



## Characterization of native strains of agricultural soils tolerant to imidacloprid

## Caracterización de cepas nativas de suelos agrícolas tolerantes a imidacloprid

Maribel Mireles-Martínez<sup>1\*</sup>, Angélica Villarreal-Mendoza<sup>2</sup>, Jesús M. Villegas-Mendoza<sup>1</sup>, Ana Verónica Martínez-Vázquez<sup>1</sup>, Guadalupe Concepción Rodríguez-Castillejos<sup>3</sup>, Ninfa M. Rosas-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro s/n Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, C.P. 88710, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas-UAMRR. Rodhe Carretera Reynosa-San Fernando, cruce con Canal Rodhe Col. Arcoiris, Reynosa, Tamaulipas, C.P. 88779, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas-UAMRA. Aztlán. Calle Lago de Chapala. Col. Aztlán. Reynosa, Tamaulipas C.P. 88740, México.

\*Corresponding author.

E-mail address: [mmirelesm@hotmail.com](mailto:mmirelesm@hotmail.com) (M. Mireles-Martínez).

Article history:

Received: 9 January 2018 / Received in revised form: 21 March 2018 / Accepted: 22 March 2018 / Published online: 1 April 2018.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.2.47>

### ABSTRACT

Imidacloprid is a broad-spectrum insecticide frequently used in agricultural areas for the control of insect pests. The excessive use of this chemical has caused several ecological and health problems to mammals and humans. This insecticide can be degraded by soil microorganisms and transformed into by-products with a lower degree of toxicity. The objective of this study was to isolate bacteria from maize and sorghum soils contaminated with imidacloprid for several years. Bacteria were isolated with minimum salt medium supplemented with 100 mg/L of imidacloprid as the sole carbon source and energy. Isolated bacteria were subjected to *in vitro* growth tolerance tests and later 16S rDNA molecular characterization was conducted in isolates from different levels of tolerance. From both crops, we obtained 26 isolates with different morphological characteristics. The 63% of the isolates exhibited high tolerance to the insecticide, while 37% of the isolates showed medium, scarce or no tolerance. 16S rDNA molecular identification, grouped the isolates in

Firmicutes and Actinomycetes, important phylum that include bacteria that participate in the degradation of imidacloprid in soil.

**Keywords:** imidacloprid, insecticide, bacteria, soil, tolerance, 16SrDNA.

## RESUMEN

El imidacloprid es un insecticida de amplio espectro utilizado frecuentemente en el área agrícola para el control de insectos plagas. El uso excesivo de este químico ha causado diversos problemas ecológicos y de salud a mamíferos y humanos. Este insecticida puede ser degradado por microorganismos de suelo y ser transformado a metabolitos secundarios con menor grado de toxicidad. El objetivo de este estudio fue aislar bacterias de suelo agrícola con contaminación con imidacloprid por algunos años. Las bacterias fueron aisladas en medio mínimo salino suplementado con 100 mg/L de imidacloprid como única fuente de carbono y energía. Las bacterias aisladas fueron sometidas a prueba de tolerancia de crecimiento *in vitro* y posteriormente a los aislados provenientes de diferentes niveles de tolerancia se les realizó la caracterización molecular a través del 16S rDNA. De ambos cultivos, obtuvimos 26 aislamientos con diferentes características morfológicas. El 63% de los aislamientos exhibieron alta tolerancia al insecticida, mientras que el 37% de los aislamientos mostraron media, escasa o nula tolerancia. La identificación molecular mediante el 16S rDNA, agrupo a los aislados en Firmicutes y Actinomycetes, filo importante que incluye a bacterias que participan en la degradación de imidacloprid en suelo.

**Palabras clave:** aislados nativos, suelo agrícola, bacterias, tolerancia a imidacloprid, 16SrDNA.

## 1. INTRODUCCIÓN

El imidacloprid (IMI) es un insecticida de primera generación del grupo de neonicotinoides, comercializado en 1991 por Bayer y registrado en más de 120 países (Elbert *et al.*, 2008; Cycon *et al.*, 2013). Debido a su amplio espectro de acción es usado en la agricultura para el control de plagas por lepidópteros, coleópteros, homópteros, dípteros, que afectan a cultivos pertenecientes a las familias Curcubitaceae, Fabaceae, Lauraceae, Malvaceae y Poaceae, entre otras. Todas estas familias incluyen una gran variedad de cultivos de importancia económica y nutricional. El IMI es un insecticida sistémico que actúa como neurotoxina del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) de los insectos (Cycon *et al.*, 2013), provocando parálisis y eventualmente la muerte (Nauen *et al.*, 2003). La OMS lo clasifica como moderadamente tóxico, lo que ha generado un uso excesivo de este químico, desplazando a los piretroides. Sin embargo, estudios recientes muestran que el IMI puede afectar además a organismos no blancos, tales como los polinizadores (*Apis mellifera*), así como a pájaros y otros animales (Suchail *et al.*, 2000; US EPA, 2008; Cycon *et al.*, 2013). Este insecticida es considerado de persistencia moderada en el ambiente, puede mantenerse hasta por 47 semanas; es altamente soluble en agua, sin embargo se mantiene en el sitio de aplicación. La degradación de este compuesto es causada por la luz solar, pH, humedad y por la acción microbiana, principalmente (Hussain *et al.*, 2016; Adak

& Mukkerjee, 2016). La degradación del IMI ocurre de manera más rápida en suelos alcalinos (Mahapatra *et al.*, 2017); en este tipo de suelo y además con contenido de carbono orgánico, la vida media varía entre 165 y 247 días, por lo que hay riesgo de lixiviación. Actualmente se conocen los efectos adversos de varios insecticidas sobre la salud humana, por ello se buscan métodos para la eliminación del ambiente. Los insecticidas pueden ser eliminados por métodos físicos o químicos; sin embargo no son del todo eficientes ya que solo se remueven parcialmente. Estudios indican que los métodos biológicos pueden tener mayor eficiencia; dentro de estos se ha estudiado el uso de microorganismos, principalmente hongos y bacterias, degradadores de diversos compuestos químicos contaminantes (Parte *et al.*, 2017). Se ha reportado que bacterias de los géneros *Klebsiella sp.* (Phugare *et al.*, 2013), *Stenotrophomonas maltophilia* (Liu *et al.*, 2013), *Bacillus sp* y *Enterobacter sp.* (Sharma *et al.* 2014<sup>a, c</sup>), pueden degradar a IMI y a otros neonicotinoides (Pandey *et al.*, 2009). Por ello el objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar bacterias de suelo agrícola y evaluar la capacidad de tolerar al IMI en estudios *in vitro*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Reactivos y medios de cultivo

El neonicotinoide imidacloprid (SIGMA ALDRICH, 37894) con una pureza de 99.9% fue disuelto en diclorometano (MTEDIA, DS1432-001) grado HLPC a una concentración de 100 mg/L y filtrado a través de una membrana de nylon con tamaño de poro 0.22 µm. El medio mínimo salino (MMS) (g/L: 6g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5g de NaCl, 3 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 g MgSO<sub>4</sub>, 2g NH<sub>4</sub>Cl) fue adicionado con 100 mg/L de imidacloprid como única fuente de carbono (MSMI). Se utilizó Caldo Nutritivo (CN) para la activación de los aislados y Agar Nutritivo (AN) para conservar a los microorganismos, ambos de la casa comercial MCD.

### 2.2 Colecta de suelo agrícola

Se realizó en el campo experimental de PIONEER™ con cultivo de sorgo (25°74'25" N 98°06'85" W) y maíz (25°75'28" N 98°08'79" W) en Río Bravo Tam, en el ciclo primavera-verano 2016, en etapa de corte y F5, respectivamente con antecedente de aplicación de imidacloprid para el control del pulgón amarillo (la aplicación se realizó en el umbral económico de la plaga y una segunda aplicación después de 20 días a una concentración 105 g de ingrediente activo/ha). Las muestras de suelo fueron tomadas de 4 puntos al azar a una profundidad de 10 cm (se consideró una distancia alrededor de 10 m entre puntos) con una espátula de acero inoxidable estéril, para ello primero fue eliminado todo residuo superficial y posteriormente, colocadas en bolsas de polietileno. Las muestras previamente etiquetadas se enviaron al laboratorio, se dejaron secar a temperatura ambiente y se tamizaron con un cartucho de acero inoxidable de 810 µm.

### 2.3 Aislamiento de microorganismos de suelo

Se tomó 1 g de suelo previamente tamizado y se colocó en 100 mL de MSMI en matraces de 250 mL y se dejaron incubar por 24 h a 30 °C a 180 rpm. Enseguida se realizaron diluciones seriadas para obtener las UFC/g. Se picaron las colonias morfológicamente

diferentes y se transfirieron a cajas de Petri con Agar nutritivo (AN) de 18 a 24 h, hasta obtener colonias puras (Bergey's of Manual). Las cuáles se mantuvieron en agar inclinado en refrigeración hasta su uso, un duplicado de cada cepa pura se conservó en glicerol a -70°C.

## **2.4 Prueba de tolerancia**

A cada aislamiento puro se les realizó una prueba de tolerancia de crecimiento, las cuales después de ser activadas en CN por 18h, una alícuota de 100 µl (dilución 10<sup>2</sup>) fueron dispersados hasta absorberse en placas de AN que contenían 100 mg/L de imidacloprid y se incubaron a 30°C por 18h. Enseguida se realizó el conteo de colonias y se consideraron los siguientes parámetros de crecimiento: 0 col (nulo), <10 col (escaso\*), >10 y <100 col (moderado\*\*) y >100 col (abundante\*\*\*).

## **2.5 Caracterización de las cepas seleccionadas**

La identificación y caracterización de las cepas se realizó mediante las características de cultivo y morfología de las colonias. Se llevó a cabo la prueba de Gram y la prueba de Catalasa. Para la identificación molecular se realizó la extracción de DNA genómico con el Kit comercial de Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) con el protocolo de Aislamiento de DNAG de bacterias Gram positivas y Gram negativas. La identificación molecular se realizó por el análisis de la secuencia interna transcrita del gen 16S rRNA utilizando oligonucleótidos universales (fD1 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y rP2 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') diseñados por Weisburg (1991) y sintetizados por Biosynthesis (Lewisville, Tx). La reacción de amplificación se realizó con GoTaq Green Master Mix utilizando 12.5 µl (2X), 1 µl de cada oligonucleótido (5µM), 50 ng de DNA a un volumen final de reacción de 25 µl. La reacción de amplificación se realizó como sigue: 94°C/5 min (1 ciclo); enseguida a 94°C/1.25 min, 58°C/1.30 min, 72°C/1 min (35 ciclos); 72°C/7 min (1 ciclo). Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% en un fotodocumentador Kodak, la electroforesis se realizó con Buffer TBE 0.5X por 100V a 45 min, teñido con Sybr Gold. El producto esperado fue de 1500 pb, el cual se purificó con el kit Exo-Sap IT y la reacción de secuenciación se realizó con el protocolo de ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en el equipo ABI 3130. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas usando el software SeqMan de Lasergene 8 (DNASTAR® Inc., Madison, Wi, USA) enseguida fueron analizadas en la base de datos del NCBI a través de BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias con más del 98% de identidad con la base de datos del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) se consideraron como pertenecientes a la misma especie.

## **2.6 Construcción de árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gen 16SrRNA**

Las secuencias parciales del gen 16SrRNA de los aislados nativos y de 8 secuencias estrechamente relacionadas con las cepas de referencia fueron obtenidas de la base de datos del NCBI y utilizadas para la construcción del árbol filogenético. Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias utilizando ClustalW, la construcción de la filogenia

molecular fue mediante el método de UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) en el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016); posteriormente las agrupaciones filogenéticas respectivas se realizaron de acuerdo al modelo estadístico de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980) mediante una prueba de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985).

### 3. RESULTADOS

Se obtuvo una población microbiana de  $1 \times 10^5$  UFC/g del suelo en cultivo de maíz y  $2 \times 10^5$  UFC/g en el suelo en cultivo de sorgo con capacidad de crecer en presencia de IMI. De las cuales se purificaron 26 colonias, 12 de ellas provenientes del campo de maíz y 14 provenientes del campo de sorgo, en la tabla 1 se describen las características morfológicas de los aislamientos.

**Tabla 1.** Características morfológicas de los aislados nativos.

<i>Características macroscópicas</i>				
<i>Color de la colonia</i>	Beige 65%	Crema 19%	Blanca 8%	Amarilla 8%
<i>Consistencia</i>	Cremosa 77%	Viscosa 15%	Dura 8%	
<i>Luz Transmitida</i>			<i>Reflejada</i>	
	Opaca 92%		Opaca 35%	Transparente 15%
	Traslúcida 8%		Brillosa 50%	
<i>Forma</i>	Circular 52%	Irregular 15%	Puntiforme 15%	Rizoide 8%
<i>Margen</i>	Entero 73%	Disperso 11%	Rizoide 8%	Ondulado 8%
<i>Características microscópicas</i>				
<i>Forma celular</i>	Bacilos 84%	Cocobacilos 16%		
<i>Esporas*</i>	23% (+)	77% (-)		
<i>Prueba de Gram</i>	Positiva 65%	Negativa 35%		
<i>Catalasa</i>	Positiva 40%	Negativa 60%		

\*Identificación de esporas dentro de 18 a 24 h de incubación a 30°C.

En la prueba de tolerancia se observó que 63% de los aislados presentaron un crecimiento abundante, mientras que el 11% fue moderado y escaso.

En la tabla 2, se presenta el análisis del resultado de blast con homología al gen parcial del 16SrRNA, observándose que los aislados nativos pertenecen principalmente a dos grupos taxonómicos, el 72% a Firmicutes, representado por el género *Bacillus* y el 27% a Actinomicetos, representado por dos géneros *Microbacterium sp.* y *Anthrobacter sp.*

**Tabla 2.** Resultado de Blast, secuencia parcial del gen 16SrRNA.

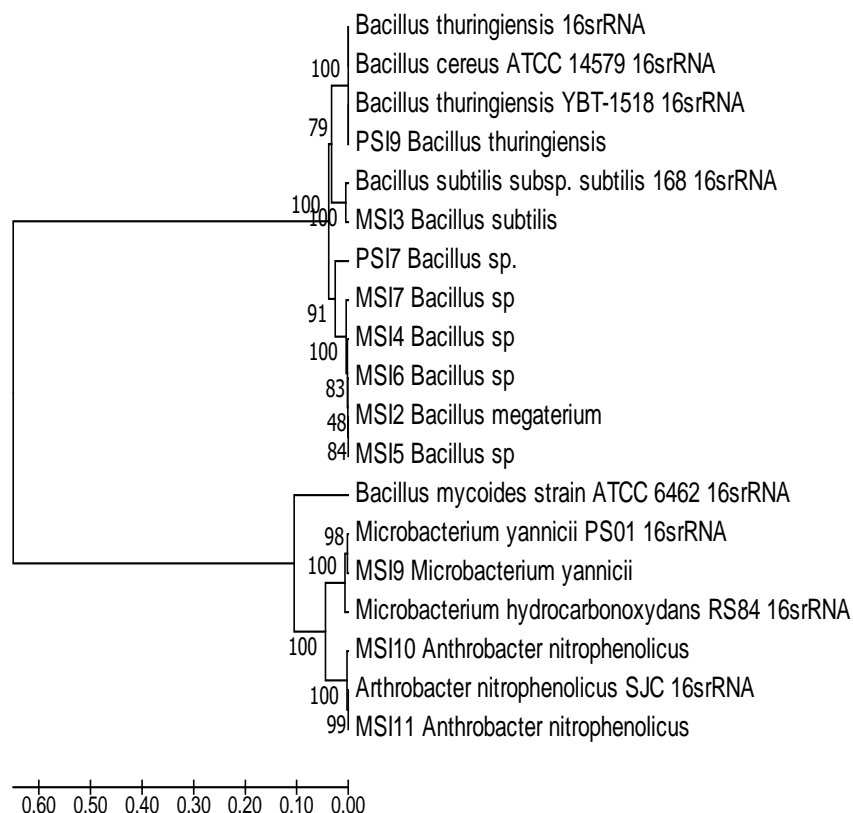
ID	Prueba de tolerancia	Descripción del organismo	Identidad	Numero de Acceso
MSI2	***	<i>Bacillus sp.</i> NCCP-535	99%	<a href="#">AB740360.1</a>
MSI3	***	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> str. 168	99%	<a href="#">NC_000964.3</a>
MSI4	***	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain B8W22	99%	<a href="#">NR_115953.1</a>
MSI5	***	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 1530=ATCC	98%	<a href="#">NZ_CP009920.1</a>
MSI6	***	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 1530=ATCC	99%	<a href="#">NZ_CP009920.1</a>
MSI7	***	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 1530=ATCC	99%	<a href="#">NZ_CP009920.1</a>
MSI9	***	<i>Microbacterium yannicii</i> PS01	99%	<a href="#">NZ_CAJF01000059.1</a>
MSI10	*	<i>Arthrobacter nitrophenolicus</i> strain SJC	98%	<a href="#">NZ_AOFD01000111.1</a>
MSI11	*	<i>Arthrobacter nitrophenolicus</i> strain SJC	98%	<a href="#">NZ_AOFD01000111.1</a>
PSI7	***	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain B8W22	99%	<a href="#">NR_115953.1</a>
PSI9	**	<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518	99%	<a href="#">NC_022873.1</a>

\*\*\* Crecimiento abundante en la prueba de tolerancia al IMI (100 mg/L)

\*\* Crecimiento moderado en la prueba de tolerancia al IMI (100 mg/L)

\* Crecimiento escaso en la prueba de tolerancia al IMI (100 mg/L)

Se construyó un árbol filogenético con las secuencias de los aislados nativos que presentaron mayor tolerancia de crecimiento en medio enriquecido (MMSI), así como con secuencias representativas de cepas de referencia de la base de datos del NCBI (Figura 1). Este mostró que es evidente la formación de dos grupos taxonómicos obtenidos; el porcentaje de similitud se presenta en la tabla 2.



**Fig. 1.** Árbol filogenético de los aislados nativos basado en la secuencia parcial del gen 16SrDNA. La historia evolutiva fue inferida usando el método UPGMA (MEGA7) con el modelo estadístico Kimura de dos parámetros y 1000 réplicas de bootstrap.

#### 4. DISCUSIÓN

El suelo agrícola ha sido expuesto repetidamente a insecticidas químicos, que pueden servir como sustrato para el crecimiento de diversos microorganismos que participan en varios ciclos geoquímicos y como responsables del reciclaje de compuestos orgánicos. Los microorganismos de suelo contribuyen en la nutrición y salud de plantas, en la estructura y fertilidad de suelo; así como en la degradación de xenobióticos incluyendo varios insecticidas (Kirk *et al.*, 2004; Rana *et al.*, 2015). Diversas especies microbianas de suelo han sido aisladas usando como única fuente de carbono y energía a insecticidas químicos. Se ha reportado a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudoxanthomonas indica* (Liu *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014), *Leifsonia* (Anhalt *et al.*, 2007), *Brevibacterium sp.*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus sp.* *Rhizobium sp.* (Sabourmoghaddam *et al.*, 2015) que pueden degradar al IMI.

En nuestro estudio se utilizó MMS suplementado con 100 mg/L de IMI (MSMI), logrando obtener 26 aislados bacterianos diferentes de suelo agrícola, pero sólo 11 presentaron tolerancia al IMI en AN con 100 mg/L y fueron identificados molecularmente, el resto de los aislamientos presentaron escasa o nula tolerancia al insecticida, además de un crecimiento mayor a 24 h. El género más representativo fue *Bacillus*, observándose las

especies *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*. Los aislados nativos MSI5, MSI6, MSI7 corresponden a *Bacillus megaterium* con un 99% de identidad, siendo esta la bacteria más abundante. La cual se ha caracterizado por remover residuos de metales como níquel y vanadio (Fierros-Romero *et al.*, 2016). La cepa PSI9 presentó un 99% de identidad con *B. thuringiensis*, además de la presencia de cristales proteicos bipiramidales observados mediante microscopía óptica (dato no presentado). Esta bacteria es conocida por su uso como agente de control biológico para plagas del área agrícola, forestal y de importancia médica a nivel mundial (Brar *et al.*, 2006), también se han realizado estudios de degradación de insecticidas organofosforados (Wu *et al.*, 2013; Gangireddygar *et al.*, 2017), piretroides (Chen *et al.*, 2015, Pankaj *et al.*, 2016) por lo que se le considera una bacteria prometedora para la degradación de insecticidas químicos de suelo (Ferreira *et al.*, 2016). Por otra parte *B. subtilis* se ha reportado en la degradación de organofosforados (Acharya *et al.*, 2015) y organoclorados (Kumar *et al.*, 2014) y a *B. aryabhatai* como promotora de crecimiento (Lee *et al.*, 2012). No obstante, se ha reportado a otras especies de este género como degradadoras de IMI (Sharma *et al.*, 2014<sup>b</sup>).

En cuanto a *Microbacterium sp* y *Arthrobacter sp*, las cuales pertenecen a los actinomicetos se ha reportado que *A. nitrophenolicus* demostró tener potencial en degradar compuestos nitrofenólicos lo cual fue el caso de 2-cloro-4-nitrofenol (Arora & Jain., 2013), en este estudio la cepa MSI10 y MSI11 tienen 98% de similitud con la cepa SJC (NZ\_AOFD01000111.1). Mientras que el aislamiento MSI9 presentó un 99% de identidad con *M. yannicii* (NZ\_CAJF01000059.1), esta especie no se ha reportado en estudios de degradación o de remoción de xenobióticos. Sin embargo, este género se ha estudiado con fines de degradación de organofosforados y piretroides (Panneerselvan, 2013). De acuerdo a nuestros resultados las especies bacterianas encontradas en este estudio presentan un potencial biotecnológico para estudios posteriores de biodegradación del imidacloprid.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico a la Secretaria de Investigación y Posgrado (SIP20171866) y a la beca EDI.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## APÉNDICE A. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Información adicional sobre esta investigación se encuentra enseguida de la sección de referencias.

## REFERENCIAS

Acharya, K. P., Shilpkar, P., Shah, M.C. & Chellapandi, P. 2015. Biodegradation of Insecticide Monocrotophos by *Bacillus subtilis* KPA-1, Isolated from Agriculture Soils. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 175:1789–1804.



Adak, T. & Mukkerjee, I. 2016. Investigating role of abiotic factors on spinosad dissipation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 96(1):125–129. doi: 10.1007/s00128-015-1644-z

Anhalt, J.C., Moorman T. C. & Koskinen, W. C. 2007. Biodegradation of imidacloprid by an isolated soil microorganism. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 509–514.

Arora, P.K. & Jain, R.K. 2013. *Arthrobacter nitrophenolicus* sp. nov. a new 2-chloro-4-nitrophenol degrading bacterium isolated from contaminated soil. *3 Biotech*. 3:29–32

Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D. & Valéro, J.R. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochem* 41, 323–342.

Chen S., Deng, Y., Chang C., Lee, J., Cheng, Y., Cui, Z., Zhou J., He, F., Hu M. & Zhan L.H. 2015. Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19. *Scientific reports*. 5:8784. 1-10.

*Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. 2005. Edit. Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley. Springer. Vol. 2.

Cycon M., Markowicz, A., Borymski, S., Wójcik M. & Piotrowska-Seget, S. 2013. Imidacloprid induces changes in the structure, genetic diversity and catabolic activity of soil microbial communities. *Journal of Environmental Management*. 131 (2013) 55-65

Elbert, A., Haas, A., Springer, B., Thielert, W. & Nauen R. 2008. Mini-review: Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection- *Pest Management Science*. 64:1099–1105.

Ferreira L., Rosales E., Danko A.S., Sanromán M.A, & pazos M.M. 2016. *Bacillus thuringiensis* a promising bacterium for degrading emerging pollutants. *Process Safety and Environmental Protection*. 101: 19-26.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Fierros-Romero, G., Gómez-Ramírez, M., Arenas-Isaac, G.E, Pless R.C., & Rojas-Avelizapa, N.G. 2016. Identification of *Bacillus megaterium* and *Microbacterium liquefaciens* genes involved in metal resistance and metal removal. *Canadian Journal of Microbiology*. 62(6):505–513.

Gangireddygari, V.S.R., Kumar P. K, Ntushelo, K., Bangeppagari, M., Djami A.T. & Reddy B. 2017. Influence of environmental factors on biodegradation of quinalphos by *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Sciences Europe*. 29(1): 11.

Hussain, S., Hartley, C. J., Shettigar, M., & Pandey, G. 2016. Bacterial biodegradation of neonicotinoid pesticides in soil and water systems. *FEMS microbiology letters*, 363(23): 1-13.

- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kirk, J. L., Beaudette, L.E., Hart, B., Moutoglis, P, Klironomos, J.N, Lee, H. & Trevors, J.T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58: 169-188.
- Kumar A., Bhoot, N., Soni, I., & John P.J. 2014. Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain that degrades endosulfan and endosulfan sulfate. *3 Biotechnology*. 4:467–475
- Kumar S., Stecher G. & Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Lee, S., Jong-Ok Ka. & Hong-Gyu Song. 2012. Growth Promotion of *Xanthium italicum* by Application of Rhizobacterial Isolates of *Bacillus aryabhatai* in Microcosm Soil. *The Journal of Microbiology*. 45–49 .
- Liu Z., Dai, Y., Huan Y., Liu Z., Sun, L., Zhou, Q., Zhang W., Sang Q., Wei, H., Yuan, S. 2013. Different utilizable substrate have different effects on cometabolic fate of imidacloprid in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 97:6537-6547.
- Ma, Y., Zhai S., Mao S.Y., Sun, L.S., Wang, Y., Liu Z.H. & Dai Y. J. 2014. Co-metabolic transformation of the neonicotinoid insecticide imidacloprid by the soil isolate *Pseudoxanthomonas indica* CGMCC6648. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 49: 661-670.
- Mahapatra, B., Adak, T., Patil, N. K., Pandi, G. G. P., Gowda, G. B., Yadav, M. K. & Jena, M. (2017). Effect of Abiotic Factors on Degradation of Imidacloprid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(4), 475-480.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U. Salgado, V.L. & Kaussmann, M. 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 76 (2003) 55–69.
- Pandey, G., Dorrian, S.J., Russell R. J. & Oakeshort J.G. 2009. Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas sp.* 1G. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 380: 710-714.
- Pankaj, Negi, G., Gangola, S., Khati P., Kumar G., Srivastava A. & Sharma A. 2016. Differential expression and characterization of cypermethrin degrading potential proteins in *Bacillus thuringiensis* strain, SG4. *3 Biotech*. 6 (225)2-13.
- Panneerselvan L. 2013. Tesis. Enzymatic detoxification of organophosphorus pesticides, fenamiphos and malathion by *Microbacterium sp.* MM1. Doctor of Philosophy Centre for Environmental Risk Assessment and Remediation Division of the Information Technology, Engineering and the Environment. University of South Australia.

- Parte, S.G., Mohekar, A.D. & Kharat, A. 2017. Microbial degradation of pesticide: a review. *African Journal of Microbiology Research*. 11:992-1012.
- Phugare S.S., Kalyani D.C., Gaikad Y.B. & Jadhav J.P. 2013. Microbial degradation of imidacloprid and toxicological analysis of its biodegradation metabolites in silkworm (*Bombyx mori*). *Chemical Engineering Journal*. 230:27-35. DOI: 10.1016/j.cej.2013.06.042
- Rana S., Jindal, V., Mandal K., Kaur, G., Gupta, V. K. 2015. Thiamethoxam degradation by *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from agricultural soil. *Environmental Monitoring and Assessment*. 187:300.
- Sabourmoghaddam, N., Pauzi Zakaria M. & Dzolkhifli O. 2015. Evidence for the microbial degradation of imidacloprid in soils of Cameron Highland. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 182–188.
- Sharma, S., Singh B. & Gupta, V.K. 2014a. Assessment of imidacloprid degradation by soil isolated *Bacillus alkalinitrilicus*. *Environmental Monitoring and Assessment*. 186:7183-7193.
- Sharma, S., Singh B., & Gupta V. K. 2014b. Biodegradation of Imidacloprid by Consortium of Two Soil Isolated *Bacillus* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 93:637–642.
- Sharma T., Rajor, A. & Pal-Toor, A. 2014c. Degradation of Imidacloprid in Liquid by *Enterobacter* sp. Strain ATA1 using co-metabolism. *Bioremediation Journal*. 18:227-235.
- Sneath P.H.A. & Sokal R.R. (1973). *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: Freeman. 30(1): 573.
- Suchail, S. Guez D. & Belzunces L. 2000. Characteristics of Imidacloprid Toxicity in Two *Apis mellifera* Subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(7):1901–1905.
- US EPA (2008) Imidacloprid summary document registration review: initial docket December 2008. Docket Number: EPA-HQ-OPP-2008-0844.
- Weisburg, W.G., Barns, S. M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. 173(2): 697-703.
- Wu, S., Yan P., Zhangmin H., Zhipeng H., Lei X., Gelbič I., Xiong G., Lingling Z., & Shuangquan Z. 2013. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus thuringiensis* strain BRC-HZM2 capable of degrading chlorpyrifos. *Journal of Basic Microbiology*. 55(3): 389–397.

## APÉNDICE A.

### Material suplementario

#### **Análisis de las secuencias parciales del gen 16S rDNA**

Las secuencias obtenidas en formato Fasta fueron sometidas a MEGA 7, para llevar a cabo un alineamiento múltiple mediante CLUSTALW, el resultado fue exportado en formato MEGA y enseguida se sometió a la búsqueda del Modelo matemático para secuencias de DNA (parámetros por default). Se considera el mejor modelo arrojado por el programa (Kimura de 2 parámetros) y enseguida se inicia con la construcción de la filogenia molecular. Se seleccionan las preferencias del método: Método estadístico (UPGMA), Test de Filogenia (Método de Bootstrap con 1000 réplicas), Modelo de sustitución (Kimura de 2 parámetros e incluye sustitución d: transiciones y transversiones), con completa supresión de Gaps. Los resultados del árbol se muestran en la figura 1.

#### **Resultado de las secuencias parciales del gen 16S rDNA de los aislados nativos**

```
>MSI2_Bacillus_megaterium
TGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCACTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTT
CTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTT
AGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTGCTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGG
GTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGG
GAAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTAATCAGCTCGTGT
```

```
>MSI3_Bacillus_subtilis
TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGCTG
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGA
CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGC
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG
GAAGAACAAGTACCGTTCAAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGG
CTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC
TGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGT
```

TTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCATGGGGAGTACGGTCGCAAGACTG  
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCAGCACAAAGCGGTGGAACATGGGATTAATTCGAA

>MSI4\_Bacillus\_sp

GCAATCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGAATTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG  
TGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTC  
TCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTA  
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC  
ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA  
CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTTA  
GGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACCTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC  
GCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAA  
CTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG  
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG  
GGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGG  
TTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT  
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACG  
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGAGCGTTCCTTTCGGGGG  
ACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCATCAGCTCGTGTCTGTAATGTTGGGTAAAGTCC

>MSI5\_Bacillus\_sp

TGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC  
GTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTT  
CTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATT  
AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG  
ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTT  
AGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACCTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG  
CGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAA  
ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT  
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG  
GGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGG  
GTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC  
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAAC  
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGAGCGTTCCTTTCGGGG  
AAAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCCTCACCTCCTGTCAAAAATATAGGGTAAAGTCCAACA  
ACGAGCAAACCTTGCATCTTAGTTG

>MSI6\_Bacillus\_sp

TGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCATCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTAAGTAACA  
CGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCT  
TCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCAT  
TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG  
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAACCTCTGTTGT  
TAGGGAAGAACAAGTATGAGAGTAACCTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA  
GCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
TGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGT

GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAG  
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA  
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAA  
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGG  
GGAAAAAGTGACAGGAGATGCATGGTTGTCGTCAGCT

>MSI7\_Bacillus\_sp

CTGCAGTCGAGCGAAGCTGATTAGAAGCTTGCAATTCATGACGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACA  
CGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCT  
TCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCAT  
TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG  
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAACCTCTGTTGT  
TAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACCTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA  
GCGCGCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
TGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGT  
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAG  
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA  
CTGAAACTAAAAGGAATTGACGGGGGCCAGCACAACCGAAGGAACATGTGGTTAATTCGAACAAC  
C

>MSI9\_Microbacterium\_yannicii

GTGTTACCGACTTTCATGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCG  
TTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGAGGTGCAGTTGCAGACCTCAATCCGAACT  
GGGACCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCACCTCACGGTATTGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGC  
ATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGA  
CCCCGGCAGTATCCCATGAGTTCCACCATAACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGT  
TGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTTACGAGT  
GTCCAAAGAGTCCCCATTTCTGGGGTGTCTCGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGT  
TGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTTAGC  
CTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAAAGG  
ACCCACAACTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGGTATCTAAGCCTGTTTGCTCCCC  
ACCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGA  
TATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCGAATCTCCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCGTA  
CCCCTGACAGGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTCACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTC  
TTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT  
AGCCGGCGCTTTTTCTGCAAGTACCGTCACAAAAGCTTCTTCTTGTCTAAAAGAGGTTTACAACCC  
GAAGGCCGTATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTCCGCCATTGTGCAATATTCCCCAC  
TGCTGCCTCCCGTAGGAGACTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCG  
GCTACCCGTGACGCCTTGGTGAGCCATTACCACACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATC

>MSI10\_Anthrobacter\_nitrophenolicus

CSTCAGTCCACCTTAAGAAGGCTCCCTCCCACAAGGGGTTAAGGCCACCGGCTTCGGGAGGTTACC  
AACTTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAAGCCCGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGAT  
CTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCAAGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGG  
CTTTTTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGA  
AGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCCGGA  
GTCTCCTATGAGTCCCCACCATCACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC  
TTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAAACCAGCCCCAAAGG  
GGAAACCACATTTCTGCGGCGGTCCGGTCCATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG

AATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGG  
CCGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAAAACGTGGAATGTCCCCAC  
ACCTAGTGCCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCATGCTTT  
CGCTCCTCAGCGTCAGTTAATGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGC  
GCATTTACCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCCTACATCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACCG  
CAGATCCCGGAGTTGAGCCCCGGACTTTCACGGCAGACGCGACAAACCGCTACGAGCTCTTTACG  
CCCAATAATTCAGGATACGCTGCGCCCTACGTATTACGCGCTGCTGGCACGTAGTAGCCGCGCTTC  
TTCTGCAGTACCGTCACTTCGCTTCCTCCTACTGAARAGGATAACACCGGAAGCCGTCATCCTCAC  
GCGGCGTTCTGGCATAAGGCTTCGAAGCCCGA

>MSI11\_Anthrobacter\_nitrophenolicus

AGAGRITCAACTTAGACGGCTCCCTCCCACAAGGGGTAGGCCACCGACTTCGGGTGTTACCAACT  
TTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGACGCTTGCTGATCTGC  
GATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACGAGACCCGGCTTT  
TTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCTTTGTACCCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCC  
CAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTGCTCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCT  
CCTATGAGTCCCCACCATCACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA  
CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAAACCAGCCCCAAAGGGGAA  
ACCACATTTCTGCGGCGGTCCGGTCCATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATT  
AATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGT  
ACTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAAAACGTGGAATGTCCCCCACACCT  
AGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCATGCTTTGCT  
CCTCAGCGTCAGTTAATGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCAT  
TTCACCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCCTACATCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACCGCAGA  
TCCCGGAGTTGAGCCCCGGACTTTCACGGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCA  
ATAATTCGGATACGCTTGCGCCCTACGTATACGCGCTGCTGGCACGTAGTAGCCGCGCTCCTCTG  
CAGTACGTCACTTTCGCTCCTCCCTACTGAAGAGTTACACCGAGCGTCATCCTCAGCGTCGGCGAT  
CCTGCATCAGCCATGGGGCC

>PSI7\_Bacillus\_sp.

AGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCATTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG  
GGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTC  
CTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGC  
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG  
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTTAGG  
GAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTACCGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC  
GCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACT  
GGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG  
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGATTAATACCCTGGTAGTCCCCGCCGTAACGATGAAGGGCTAAAGGATTAAGG  
GATTTCCCCCCTTTAGGGCTCCACCTAACCCATTTAAGCCAACCCCCGGGGGAATACGGAAACA  
AAAATTGAACTCCAAGGAATTAAGGGGGACCCCCAAAAGGGGGAAACATTTGGATTTTTTTTAC  
AACACCCAAGAAAACTTTACCGGGATTTAGAAATACCTTAGAAAAA

>PSI9\_Bacillus\_thuringiensis

TGCAGTGCAGCGAATGGATTAAGAGCTTGATCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC  
GTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTT  
GAACTGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTTCGCATT  
AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG

ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTT  
AGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA  
GCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGT  
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAG  
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG  
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA  
CGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGA  
GCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCCTCAACTCCTAACAAAAAATGTTGGGTTAAGTCC