <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionato <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetato de sodio <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Cisteína <sup>a</sup>	+	(+)	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Etanol <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Extracto de levadura <sup>a</sup>	+	(+)	+	+	(+)	+	+	+	+	+
Fructosa <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+
Glicerol <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicina <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Glucosa <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	(+)
Lactosa <sup>b</sup>	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	+	-	-
Maltosa <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	(+)
Manitol <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	(+)	-	-	(+)	-
Manosa <sup>b</sup>	(+)	+	+	+	(+)	+	(+)	(+)	-	(+)
Metanol <sup>a</sup>	+	(+)	+	+	+	+	-	-	-	-
Metionina <sup>a</sup>	+	+	+	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)
Sacarosa <sup>b</sup>	(+)	(+)	(+)	+	(+)	+	-	+	(+)	-
Succinato <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tiosulfato de sodio <sup>a</sup>	+	+	-	(+)	+	+	-	-	+	+
Benzoato <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	+	-	(+)	-

Nota.: LLS: Llanete superficie, PS: Potrero Don Rufino superficie, LLF: Llanete fondo, PF: Potrero don Rufino fondo y RC: río camarón.

(-)=producción de bacterioclorofila (Bchl) igual o menor que el control, (+)= Bchl 1-2 veces mayor que el blanco, + Bchl tres veces mayor que el control [18].

<sup>a</sup> Concentración sustrato 1.0 g/; <sup>b</sup> Concentración sustrato 2.0 g/L.

En la figura 2 se presenta la producción de bacterioclorofila a promedio de los 10 cultivos de BRNS. En propionato, succinato, piruvato, etanol, acetato y glicerol fueron los sustratos en donde se produjo más bacterioclorofila a y todos los cultivos los utilizaron como fuentes de carbono y donadores de electrones. Nueve cultivos asimilaban acetato de sodio y extracto de levadura; mientras que entre los menos utilizados están: la lactosa, sacarosa, metanol, manitol y cisteína. El benzoato fue asimilado solo por dos cultivos y menor producción de bacterioclorofila.

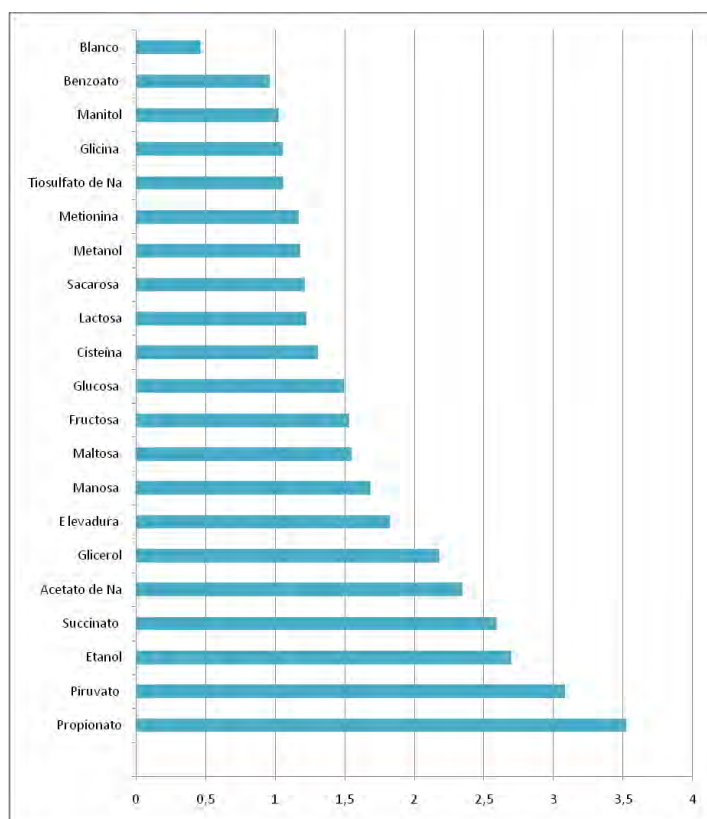


Figura 2. Concentración de bacterioclorofila a ( $\text{mg L}^{-1}$ ) por los cultivos de BRNS, en los 20 compuestos orgánicos ensayados como única fuente de carbono y donadores de electrones.

La principal fuente de carbono para la mayoría de las bacterias fotosintéticas es el  $\text{CO}_2$ , pero utilizan diferencialmente al propionato, piruvato, etanol, succinato, glicerol y acetato [5, 20]. Estos compuestos son utilizados de forma universal por las bacterias rojas no sulfurosas, los cuales están disponibles en la naturaleza por ser el resultado, en gran parte, de la degradación de la materia orgánica en donde las bacterias quimioorganoheterótrofas cumplen un papel determinante.

Las BRNS participan en el ciclo del carbono a través de la fijación del  $\text{CO}_2$  lo cual se lleva a cabo en el Ciclo de Calvin, para ello requiere  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ , ATP y dos enzimas clave, es decir la ribulosa bifosfato carboxilasa y fosforribulocinasa. En el ciclo de Calvin, virtualmente se cataliza toda la productividad primaria en la Tierra a partir de  $\text{CO}_2$  [21]. Otros compuestos como el extracto de levadura aportan nitrógeno, además minerales y vitaminas, principalmente al grupo de las 2- $\alpha$ -Proteobacteria (Rhizobiales) y las 3- $\alpha$ -Proteobacteria (Rhodobacterales); por ello ha sido utilizado para el crecimiento de las BRNS, sin embargo, se corre el riesgo de la proliferación de bacterias quimioorganoheterótrofas.

Se conocen algunas asociaciones de bacterias rojas no sulfurosas que intervienen en la fijación del nitrógeno ( $\text{N}_2 + 8\text{H} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2$ ), especies como

*Rhodobacter capsulatus* y *Rhodobacter sphaeroides*, crecen rápidamente en presencia de este elemento el cual utilizan como donador de electrones; se ha observado que la actividad de sus nitrogenasas *in vivo* es alta. En general a las BRNS se les ha considerado como excelentes fijadoras de nitrógeno, probablemente esto les dá la capacidad diazótropa, que les confiere ventajas significativas en los ambientes anóxicos donde la fijación del nitrógeno es limitada [5].

Por otro lado, el tiosulfato, la cisteína y la metionina, por su contenido de azufre son excelentes donadores de electrones para las 3- $\alpha$ -Proteobacteria (Rhodobacterales), las cuales también son capaces de asimilar al sulfato, en pequeñas cantidades a través de la vía 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato [16]. Tanto el sulfuro y el tiosulfato son utilizados como donadores de electrones para el crecimiento fototrófico y son el resultado de la oxidación del azufre [17], lo cual es realizado especialmente por las bacterias rojas y verdes fotosintéticas del azufre.

El azufre es considerado el cuarto nutriente más importante después del nitrógeno, fósforo y potasio los cuales son indispensables para el crecimiento y desarrollo de cualquier forma de vida [22].

Los máximos de absorción de los pigmentos fotosintéticos analizados *in vivo*, en los 10 cultivos fueron de 364-379, 585-591, 803-809 y 869-878 nm, todos ellos característicos de bacterioclorofila *a* (Bchl *a*). Estos son similares a los registrados por Schmidt [14] y a los registrados para cultivos de BRNS provenientes del Golfo de México y en donde concluyeron que todos estos máximos corresponden a la Bchl *a* [13].

Con base en la caracterización morfológica celular, la coloración de los cultivos, la utilización de sustratos como única fuente de carbono, de energía y donadores de electrones, así como el análisis de pigmentos fotosintéticos en los 10 cultivos provenientes de la Mixtequilla se relacionan con los géneros: *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodovulum* y *Rhodobium* (Tabla 4).

Tabla 4. Las BRNS del humedal de la Mixtequilla y su relación con géneros de BRNS identificados por otros autores.

Cepa	Microorganismo
PS-43; PF-4242; LLF-4142 y PF-4241	<i>Rhodopseudomonas</i> (2 $\alpha$ -Proteobacteria) <sup>[15, 17,18]</sup>
LLS-4433; PS-33; LLF-4143;	<i>Rhodobacter</i> (3 $\alpha$ -Proteobacteria) <sup>[15,17]</sup>
LLS-5242 y RC-5532	<i>Rhodovulum</i> (3 $\alpha$ -Proteobacteria) <sup>[15, 17,19]</sup>
RC-5243	<i>Rhodobium</i> (2 $\alpha$ -Proteobacteria) <sup>[15, 17,19]</sup>

De acuerdo con Imhoff (2006) es común la presencia de microorganismos relacionados con los géneros *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodovulum* y *Rhodobium*, en ambientes acuáticos, como el humedal de la Mixtequilla el cual, gracias a su contenido alto de materia orgánica, baja concentración de oxígeno y temperaturas moderadas, favorecen el crecimiento de estos microorganismos los cuales son muy versátiles en cuanto a su capacidad de asimilar sustratos orgánicos, productos de la degradación de la materia orgánica por bacterias quimiorganoheterótrofas.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que el medio de cultivo utilizado y las técnicas aplicadas para el aislamiento de bacterias rojas no sulfurosas resultaron adecuados para su crecimiento en condiciones de laboratorio.

La respuesta negativa a la tinción de Gram ubica a los aislados bacterianos como miembros de las Proteobacteria.

La producción de bacterioclorofila *a* en los cultivos líquidos revelaron la presencia de bacterias rojas no sulfurosas.

Para el crecimiento de las BRNS en condiciones de laboratorio es posible utilizar al propionato, succinato, piruvato, etanol y acetato ya que en estos hubo más producción de bacterioclorofila *a* fueron utilizados por todos los cultivos.

El benzoato fue el sustrato menos utilizado como donador de electrones y/o fuente de carbono por los cultivos de BRNS aislados de la Mixtequilla.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Biólogos, Laura Liliana López Galindo, Bernardo Martínez y Raúl Francisco Tovilla Ramírez por su contribución técnica en el desarrollo del presente estudio

## REFERENCIAS

- |      |   |      |  |
|------|---|------|--|
| [1]  | I. Yasa, B.H. Cadirci, A. Kocyigit y T. Öztürk, <i>Journal Fisheries &amp; Aquatic Science</i> , 23(2006) 71-73.  |      | 59(2004) 423-425.  |
| [2]  | T. Khanta, Ch. Chaiyasut, D. Kantachote, S. Kukrong & A. Muangprom, <i>African Journal of Microbiology Research</i> . 4 (2010) 1848-1855.   | [12] | R. Carballo Cruz, Caracterización de bacterias heterótrofas en los aportes de la laguna de Términos a la Sonda de Campeche, UNAM, México (1985) 148  |
| [3]  | M.T. Núñez-Cardona, "Las bacterias rojas del azufre en ambientes mexicanos". Serie Académicos CBS. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, (2008) 52-72.   | [13] | V. Pacheco-González, <i>Aislamiento y caracterización de Bacterias Fotótrofas de la Familia Rhodospirillaceae a partir de muestras de agua obtenidas del Golfo de México</i> . Universidad Autónoma Metropolitana (2006) 44. |
| [4]  | J.F. Imhoff, "Systematics of anoxygenic phototrophic bacteria". Springer Verlag, Amsterdam. (2008) 269-287 pp.  | [14] | M.T. Núñez-Cardona, <i>Hidrobiológica</i> 13 (2003): 171-176.  |
| [5]  | M.T. Madigan & D.O. Jung, "An overview of purple bacteria: systematics, physiology and habitats". Springer Science, New York. (2009) 1-15.  | [15] | T.N.R. Srinivas, P. Anil Kumar, Ch. Sasikala, & V. Ramana. <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> 57(2007): 228-232.   |
| [6]  | M.T. Núñez-Cardona, "Crecimiento y aislamiento de bacterias fotótrofas anoxigénicas". Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México. CBS. (2010) 31:20-26.  | [16] | J.F. Imhoff, <i>The phototrophic alpha-Proteobacteria</i> . Springer Verlag, Amsterdam. 5 (2006):41-64   |
| [7]  | K. Sasaki, M. Watanabe, T. Tanaka & T. Tanaka, <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> . 58 (2002): 23-29.  | [17] | S. Mehrabi, U.M. Ekanemesang, F.O. Aikhionbare, K.S. Kimbro, & J. Bender. <i>Biomolecular Engineering</i> 18 (2001):49-56.   |
| [8]  | F. Rivera-Becerril, M. Signoret-Poillon, M. Ayala-Zermeño, P. Castilla-Hernández, J. García-Mena, T. Mier, M.T. Núñez-Cardona, N. Romero-Martínez, N. Sánchez-Santillán, N.C. Torres-Corona, y J.A. Viccon-Pale, <i>Contactos</i> (2008):31-39. | [18] | R. Guyoneaud, R. Matheron, R. Baulaigue, K. Podeur, A. Hirschler & Caumette. <i>Hidrobiología</i> 329(1996):33-43.   |
| [9]  | M. Signoret-Poillon, J.A. Viccon-Pale, N.C. Torres-Corona, & G. Yépez. <i>Primer Congreso Internacional de casos exitosos de Desarrollo Sostenible en el Trópico</i> (2005).  | [19] | A. Hiraishi, & Ueda Y, <i>International Journal of Systematic Bacteriology</i> 45 (1995): 319-326.   |
| [10] | M.T. Núñez-Cardona, "Optimización de técnicas para el análisis de pigmentos y ácidos grasos de bacterias fototróficas del azufre".. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona, España. (1999)173.                                 | [20] | Overmann J. & F. Garcia-Pichel. "The phototrophic way of life". Springer Verlag, Amsterdam. 2 (2006):32-85.  |
| [11] | E. Archana, Ch. Sasikala, ChV. Ramana & K. Arunasi, <i>Journal of Microbiological Methods</i>   | [21] | T.M. Madigan, JM. Martinko & J. Parker. Edit Pearson Prentice Hall. Madrid España. (2004):541  |
|      |   | [22] | R. Vidyalakshmi & R. Srida. <i>Journal of Culture Collections</i> 5(2007):73-77.   |