



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE  
CEPAS RIZOSFÉRICAS PERTENECIENTES AL GRUPO  
*BURKHOLDERIA SENSU LATO*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**ITZIA CITLALI GUEVARA GONZÁLEZ**

**ASESOR DE TESIS:**

**D.C. VIANEY MARÍN CEVADA**

**CO-ASESOR DE TESIS**

**D.C. RICARDO CARREÑO LÓPEZ**

**PUEBLA, PUE.**

**MARZO, 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de esta tesis no ha sido un camino fácil, a lo largo de todo este tiempo hay muchas personas que me han ayudado a realizar este trabajo, a llevar mejor los tiempos difíciles y también a mejorar como persona. Por eso, muy sinceramente agradezco:

Principalmente a mis padres por todos los esfuerzos consentidos para mi existencia y como mis primeros y eternos profesores por la paciencia que han tenido y por creer en mí. A mis hermanos y abuelita por presionar cada segundo para llevar esta tesis a su fin.

A mi asesora de tesis la Dra. Vianey Marín Cevada por su apoyo, dirección y comprensión. Por el trato siempre afectuoso y accesible, sin las cuales muy difícilmente habríamos realizado el presente trabajo.

Un agradecimiento especial al Dr. Ricardo Carreño López por su gran apoyo en la realización de los experimentos y tiempo para resolver mis dudas.

Finalmente, a mis compañeros y amigos de laboratorio en especial a Indi, Marisol, Bruno, Vicky, Josué, Rigel, Majo, Bere, Irving, Lex, Lili y Mari por su amistad y apoyo. Y a todos aquellos que hicieron más ameno y agradable este proceso. A la VIEP por el apoyo otorgado durante la estancia en el proyecto jóvenes investigadores.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, del Instituto de Ciencias Microbiológicas (ICUAP), de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	MARCO TEÓRICO .....	3
2.1	Taxonomía de las Proteobacterias .....	3
2.2	Taxonomía del género <i>Burkholderia</i> sensu lato - <i>Paraburkholderia</i> .....	5
2.3	Generalidades del género <i>Paraburkholderia</i> .....	8
2.4	<i>Paraburkholderia</i> en la rizósfera.....	9
2.5	<i>Paraburkholderia</i> en México .....	13
III.	ANTECEDENTES .....	14
IV.	JUSTIFICACIÓN .....	16
V.	OBJETIVOS .....	17
5.1	OBJETIVO GENERAL .....	17
5.2	OBJETIVOS PARTICULARES .....	17
VI.	METODOLOGÍA .....	18
6.1	Esquema del trabajo .....	18
6.2	Reactivación de cepas y revisión de la pureza .....	19
6.3	Caracterización fenotípica .....	20
6.3.1	Requisitos de crecimiento .....	20
6.3.1.1	Prueba de temperatura.....	20
6.3.1.2	Prueba de pH.....	20
6.3.1.3	Prueba de salinidad .....	21
6.3.2	Pruebas bioquímicas .....	21
6.3.2.1	Catalasa .....	21
6.3.2.2	Oxidasa .....	21
6.3.2.3	Prueba Lisina Hierro Agar (LIA).....	21
6.3.2.4	Prueba Agar Hierro-Triple azúcar (TSI).....	22
6.3.2.5	Oxidación de D-gluconato .....	22
6.3.2.6	Asimilación de carbohidratos.....	22
6.3.2.7	Actividad hemolítica .....	23
6.3.3	Pruebas basadas en el crecimiento a ciertas sustancias .....	23
6.3.3.1	Crecimiento a metales .....	23
6.3.3.2	Crecimiento a antibióticos .....	23

6.4	Caracterización genotípica .....	24
6.4.1	Extracción del DNA genómico de las cepas.....	24
6.4.2	Amplificación de los genes <i>recA</i> y <i>atpD</i> .....	24
6.4.3	Purificación del producto de PCR a partir de un gel de agarosa .....	25
6.4.4	Secuenciación de productos purificados.....	26
6.4.5	Análisis y Construcción de los árboles filogenéticos .....	26
VII.	DISCUSIÓN Y RESULTADOS .....	27
VIII.	CONCLUSIONES.....	41
IX.	LITERATURA CITADA .....	42
X.	ANEXOS .....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características principales de aislados del grupo <i>Paraburkholderia</i> .....	11
Tabla 2. Aislamiento y código de identificación de las siete cepas reactivadas.....	19
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento (T <sub>m</sub> ) para la amplificación de los genes <i>recA</i> y <i>atpD</i> para especies que pertenecen al grupo de <i>Burkholderia</i> sensu lato.....	25
Tabla 4. Aspectos comparativos de GB190 y GB203 con respecto a <i>P. sediminicola</i> y <i>P. aspalathi</i> .....	38
Tabla 5. Resultados de las pruebas. ++, Condición óptima de crecimiento; +, crecimiento; -, cepa negativa; ND, no determinado.....	49
Tabla 6. Resultados del ensayo a metales: +, crecimiento; -, no crecimiento; ND, no determinado.....	51
Tabla 7. Resultados del ensayo de antibióticos: +, crecimiento; -, cepa negativa; ND, no determinado.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético y relaciones metabólicas de algunos géneros del filo Proteobacteria (Madigan <i>et al.</i> , 2015). -----	4
Figura 2. El contenido de G+C de los genomas de varias especies de <i>Burkholderia</i> (s.l.) se muestra en forma de gráfico (Gyaneshwar <i>et al.</i> , 2011)-----	9
Figura 3. Sección de la rizósfera con sus tres regiones: ectorizósfera, rizoplano y endorizósfera (Seshadri <i>et al.</i> , 2015).-----	10
Figura 4. Colonias de color blanco cremoso y mucoide en medio PCAT (A) y medio LB (B) -----	27
Figura 5. Crecimiento óptimo bacteriano en medio nutritivo ajustado a pH 6 de las cepas GB152, GB62 y GB203. -----	30
Figura 6. Prueba de oxidasa positiva; <i>E.coli</i> (control negativo) y <i>P. putida</i> (control positivo)-----	31
Figura 7. Amplicón obtenido utilizando cebadores <i>atpDF</i> y <i>atpDR</i> (izquierda) y <i>recAF- recAR</i> (derecha). -----	34
Figura 8. Filogenia por el método Máxima Verosimilitud basado en el gen 16S rRNA que muestran las relaciones de las cepas y otros miembros del género. Con Bootstrap de 1000 repeticiones. Enraizado con <i>Burkholderia stabilis</i> , <i>Trinickia caryophylli</i> , <i>Caballeronia sordidicola</i> , <i>Robbsia andropogonis</i> y <i>Cupriavidus necator</i> . -----	35
Figura 9. Filogenia por el método Máxima Verosimilitud basado en las secuencias de genes concatenados (16S rRNA + <i>recA</i> + <i>atpD</i> ) (2135 pb) que muestran las relaciones de las cepas y otros miembros del género. Con Bootstrap de 1000 repeticiones. Enraizado con <i>Burkholderia stabilis</i> , <i>Trinickia caryophylli</i> , <i>Caballeronia sordidicola</i> , <i>Robbsia andropogonis</i> y <i>Cupriavidus necator</i> . -----	36
Figura 10. Filogenia por el método Neighbor- Joining basado en las secuencias de genes concatenados (16S rRNA + <i>recA</i> + <i>atpD</i> ) (2135 pb) que muestran la separación de GB190 con respecto de <i>P. sediminicola</i> y <i>P. aspalathi</i> . Con Bootstrap de 1000 repeticiones. Sin enraizar. -----	37

## RESUMEN

El grupo *Burkholderia* sensu lato comprende más de 122 especies, las cuales pueden ser aisladas de diversos nichos ecológicos. Recientemente, se ha propuesto la división en seis géneros: *Burkholderia* sensu stricto (s.s.), *Caballeronia*, *Paraburkholderia*, *Trinickia*, *Mycetohabitants* y *Robbsia* mediante análisis filogenéticos del gen ARNr 16S y genes de mantenimiento, secuencias de genomas y proteínas. En este trabajo, se estudió la posición taxonómica de siete cepas rizosféricas pertenecientes al grupo de *Burkholderia* sensu lato, aisladas en el municipio de Chignahuapan del estado de Puebla de árboles maderables como el pino y plantas silvestres como el helecho y las bromelias, utilizando un enfoque taxonómico polifásico. Los análisis genéticos con base en los genes ARNr 16S, *atpD* y *recA* confirmaron que todas las cepas pertenecen al género *Paraburkholderia* y que GB45, GB51, GB53, GB62, GB152 y GB203 forman un clúster con *Paraburkholderia sediminicola* y *Paraburkholderia aspalathi*, excepto la cepa GB190, la cual podría representar una nueva especie al separarse de este grupo como lo demuestran los árboles filogenéticos y la caracterización fenotípica. Las siete cepas de *Paraburkholderia* crecieron a una temperatura de 35°C, a pH 6 y son sensibles en un rango de 1 a 3% de NaCl. El crecimiento en medio NB que contienen distintas concentraciones de metales pesados (Co, Pb, Mo, Ni, Zn y V) fue diverso, así como en las pruebas de antibióticos. Cabe destacar que la cepa GB51 fue la única que creció en zinc hasta 200 ppm y en vanadio hasta 50 ppm, mientras la cepa GB190 no creció a 39°C y a un pH 4 pero fue la única cepa que creció en gentamicina al 1 µg/mL y kanamicina al 2.5 µg/mL.

## **ABSTRACT**

The *Burkholderia* sensu lato group comprises more than 122 species, which can be isolated from various ecological niches. Recently, the division of the genus into six genera has been proposed: *Burkholderia* sensu stricto (s.s.), *Caballeronia*, *Paraburkholderia*, *Trinickia*, *Mycetohabitants* y *Robbsia* by means of phylogenetic analyzes of the 16S rRNA gene and maintenance genes, genome and protein sequences.

In this study, was investigated the taxonomic status of seven rhizospheric bacterial strains belonging to the *Burkholderia* sensu lato group, the strains were isolated in the municipality of Chignahuapan of the state of Puebla from timber trees such as pine, and wild plants such as fern and bromeliads using a polyphasic taxonomic approach. The genetic analyses based on the 16S rRNA genes, *atpD* y *recA* genes confirmed that all strains are *Paraburkholderia* and that GB45, GB51, GB53, GB62, GB152 and GB203 form a cluster with *Paraburkholderia sediminicola* and *Paraburkholderia aspalathi*, except for GB190 strain , which could represent a new species by separating from this group as demonstrated by phylogenetic trees and phenotypic characterization. The seven strains of *Paraburkholderia* grew at a temperature of 35°C, at pH 6 and are sensitive in 1%, 2% and 3% NaCl. The growth in heavy metals (Co, Pb, Mo, Ni, Zn and V) was diverse, as well as in antibiotic tests. Noteworthy than GB51 strain grew in zinc until 200 ppm and in vanadium up to 50 ppm, while the GB190 strain did not grow at 39°C at pH 4 but was the only strain that grew in gentamicin (1 µg/mL) and kanamycin (2.5 µg /mL).

## I. INTRODUCCIÓN

El mundo microbiano es vasto, variado y dinámico. Hay aproximadamente un millón y medio de especies descritas y este número representa ~4% con las que actualmente compartimos el planeta. Con los avances científicos en la taxonomía se ha logrado comprender la evolución y con ello la construcción de un árbol universal de la vida que pone de manifiesto claramente tres dominios filogenéticos: *Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea* los cuales se encuentran formados por organismos muy diferentes (Madigan *et al.*, 2015).

La taxonomía bacteriana se ha centrado principalmente en aspectos prácticos de identificación y descripción, actividades que están basadas en gran medida en la comparación de propiedades visibles mediante la caracterización fenotípica, como morfología, fisiología, metabolismo y pruebas químicas de la célula. Por otra parte, tiene en cuenta las características genotípicas como el análisis del genoma o secuencias multilocus que han permitido la organización de estos microorganismos en grupos cada vez más inclusivos según sus características fenotípicas y genotípicas, reconociendo el amplio grupo de sistemas de vida que han colonizado las bacterias prácticamente todos los ambientes: terrestres y marinos; incluidas las ubicaciones geográficas consideradas extremas u hostiles para la vida, tales como hábitats con alta salinidad, alcalinidad, acidez, altas y bajas temperaturas, alta presión y alta radiación, el cuerpo humano, plantas y esencialmente el suelo (Bise *et al.*, 2012).

El suelo es uno de los reservorios de mayor biodiversidad en la Tierra, Lavelle y España (2001) mencionan que es un hábitat favorable para las bacterias, ya que tanto la temperatura como la humedad son relativamente favorables. La estructura de la comunidad bacteriana estará determinada por muchas variables, incluida la ubicación geográfica y la estructura del suelo (Gelsomino *et al.*, 1999; Doornbos, Van Loon y Bakker, 2012), el tamaño de partícula (Ranjard *et al.*, 2000; Sessitsch *et al.*, 2001; Doornbos *et al.*, 2012), composición mineral (Carson *et al.*, 2009; Doornbos *et al.*, 2012) y prácticas agrícolas (Doornbos *et al.*, 2012). Uno de los lugares más fascinantes de la actividad y la diversidad bacteriana en los suelos es la rizósfera. La rizósfera es la capa delgada de suelo influenciada por el sistema radicular (Dobbelaere y Okon, 2003), es un entorno dinámico y versátil de interacciones intensivas planta-microorganismo. Las raíces de las plantas exudan una gran diversidad de nutrientes orgánicos (ácidos orgánicos, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, nucleósidos, mucílago, etc.) y señales químicas que atraen a las poblaciones microbianas, especialmente aquellas capaces de metabolizar compuestos exudados de plantas y proliferar en este hábitat (White *et al.*, 2017). Es un lugar en el que quedan por descubrir y cultivar cientos de miles de especies, lo que representa un depósito

sustancial de diversidad genética y un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas.

Desafortunadamente, se describían nuevas especies basadas en el análisis de un conjunto muy limitado de aislados (Rosselló y Amann, 2001) esto debido a las deficiencias que propiciaban los estudios usados que estaban basados en caracteres morfológicos, fisiológicos (necesidad de nutrientes) y estructurales (diferencias entre lípidos de membranas) que no permitían conocer los microorganismos existentes hasta ahora.

Esto era cierto para muchas especies bacterianas, incluidas varias que pertenecen al grupo de *Burkholderia* sensu lato (Caballero *et al.*, 2007; Estrada-de los Santos *et al.*, 2018). Sin embargo, la taxonomía bacteriana cambió al adoptar una combinación de métodos para la identificación y descripción de nuevas especies basada en un *enfoque polifásico* de la taxonomía utilizando tres clases de métodos: fenotípico, genotípico y filogenético para complementar los problemas de la agrupación y caracterización. Este enfoque ha permitido la división del género *Burkholderia* ahora *Burkholderia* sensu lato (s.l.) en seis géneros: *Burkholderia* sensu stricto (s.s.), *Caballeronia*, *Paraburkholderia*, *Trinickia*, *Mycetohabitants* y *Robbsia* mediante análisis filogenéticos de los genes ARNr 16S y de mantenimiento, secuencias de genomas y proteínas (Estrada-de los Santos *et al.*, 2018).

## II. MARCO TEÓRICO

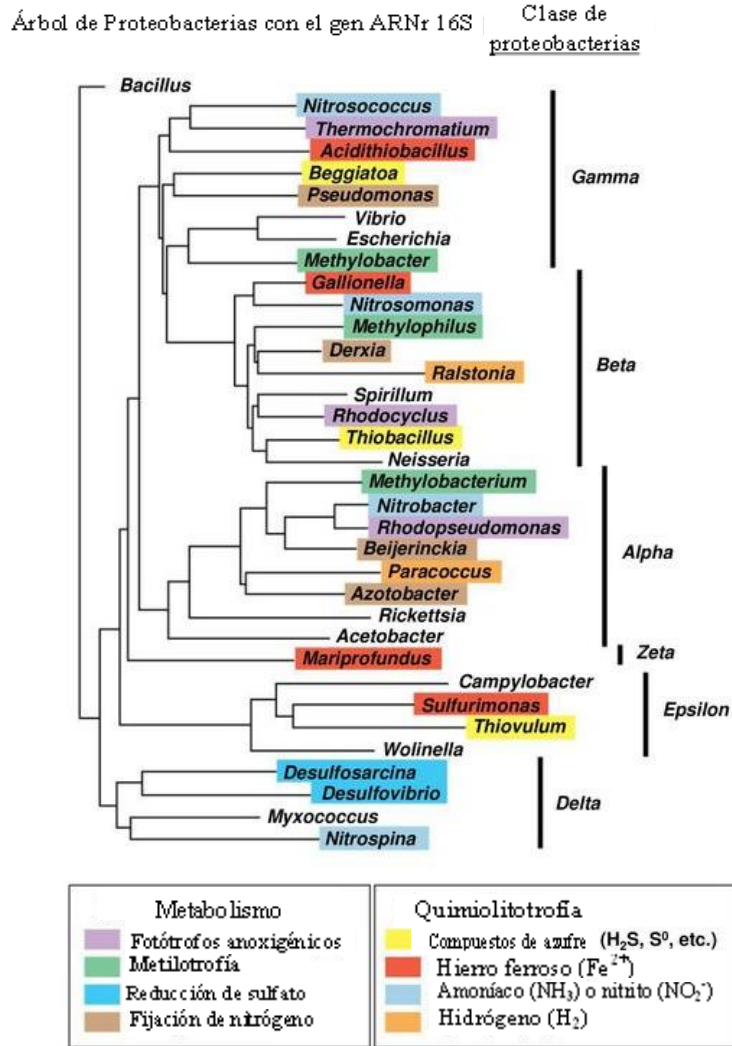
### 2.1 Taxonomía de las Proteobacterias

El grupo de las proteobacterias constituyen uno de los 25 filotipos del dominio *Bacteria*, es el grupo taxonómico más numeroso y representan la gran mayoría de las bacterias Gram-negativas conocidas. Abarcan un conjunto muy complejo de atributos fenotípicos y fisiológicos que incluyen muchos fotótrofos (responsables de las características de color púrpura), heterótrofos y quimiolitótrofos (Gupta, 2000; Rodríguez-R *et al.*, 2018). Este grupo es de gran importancia biológica, ya que incluye una gran cantidad de patógenos humanos, animales y vegetales. Así como bacterias de interés médico, industrial y agrícola (Madigan *et al.*, 2015).

La principal base para definir el grupo de las proteobacterias hasta el momento ha sido la elaboración de árboles filogenéticos basados en secuencias del gen ribosomal 16S (Gupta, 2000; Rodríguez-R *et al.*, 2018). Separándolas en seis clases designadas por letras griegas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  (Figura 1).

La clase de interés de este proyecto es  $\beta$ -proteobacteria con cerca de 500 especies descritas, siendo la tercera clase más grande del grupo (Madigan *et al.*, 2015). En total son seis los órdenes con especies descritas en la clase Betaproteobacteria: *Burkholderiales*, *Hydrogenophilales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales* y *Rhodocyclales* (Madigan *et al.*, 2015).

La familia *Burkholderiaceae* pertenece al orden *Burkholderiales* que también ha sido descrita sobre la base del análisis filogenético de las secuencias ARNr 16S; la familia contiene los géneros *Burkholderia* (género tipo), *Chitinimonas*, *Cupriavidus*, *Lautropia*, *Limnobacter*, *Pandoraea*, *Paucimonas*, *Polynucleobacter*, *Ralstonia* y *Thermothrix*. La familia es fenotípica, metabólica y ecológicamente diversa; incluyen quimioorganótrofos estrictamente aeróbicos, facultativamente aeróbicos y, por lo general, anaeróbicos, fotótrofos anoxigénicos, quimiolitótrofos obligatorios y facultativos, fijadores de nitrógeno de vida libre y patógenos de plantas, animales y humanos, así como de interés biotecnológico (Madigan *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Árbol filogenético y relaciones metabólicas de algunos géneros del filo **Proteobacteria** (Madigan *et al.*, 2015).

El género tipo, *Burkholderia* (s. l.), se encuentra constituida por más de 122 especies que habitan diferentes ambientes, como el agua y el suelo. Asimismo, pueden establecer simbiosis con plantas, ya sea como endófito o desarrollando nódulos en leguminosas. También se han descrito especies que pueden comportarse como patógenas de humanos (algunas con carácter de oportunistas), de plantas y de animales. Entre sus características generales podemos mencionar que son bacilos rectos, catalasa positivos y gram negativos; oxidasa variables, por lo general positivos. Son bacterias móviles con un flagelo polar único o bien lofótricas; excepto *Burkholderia mallei*. Como reserva utilizan el polihidroxibutirato según las especies. También son mesófilos y no esporulados. Su metabolismo es aerobio. La proporción de G+C varía entre género.

Para clasificar a este género se ha hecho uso de la taxonomía polifásica a través de técnicas moleculares (filogenias moleculares); como contenido de guanina/citosina, hibridaciones genoma-genoma, análisis de proteínas, la secuenciación del ADN ribosomal (Vandamme *et al.*, 1996), o bien, el análisis de secuencias multilocus que incluye genes de mantenimiento como *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *trpB*, entre otros, ya que se ha demostrado que se distribuyen universalmente entre especies bacterianas y están en copias únicas en el cromosoma bacteriano resolviendo relaciones filogenéticas en diversos grupos (Yamamoto y Harayama, 1998; Maeda *et al.*, 2006; Harayama *et al.*, 2015). Incluyendo la disponibilidad de las secuencias en la base de datos para el estudio del grupo *Burkholderia* sensu lato.

## 2.2 Taxonomía del género *Burkholderia* sensu lato - *Paraburkholderia*

En 1942 el fitopatólogo estadounidense Walter H. Burkholder describió las primeras dos especies de "*Burkholderia*", las cuales recibieron el nombre de *Phytomonas caryophylli* y *Phytomonas alliicola*; y posteriormente nombradas *Pseudomonas caryophylli* y *Pseudomonas alliicola*, siendo patógenos de clavel y cebolla, respectivamente (Burkholder, 1942). En 1950, Burkholder describe a; *Pseudomonas cepacia* agente causal de la enfermedad de la "piel agria" de la cebolla (Burkholder, 1950), fue considerada como un importante patógeno, ya que también afectaba a personas con fibrosis quística, la cual se convertiría en la especie tipo del género actual. Por largo tiempo, estas bacterias fueron reconocidas como un grupo de *Pseudomonas* no fluorescentes debido al estudio de una caracterización de taxonomía clásica.

No obstante, en 1973, con los avances en la biología molecular un grupo de investigadores llevó a cabo un análisis de hibridación ARN- ADN entre las especies de *Pseudomonas* (Palleroni *et al.*, 1973) reconociendo la heterogeneidad taxonómica de este género, lo cual condujo a la subdivisión en cinco grupos de homología RNA ribosomal, cada uno con una denominación independiente. Más tarde, Yabuuchi *et al.* (1992) proponen mover siete especies del grupo II de homología RNA ribosomal de *Pseudomonas* (*P. cepacia*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. pickettii* y *P. solanacearum*) al nuevo género *Burkholderia*, con base en los análisis de taxonomía polifásica, incluidos la secuenciación de ARN ribosomal, la hibridación ADN-ADN, el análisis de ácidos grasos y análisis bioquímicos, con lo que además, expusieron la estrecha relación genómica entre un grupo de especies que fue llamado *Complejo Burkholderia cepacia* (Yabuuchi *et al.*, 1992). Sin embargo, un análisis subsecuente basado en un estudio taxonómico más detallado reportó que algunas especies del género *Burkholderia* correspondía a otro género bacteriano y fueron reclasificadas como el género, *Ralstonia*: *R. picketti* y *R. solanacearum* (Gillis *et al.*, 1995; Yabuuchi *et al.*, 1995).

En los años siguientes se identificaron numerosas bacterias que fueron clasificadas dentro del género *Burkholderia*, muchas de ellas fueron aislados de diferentes cultivos de interés humano, como arroz, maíz, flores como gladiolas y muchas más, incluso se identificaron especies patógenas para animales incluidos el humano. Hasta el 2012, las especies reconocidas eran 62 y la construcción de los árboles filogenéticos estaba basada en el análisis de la secuencia de genes ribosómicos y genes codificadores de proteínas esenciales implicados en procesos como la multiplicación y el metabolismo celular (ARNr 16S, *recA*, *gyrB*, *rpoB*) (Suárez-Moreno *et al.*, 2012). Tomando en cuenta este conjunto de análisis que producen filogenias altamente resueltas y conllevan a una mejor delineación de las especies, se establecieron dos grupo principales que pudieron distinguir dentro del género *Burkholderia*: el grupo de las patógenos en el que se incluye al BCC y el denominado grupo “*Pseudomallei*”; y el segundo grupo de las “bacterias ambientales benéficas para las plantas” o PBE por sus siglas en inglés (plant-beneficial-environmental) (Suárez-Moreno *et al.*, 2012). Esta última incluye bacterias con actividades que promueven el crecimiento de las plantas, los diazótrofos simbióticos y de vida libre, con actividades antibióticas y de biorremediación.

Sin embargo, un año antes Gyaneshwar *et al.* (2011) proponen por primera vez que las cepas de *Burkholderia* asociadas a plantas pero no patógenas se dividieran con el nombre de *Caballeronia* en honor al microbiólogo mexicano fallecido Caballero Mellado, pionero en muchos de los estudios sobre cepas asociadas a plantas.

De la misma forma Estrada-de los Santos *et al.* (2013) con base en los datos de secuenciación del gen ARNr 16S y el análisis de secuencias Multilocus (MLSA) de un total de 77 especies de *Burkholderia*, detectan dos grupos (denominados A y B), el grupo A con secuencias del género *Caballeronia* propuesto por Gyaneshwar *et al.* (2011) y con secuencias del grupo PBE de Suárez-Moreno *et al.* (2012) consistente de cepas ambientales, mientras el grupo B se compone de patógenos de plantas, animales y humanos.

Más tarde Sawana *et al.* (2014) realizaron dos estudios; uno a partir de secuencias del gen ARNr 16S y un análisis de genómica comparativa de 45 secuencias de especies del género *Burkholderia* y determinaron las relaciones filogenéticas considerando las secuencias concatenadas de 21 proteínas conservadas, los resultados del trabajo fueron muy similares a los que describió Estrada-de los Santos *et al.* (2013), el Clado I, se compone de especies patógenas, conservaría el nombre del género, y éste se subdivide a su vez en tres, el segundo grupo Clado II integraría un nuevo género que denomina *Paraburkholderia* similar al Grupo A, PBE o *Caballeronia*. Otro análisis filogenético fue realizado por Zuleta *et al.* (2014) con

base en el uso de genes de mantenimiento de 15 especies de *Burkholderia*, sus resultados también respaldan la existencia de dos diferentes grupos.

En general, la taxonomía del género *Burkholderia* permanece en un flujo significativo (Estrada de los Santos *et al.*, 2016). Con su revisión del grupo, Estrada-de los Santos *et al.* (2016) reconocieron dos grupos monofiléticos: Grupos A y B; A consiste en *Caballeronia* y *Paraburkholderia* según lo circunscrito por Gyaneshwar *et al.* (2011) y Sawana *et al.* (2014), respectivamente, mientras que el Grupo B incluye la mayoría de los patógenos de humanos, animales y vegetales, así como el llamado "Complejo *B. cepacia*". Además de que mostraron que *B. andropogonis* (ahora *Robbsia andropogonis*) se separa en su propio grupo.

Para resolver las relaciones dentro del género, en particular las relacionadas con *Paraburkholderia* y *Caballeronia*, Beukes *et al.* (2017) hicieron uso de datos completos de las secuencias del genoma de 78 cepas tipo disponibles en el dominio público. Y para aumentar la representación de las llamadas especies ambientales, incluyeron la especie rizobial *P. aspalathi* (Mavengere *et al.*, 2014) y *P. diazotrophica* (Sheu *et al.*, 2013), y bacterias del suelo *P. hospita* (Goris *et al.*, 2002), *P. phenazinium* (Viallard *et al.*, 1998), *P. sartisoli* (Vanlaere *et al.*, 2008), *P. terricola* (Goris *et al.*, 2002), así como especies diazotróficas asociadas a plantas *P. caballeronis* (Martínez Aguilar *et al.*, 2013) y *P. tropica* (Reis *et al.*, 2004). Exponiendo una división formal entre las especies patógenas y las especies ambientales beneficiosas para las plantas (PBE) sobre la base de sus genomas centrales (Beukes *et al.*, 2017) además de que sería considerando a partir de aquí como el grupo *Burkholderia* sensu lato.

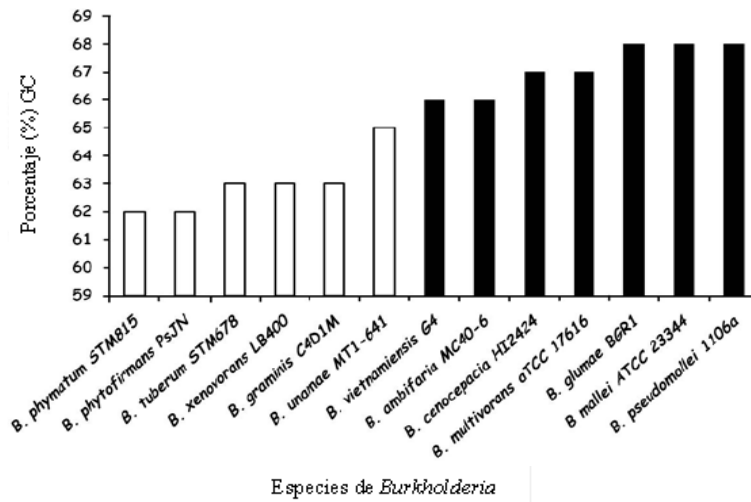
Actualmente, la división de este grupo fue respaldada por el análisis del genoma, sin embargo, Estrada-de los Santos (2018) mencionaba que ninguno de estos géneros podía acomodar dos grupos importantes de especies. Una de ellas incluye *Paraburkholderia rhizoxinica* y *Paraburkholderia endofungorum* que se encuentran estrechamente relacionadas, ambos simbiontes del fitopatógeno fúngico *Rhizopus microsporus*. El segundo grupo comprende a *Paraburkholderia symbiotica*, *Paraburkholderia caryophylli*, *Burkholderia dabaoshanensis* y *Paraburkholderia soli*. Para aclarar estas posiciones dentro de *Burkholderia* sensu lato, se llevó a cabo un enfoque filogenómico basado en un análisis de máxima verosimilitud de genes conservados de más de 100 especies de *Burkholderia* sensu lato. Además, se calcularon la identidad de nucleótidos promedio (ANI) y la identidad de aminoácidos (AAI). Los datos apoyaron fuertemente la existencia de dos clados distintos y únicos, que de hecho sustentan la descripción de dos géneros novedosos, *Mycetohabitans* gen. nov. y *Trinickia* gen. nov.

Por lo cual, el grupo de *Burkholderia* sensu lato (s.l.) ahora se encuentra formado por seis géneros: *Burkholderia* sensu stricto (s.s.), *Caballeronia*, *Paraburkholderia*, *Trinickia*, *Mycetohabitants* y *Robbsia* (Estrada-de los Santos *et al.*, 2018).

### 2.3 Generalidades del género *Paraburkholderia*

*Paraburkholderia* es un género de  $\beta$ -proteobacterias que son gram-negativas, rectas o ligeramente curvadas, con uno o más flagelos polares, que aparecen por separado, en pares o en grupos. Las características morfológicas y metabólicas son similares a las del género *Caballeronia*. Actualmente, está compuesta por 74 especies reconocidas de los más variados ambientes, incluidos suelos agrícolas, suelos volcánicos, agua y plantas (Weber y King 2017; LPSN 2019).

A diferencia de las especies de *Burkholderia* sensu stricto, los miembros de *Paraburkholderia* no se asocian comúnmente con la infección humana. Además de que forman un clado monofilético dentro de la familia *Burkholderiaceae*, que es lo que les llevó a distinguirse como un género independiente de las especies de los géneros de *Caballeronia* y *Burkholderia* sensu stricto, en combinación con el hallazgo de secuencias conservadas indels (CSI) que son exclusivos de las especies de *Paraburkholderia* (Sawana *et al.*, 2014). Los CSI en las secuencias de aminoácidos de la proteína de tipo transposasa A, la glicosiltransferasa del grupo 1, la undecaprenilfosfato glucosa fosfotransferasa y la monooxigenasa 4-hidroxiacetofenona que distinguen este género fueron descritas por Sawana *et al.* (2014). Asimismo el contenido de C+G es de 58.9 a 65% con respecto a los otros dos géneros como se muestra en la Figura 2., donde las especies con el contenido más bajo son miembros del clado asociado a las plantas (barras blancas) y se utilizan para el control biológico, la biorremediación o bacterias que promueven la fijación de nitrógeno en plantas. Las especies con el mayor contenido de G + C son los fitopatógenos o patógenos oportunistas de los mamíferos (barras negras).



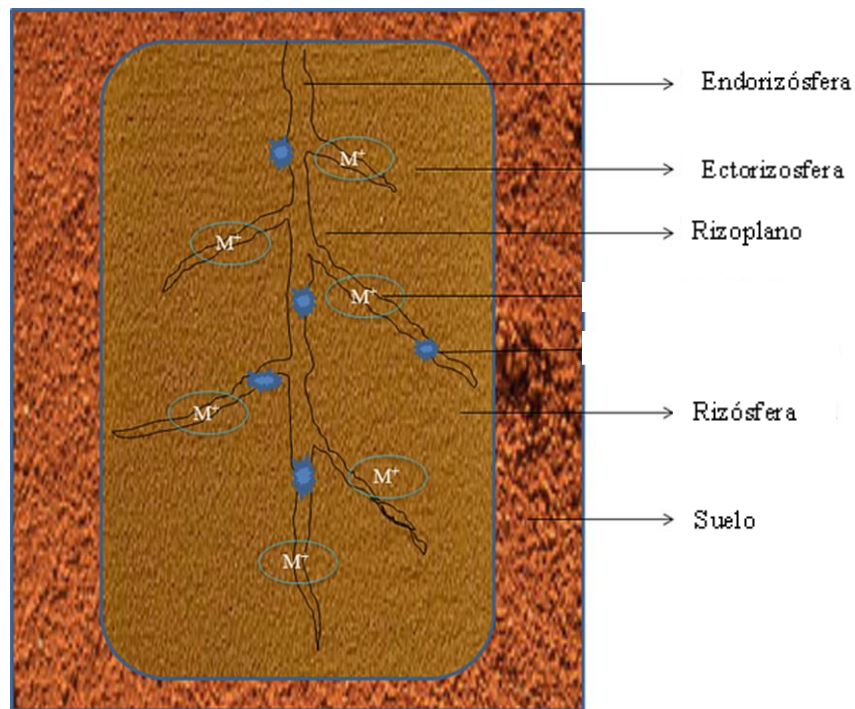
**Figura 2.** El contenido de G+C de los genomas de varias especies de *Burkholderia* (s.l.) se muestra en forma de gráfico (Gyaneshwar *et al.*, 2011)

#### 2.4 *Paraburkholderia* en la rizósfera

En las últimas décadas han surgido numerosos estudios en torno al género *Paraburkholderia* ya que han sido aislados en todos los continentes. De hecho, las cepas de la misma especie se han recuperado de lugares distantes y de muy diferentes nichos. Muchos de ellos se han identificado en asociación con plantas, con las cuales pueden tener interacciones epifíticas, endofíticas o endosimbióticas, las especies de este grupo también pueden encontrarse asociadas con hongos e insectos o libres en el suelo. Uno de los lugares más fascinantes de la actividad y la diversidad en el suelo es la rizósfera.

La rizósfera es una zona biológicamente activa en la interfaz raíz-suelo, controlada por la raíz de la planta y los metabolitos liberados, donde una gran cantidad de procesos físicos, químicos y biológicos que interactúan entre sí y operan dentro de esta zona. Fue descrita por primera vez en 1904 por el agrónomo alemán Lorentz Hiltner, y ha sido el centro de investigación intensiva durante muchos años debido a su importancia en la aportación de nutrientes y en la patogénesis de las plantas. La razón principal de la abundancia de comunidades microbianas cercanas a las raíces de las plantas, se debe a la presencia de exudados radiculares, los cuales proporcionan una fuente de carbono, aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas a la microbiota; favoreciendo su supervivencia en los suelos (Dennis *et al.*, 2010).

Numerosas investigaciones a lo largo de los últimos cien años ayudaron a dividir la rizósfera en tres zonas según su proximidad relativa a la raíz y su influencia resultante. La endorizósfera es la capa interna que incluye la corteza y la endodermis, donde los microbios y los cationes (metales pesados) pueden ocupar el espacio entre las células. El rizoplano o la capa intermedia consisten en la epidermis de la raíz y mucílago, que se encuentra adyacente a la raíz. La ectorizosfera es la capa más externa; es decir, el suelo que se encuentra inmediatamente adyacente a la raíz (figura 3). Los sistemas de raíces de las plantas son intrínsecamente complejos y diversos y, por lo tanto, la rizósfera no es una región de tamaño o forma definibles.



**Figura 3.** Sección de la rizósfera con sus tres regiones: ectorizósfera, rizoplano y endorizósfera (Seshadri *et al.*, 2015).

La rizósfera es el hábitat más frecuente de *Paraburkholderia* (Tabla 1). Se ha especulado que tal preferencia puede estar asociada con su versatilidad catabólica que les permite degradar los exudados y otros compuestos derivados de la raíz, y así persistir en la superficie de ésta (Suárez *et al.*, 2012).

Un número considerable de cepas se han recuperado de esta zona como *P. unamae*, *P. xenovorans*, *P. tropica* y *P. silvatlantica*, lo que sugiere que este podría ser su nicho principal (Caballero *et al.*, 2004; Caballero *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2012). *P. heleia*, *P. bannensis*, *P. acidipaludis*, *P. oxyphila* y *P. ginsengisoli* también se han recuperado de la rizósfera, pero sus descripciones de las especies se basan solo en algunos aislamientos, por lo que las conclusiones sobre su aparición y diversidad

requieren investigación adicional (Aizawa *et al.*, 2010; Aizawa *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2008).

Es posible que las plantas tengan preferencias por determinadas especies de *Paraburkholderia* rizosféricas, y que la ubicación geográfica también pueda ser un factor en esta preferencia. Por ejemplo, se ha encontrado *P. unamae* en la rizósfera del maíz, café, tomate y caña de azúcar, sin embargo prevalece en la rizósfera de la caña de azúcar en México, pero no en Brasil (Caballero *et al.*, 2004; Caballero *et al.*, 2007).

Algunas especies pueden no solo aparecer en la rizósfera sino también en otros nichos, como el suelo. Por ejemplo, *P. xenovorans* LB400T se recuperó de un suelo contaminado con policlorobifenilo (PCB), pero varias otras cepas de *B. xenovorans* también se han aislado de la rizósfera de café y tomate (Caballero *et al.*, 2007; Goris *et al.*, 2004). De manera similar, *Paraburkholderia sartisoli*, originalmente aislada de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos (HAP), se recuperó recientemente de la rizósfera del maíz y de las pilas de composta (Vanlaere *et al.*, 2008).

**Tabla 1.** Características principales de aislados del grupo *Paraburkholderia*

<b>Especie</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
<i>P. acidipaludis</i>	Endófito y rizósfera	<i>Eleocharis dulcis</i>	Genes <i>nifH</i>	(Aizawa <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. bannensis</i>	Rizósfera	<i>Panicum repens</i>	Genes <i>nifH</i>	(Aizawa <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. graminis</i>	Rizósfera	<i>Zea mays</i> , <i>L. deliciosus</i> , <i>P. pinea</i> , <i>S. lycopersicum</i>	Gen <i>acdS</i> , tolerancia a la salinidad y resistencia sistémica inducida	(Barriuso <i>et al.</i> , 2005) (Viallard <i>et al.</i> , 1998)
<i>P. caledonica</i>	Rizósfera y suelo	<i>Vitis vinifera</i>	Gen <i>acdS</i>	(Coenye <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. ginsengisoli</i>	Rizósfera	<i>Panax ginseng</i>	Actividad $\beta$ -Galactosidasa	(Kim <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. heleia</i>	Rizósfera	<i>Eleocharis dulcis</i>	Genes <i>nifH</i>	(Aizawa <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. phytofirmans</i>	Endófito y rizósfera	<i>Allium cepa</i> , <i>Solanum spp.</i> , <i>Oryza sativa</i>	Gen <i>acdS</i> , promotora de crecimiento vegetal, actividad antifúngica	(Sessitsch <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. sartisoli</i>	Rizósfera y suelos con polihidroxicanoatos	<i>Zea mays</i>	Degradación de compuestos aromáticos	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. silvatlantica</i>	Rizósfera y endosfera	<i>Zea mays</i> , <i>S. officinarum</i> , <i>A. comosus</i>	Genes <i>nifH</i> y <i>acdS</i> , promotora de crecimiento vegetal	(Perin <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. terrae</i>	Rizósfera y suelo	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Genes <i>nifH</i>	(Wong-Villarreal y Caballero-Mellado, 2010)
<i>P. tropica</i>	Endófito y rizósfera	<i>S. officinarum</i> , <i>L. esculentum</i> , <i>Zea mays</i>	Gen <i>acdS</i> , promotora de	(Reis <i>et al.</i> , 2004)

---

---

			crecimiento vegetal, genes <i>nifH</i> ,	
<i>P. unamae</i>	Raíz y rizósfera	<i>Zea mays</i> , <i>S. officinarum</i> , <i>Coffea arabica</i>	Gen <i>acdS</i> , promotora de crecimiento vegetal, genes <i>nifH</i> , degradación de fenol	(Coenye <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. xenovorans</i>	Rizósfera	<i>S. lycopersicum</i> , <i>Coffea arabica</i>	Gen <i>acdS</i> , genes <i>nifH</i>	(Goris <i>et al.</i> , 2004)

## 2.5 *Paraburkholderia* en México

En nuestro país también se han abordado investigaciones en torno al grupo *Burkholderia* sensu lato. Incluido el género *Paraburkholderia* identificando especies diazotróficas como *P. unamae*, *P. xenovorans*, *P. tropica*, y otras dos estrechamente relacionadas filogenéticamente con *P. kururiensis* aisladas de rizósfera y rizoplano de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivadas en Morelos y en el Estado de México; estas especies de *Paraburkholderia* fijadoras de N<sub>2</sub> exhibieron actividades relacionadas a biorremediación, promoción del crecimiento vegetal y control biológico *in vitro*. *Paraburkholderia tropica* también ha sido aislada de rizósfera, rizoplano y tejidos internos de maíz y de plantas de teocintle recolectadas de los estados de Guerrero, Veracruz, Morelos, Chiapas, Puebla y Oaxaca (Reis *et al.*, 2004).

En 2004 se describió por primera vez la especie *P. unamae* que fue seleccionada de un estudio taxonómico polifásico que incluía varias cepas aisladas de la rizósfera del maíz cultivado en campos de Tlayacapan, Morelos (Caballero-Mellado *et al.*, 2004). En Oaxaca se logró aislar a partir de suelo de un campo de maíz algunas *Burkholderia* sp. endófitas fijadoras de N<sub>2</sub>, y, además, se obtuvieron aislamientos identificados como *P. tropica* a partir de plantas de maíz en Tlayacapan, Morelos y Coatepec, Veracruz (Perin *et al.*, 2006).

También se han obtenidos aislamientos a partir de cuerpos de agua, como es el caso de la cepa *Burkholderia* sp. IMP5GC, aislada a partir de aguas termales de Los Azufres, Michoacán y que es capaz de crecer usando carbazol como fuente de carbono y nitrógeno (Castorena *et al.*, 2006).

En el Estado de Tamaulipas, Vacaseydel-Aceves (2012) realizó un estudio enfocado en la búsqueda del grupo *Burkholderia* (s.l) tomando en cuenta el tipo clima que iban desde seco, semiseco hasta húmedo y subhúmedo. Un aspecto interesante de resaltar en este trabajo fue la relación entre el pH del suelo, donde la mayoría de las muestras analizadas fue alcalino, obteniendo un total de 1461 aislados, de los cuales sólo cinco se confirmaron como *Burkholderia* aislados a partir de plantas de agave y maíz e identificados como *B. gladioli* y miembros del BCC, además de otras especies del género *Cupriavidus* siendo mayor el número de aislamientos de este último. En otro estudio realizado por Ormeño-Orrillo y sus colaboradores en el mismo año, aislaron la cepa *P. tuberum*. CCGE1002 a partir de un nódulo de *Mimosa occidentalis* recolectado en Tepic, Nayarit.

### III. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de investigación, Antonio-Flores (2015) y Vega-Aguilar (2016) realizaron su trabajo de tesis con el aislamiento e identificación parcial de cepas del grupo *Burkholderia* sensu lato en el Estado de Puebla.

Los muestreos se realizaron en las localidades de La Paz Tlaxcolpan, San José del Rincón y San Miguel Atlapulco (24°48'59''N y 107°22'41''O) con valores de pH entre 5.2 a 7.3. En el municipio de Chignahuapan (19 ° 50'00''N y 98 ° 02'00''O) con valores de pH de 5.1 a 5.8, con excepción de las muestras de agua de la Presa la Luz y la Laguna de Chignahuapan, los cuales mostraron valores alcalinos. En la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, en los Municipios de Tenampulco, Tlatlauquitepec y Cuetzálan y finalmente en San Miguel Zoapan, Municipio de Tlachichuca "Volcán Citlaltepētli".

Las regiones que se tomaron de acuerdo con el tipo de clima en conjunto de los dos trabajos de tesis son: cálido subhúmedo, templado subhúmedo, seco-semiseco, templado húmedo y cálido húmedo. La colección de muestras proviene de la rizósfera de diferentes plantas de interés agrícola como: maíz, papa, alfalfa, haba, maguey, nopal, plátano, café, blueberry, conocido como arándano, ajo, chile canario, nuez, naranja. Asimismo se obtuvieron muestras rizosféricas de plantas silvestres tales como helechos, pastizales, bromelias, pinos, encinos y leguminosas, cabe aclarar que en la totalidad de los aislamientos las plantas estaban sanas. Además de las muestras de cuerpos de agua (Embalse de Valsequillo, laguna de Chignahuapan y presa La Luz en el municipio de Chignahuapan).

A raíz de éste estudio, Antonio-Flores reportó 338 aislados obteniendo 86 cepas con posibilidad de pertenecer al grupo *Burkholderia* sensu lato. Así mismo, el trabajo de tesis de Vega-Aguilar reportó 278 aislados, de los cuales finalmente 10 cepas fueron identificadas como *Burkholderia* spp. Esto se logró mediante la comparación por morfología con cepas tipo en medios de cultivos selectivos y producción de pigmentos y el uso de herramientas moleculares, como la amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos semi-específicos (Bergmark *et al.*, 2012) que amplificaron un fragmento del gen ribosomal 16S y mediante perfiles de análisis ARDRA (Amplified rDNA -Ribosomal DNA- Restriction Analysis).

Posteriormente, Cervantes-Álvarez (2016) realizó el estudio de los 96 aislamientos con potencial de pertenecer al género *Burkholderia* obtenidos por Antonio-Flores (2015) y Vega-Aguilar (2016) para buscar especies con probable

potencial de fijar nitrógeno, especies que pertenecieran al grupo “*Burkholderias del complejo cepacia*” y un tercer grupo enfocado a tres especies patógenas de plantas: *B. gladioli*, *B. plantarii* y *B. glumae*. Esta búsqueda fue realizada con un grupo o “set” de oligonucleótidos dirigidos hacia diferentes genes de mantenimiento o metabólico. Además de la secuenciación y el análisis filogenético del gen ribosomal 16S confirmando los valores de diversidad entre los tres grupos.

Como resultado se obtuvieron un total de 46 cepas pertenecientes al grupo *Burkholderia* sensu lato, de las cuales **GB45, GB51, GB53, GB62, GB152, GB190 y GB203**, que forman parte del trabajo de tesis de Antonio-Flores (2014), se relacionaron con *Paraburkholderia sediminicola* y *Paraburkholderia aspalathi*, aisladas de sedimento de agua dulce y de nódulos de raíces de una leguminosa, respectivamente (Mavengere *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2008). Incluso, estas siete cepas fueron candidatas como posibles especies diazotróficas al obtener el amplificado de 1025 pb con los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R (Perín y col., 2006)

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

El grupo *Burkholderia* sensu lato comprende un número extenso y creciente de especies que han sido incorporadas y descritas a través de estudios de taxonomía polifásica. Hasta ahora 122 especies han sido reportadas por su capacidad de colonizar y establecerse en diferentes hábitats permitiendo la identificación de éstas en diversos países del mundo. Sin embargo se observa que son limitados los reportes de aislados o especies identificadas como nuevas en los diferentes estados de México.

Por un lado, considerando la diversidad climática de México, y en específico con la que cuenta el Estado de Puebla, y por el otro, la existencia de pocos estudios que evidencien la presencia del grupo asociado a un mayor número de plantas de interés agronómico, impulsan este trabajo de tesis a ampliar el conocimiento, con la finalidad de elucidar que ciertas especies no solo son propias de cuerpos de agua o asociadas a gramíneas. Por lo anterior, se plantea reforzar y aportar en el conocimiento de su presencia e identificación a través de una taxonomía preliminar de estas siete cepas miembros del grupo *Burkholderia* sensu lato del Estado de Puebla, en especial la del género *Paraburkholderia* al comprender un grupo diverso de bacterias de importancia biotecnológica en el campo de la agrobiotecnología, biotecnología ambiental y control biológico, impulsando a nuevos estudiantes de nivel superior y colaboradores a integrarse a este proyecto.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

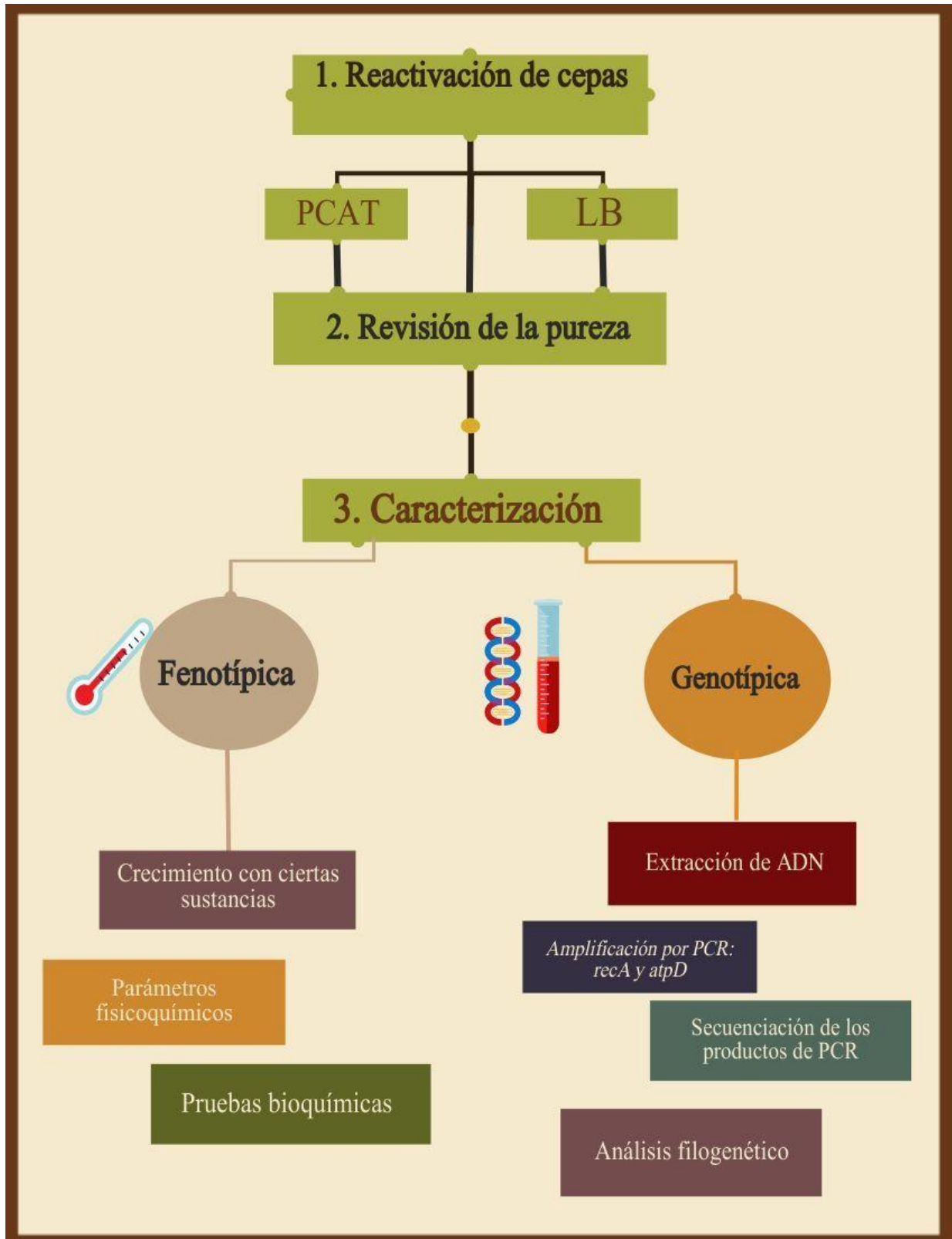
Caracterizar fenotípica y genótipicamente siete cepas del grupo *Burkholderia* sensu lato a través de un estudio taxonómico polifásico preliminar.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el crecimiento de las cepas rizosféricas de acuerdo con algunos parámetros fisicoquímicos.
2. Conocer parcialmente el metabolismo de las cepas rizosféricas mediante una batería de pruebas bioquímicas.
3. Determinar el grado de tolerancia a metales pesados de las cepas rizosféricas.
4. Evaluar la resistencia antibiótica de las cepas rizosféricas.
5. Identificar a las cepas a partir del análisis filogenético del gen 16S y de los genes *housekeeping*: *recA* y *atpD*.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 Esquema del trabajo



## 6.2 Reactivación de cepas y revisión de la pureza

A cada una de las siete cepas aisladas de rizósfera de árboles maderables como el pino, y plantas silvestres como helecho y bromelias, se les asignó la nomenclatura para su mejor identificación (Tabla 2).

**Tabla 2.** Aislamiento y código de identificación de las siete cepas reactivadas

Cepa	Zona geográfica	Origen	Clima	pH (suelo)	Altitud
GB45	Chignahuapan	Rizósfera de helecho ( <i>Filicopsida</i> )	Templado subhúmedo	5.51	2290
GB51	Chignahuapan	Rizósfera de helecho ( <i>Filicopsida</i> )	Templado subhúmedo	5.51	2290
GB53	Chignahuapan	Rizósfera de helecho ( <i>Filicopsida</i> )	Templado subhúmedo	5.51	2290
GB62	Chignahuapan	Rizósfera de helecho ( <i>Filicopsida</i> )	Templado subhúmedo	5.51	2290
GB152	Chignahuapan	Rizósfera de bromelia ( <i>Bromelia</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	2290
GB190	Chignahuapan	Rizósfera de pino ( <i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
GB203	Chignahuapan	Rizósfera de pino ( <i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290

Para la reactivación se prepararon dos tipos de medios de cultivo; un medio básico, Luria Bertani (LB), y un medio selectivo para el género *Burkholderia*, *Pseudomonas cepacia* ácido azelaico triptamina (PCAT). Se sembró por duplicado cada una de las cepas en medio LB y PCAT y se dejó crecer por 48 horas a una temperatura de 30°C. Para conocer la pureza de las cepas se realizó una descripción macroscópica a través del estereoscopio de la morfología de la colonia, tamaño, y color acompañada de registros fotográficos.

Para cada una de las pruebas fue necesario realizar “preinóculos” de las siete cepas en estudio a partir de una colonia de las cepas puras obtenidas, dejando crecer de 24-48 horas en 3 mL de medio caldo nutritivo (NB) o en placas de NB de acuerdo al tipo de ensayo.

### **6.3 Caracterización fenotípica**

#### **6.3.1 Requisitos de crecimiento**

##### **6.3.1.1 Prueba de temperatura**

Se colocó una muestra del preinóculo en los tubos que contenían 3 mL de medio NB y se sembró en placas con 20 mL de NB con agar (15 g/L) por triplicado y todo previamente esterilizado. Las temperaturas a las cuales se llevó a cabo el ensayo fueron de 35 y 39°C incubadas por 5 días, aquellos que presentaban turbidez o formación de colonias que caracterizan al género eran reportados como positivos.

##### **6.3.1.2 Prueba de pH**

Para el crecimiento a diferentes tipos de pH se inoculó en 3 mL de medio NB y sembradas en placas con 10 mL de medio NB con agar a un pH 4, 6 y 7 a 32°C. El pH fue ajustado antes de la esterilización usando NaOH y HCl al 10%.

Cada cepa se sembró por triplicado en tubo y en placa en cada una de las tres condiciones de pH establecido, para obtener resultados seguros se contó con un control sin ajuste de pH. Se llevó a cabo por 72 h y aquellos que presentaban turbidez o formación de colonias que caracterizan al género eran reportados como positivos.

### **6.3.1.3 Prueba de salinidad**

La prueba se realizó a concentraciones de 1%, 2% y 3% de NaCl en tubos con 3 mL de NB. Esto se realizó por triplicado para cada cepa en cada una de las concentraciones de NaCl establecidas y el control comprendía solo el medio NB sin NaCl. El ensayo se llevó a cabo por 3 días en el cual se observó turbidez, reportándose como positivo.

## **6.3.2 Pruebas bioquímicas**

### **6.3.2.1 Catalasa**

Se tomó el centro de una colonia pura de un cultivo de 48 h y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio limpio utilizando un palillo de madera estéril, con ayuda de una micropipeta se colocó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en las bacterias colocadas.

### **6.3.2.2 Oxidasa**

Se llevó a cabo por tiras Bactident Oxidase preparadas para la detección de la citocromo-oxidasa. Se tomó una colonia aislada y sobre la zona cuadrada de la tira con un palillo de madera estéril se colocó.

Se esperó 30 segundos y después se observó el color de la zona inoculada.

### **6.3.2.3 Prueba Lisina Hierro Agar (LIA)**

Se llenaron tubos con medio de cultivo LIA estéril, todavía líquidos se colocaron en una posición inclinada, de tal forma que se formara una capa de aproximadamente 3 cm. y una superficie inclinada, técnica conocida como llenado en pico de flauta. El medio de cultivo se dejó solidificar en la posición lograda.

A partir de un cultivo puro de las cepas en estudio se tomó una colonia y mediante el uso de aguja de inoculación, se inoculó el medio de cultivo; picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo, dejando como control tubos con medio LIA sin inocular, y se incubaron a 32°C con revisión de 18-24 h.

#### **6.3.2.4 Prueba Agar Hierro-Triple azúcar (TSI)**

Se esterilizaron tubos de vidrio los cuales se llenaron con medio de cultivo TSI, todavía líquidos se colocaron en una posición inclinada, de tal forma que se formara una capa de aproximadamente 3 cm. y una superficie inclinada, técnica conocida como llenado en pico de flauta. El medio de cultivo se dejó solidificar en la posición lograda.

A partir de un cultivo puro de las cepas en estudio se tomó una colonia y mediante el uso de aguja de inoculación, se inoculó el medio de cultivo; picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo, dejando como control tres tubos con medio TSI sin inocular, y se incubaron a 32°C con revisión de 18-24 h.

#### **6.3.2.5 Oxidación de D-gluconato**

Se preparó medio caldo gluconato peptona y se calentó por 2 min para disolver el medio completamente. Posteriormente, se colocaron 3 mL en tubos de vidrio con tapón de rosca y se esterilizó en autoclave a 15 lbs de presión (121°C) durante 15 minutos.

Se inoculó el medio con el crecimiento de un cultivo puro dejando incubar a 32°C durante 48 horas. Posteriormente, se agregó 1 mL de reactivo Benedict, colocando el tubo en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y se observó la producción de un precipitado coloreado de óxido cuproso.

#### **6.3.2.6 Asimilación de carbohidratos**

El medio de cultivo utilizado fue rojo fenol (como indicador de pH) suplementado con el carbohidrato mediante la técnica de llenado en pico de flauta. Las fuentes de carbono utilizadas fueron D-manosa y D-sorbitol.

La asimilación de carbohidratos se determinó por el cambio de color en una o ambas regiones del tubo, lo cual indica acidificación (color amarillo) o alcalinización (color rojo) en la correspondiente región del tubo dejando incubar durante 2 días.

Para la prueba de citrato se utilizó el medio de citrato de Simmons el cual se distribuyó en 40 tubos con 2.5 mL en cada tubo y posteriormente

se esterilizó a 121°C, 15lb, durante 15 min., dejando solidificar de manera que el pico de flauta fuera más largo y el extremo inferior corto. Se tomó un inóculo liviano a partir de un cultivo puro de 24 h a 48 h en agar NB y se estrió sólo en el pico de flauta de manera serpentina incubando por 24 h a 32°C.

### 6.3.2.7 Actividad hemolítica

Para evaluar la actividad hemolítica de las seis cepas se sembraron en Base de Agar Sangre suplementado con sangre humana; y se incubaron a 32°C durante 24 a 72 horas.

## 6.3.3 Pruebas basadas en el crecimiento a ciertas sustancias

### 6.3.3.1 Crecimiento a metales

Se ensayó el crecimiento a los siguientes metales: Co ( $\text{CoCl}_2$ ), Mo ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ), V ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), Ni ( $\text{NiCl}_2$ ), Pb ( $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) y Zn ( $\text{ZnCl}_2$ ). Las concentraciones fueron para Co, Zn y V de 25, 50, 100, 200 ppm; para Pb, Ni y Mo de 25, 50, 100, 200, 250 y 300 ppm. Los ensayos se realizaron en agar NB suplementado con el metal. Se colocó una gota de 5  $\mu\text{l}$  de cada uno los siete inóculos en placas que contenían cada una de los metales por duplicado dejando incubar durante 4 días a 35°C.

### 6.3.3.2 Crecimiento a antibióticos

Se preparó un volumen de 950 mL de medio nutritivo con agar (15 g/L) y se colocó en la parrilla para que se homogenizara (dejando hervir por un minuto), y se esterilizó a 121°C/15 min, junto con tubos cónicos de 50 mL. Una vez esterilizados los tubos, se colocó un volumen de 35 mL del medio y se dejó enfriar a temperatura ambiente para poder colocar el antibiótico, después se agitó con vortex durante 15 s para homogenizar el antibiótico y se vertió en las dos placas previamente etiquetadas con el antibiótico indicado. Se dejó solidificar y se sometió a prueba de esterilidad (30°C).

Los inóculos (5 mL) se ajustaron a  $10^8 \text{UFC/mL}$  a una D.O.  $_{600 \text{ nm}}$  junto con la cepa control: *P. putida* KT2440. Para ello se tomó un 1 mL del inóculo y se colocó en microtubos, se centrifugó y se lavó con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [10 Mm]. Los botones celulares quedaron resuspendidos en

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O [10 Mm] posteriormente se colocó una gota de 5 µl de cada cepa. Las siete cepas + control se encontraban en una placa, y se realizó por duplicado. Dejando Incubar a 30°C y durante 5 días.

Se ensayó la resistencia a los siguientes antibióticos:

**i. Ampicilina**

10, 20, 50, 100 y 150 µg/mL

**ii. Cloranfenicol**

1, 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/mL

**iii. Gentamicina**

1, 2.5, 5 y 7.5 µg/mL

**iv. Tetraciclina**

2.5, 5, 10, 15, 20 µg/mL

**v. Kanamicina**

1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 20 µg/mL

## 6.4 Caracterización genotípica

### 6.4.1 Extracción del DNA genómico de las cepas

El ADN genómico se extrajo utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Una vez extraído y purificado el ADN<sub>g</sub> de cada aislado se reveló en gel de electroforesis al 1.0% de agarosa usando RedGel con ayuda de un Transiluminador UV. Posteriormente, se determinó la concentración y pureza del DNA con el equipo NanoDrop.

### 6.4.2 Amplificación de los genes *recA* y *atpD*

Para amplificar los genes de mantenimiento *recA* y *atpD* se utilizaron los primers descritos en la Tabla 3. La reacción consistió en 1 µl de ADN molde (26 ng) y una alícuota de 9 µl de la mezcla de PCR, que contenía buffer 1x, dNTP's 2 mM, 1 µl de cada cebador, y 1.25U de DreamTaq DNA Polimerasa (Thermo Scientific™). Las condiciones del ciclo térmico para la PCR fueron las siguientes: 95°C por 6 min; 29 ciclos de 94°C por 40 seg, seguido por la temperatura de alineamiento por 50 s y una extensión de 72°C por 1 min, y una extensión final de 75°C por 9 min. Finalmente se verificó la amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa teñido con

bromuro, y luego, se procedió a cortar la banda correspondiente al tamaño del amplicón.

**Tabla 3.** Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento (T<sub>m</sub>) para la amplificación de los genes *recA* y *atpD* para especies que pertenecen al grupo de *Burkholderia sensu lato*

Gen	Secuencia 5'- 3'	Tamaño del amplicón (bp)	Temperatura de alineamiento (°C)	Referencia
<i>recAF</i>	AGGACGATTCATGGAAGA WAGC	~704	58	(Spilker y col., 2009)
<i>recAR</i>	GACGCACYGAYGMRTAGA ACTT			
<i>atpDF</i>	ATGAGTACTRCTGCTTTGGTAG AAGG	~756	56	(Spilker y col., 2009)
<i>atpDR</i>	CGTGAAACGGTAGATGTT GTCG			

#### 6.4.3 Purificación del producto de PCR a partir de un gel de agarosa

Se colocó el fragmento en un microtubo de 1.5 mL que fue previamente pesado para saber el peso del gel que contiene el producto de nuestro interés. Luego, se agregaron tres volúmenes de NaI 6 M con respecto al peso del gel, los cuales se incubaron a 65°C por 10 minutos (hasta que el gel se fundió). Se agregaron 10 µL de suspensión de sílica, esta preparación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos con agitaciones esporádicas para la resuspensión de las partículas de sílica.

Después se centrifugó la preparación para descartar posteriormente el sobrenadante y conservar la pastilla, ésta se sometió a tres lavados con solución “New Wash” 1X con tiempo de centrifugación de 1 minuto entre cada ciclo de lavado. Finalmente la pastilla se sometió a proceso de secado retirando la mayor parte posible de líquido y posteriormente colocado a una temperatura de 37°C durante una hora aproximadamente o hasta que la pastilla se desprendiera del fondo del tubo. Una vez seca la pastilla se resuspendió con 30 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas, se

centrifugó por última vez durante 3 minutos para separar el sobrenadante colocándolo en un tubo nuevo y limpio para la posterior medición de la concentración de DNA en NanoDrop y se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro.

#### **6.4.4 Secuenciación de productos purificados**

La secuenciación se llevó a cabo en la empresa MacroGen Korean (<https://dna.macrogen.com/esp/>). Por lo cual, cada reacción para la secuenciación contenía 50 ng/ul en un volumen final de 30 ul por muestra de ADN, y por separado 10 pmoles del oligonucleótido. Mientras las secuencias del gen ARNr 16S fueron obtenidas a partir de los estudios realizados por Cervantes-Álvarez (2016).

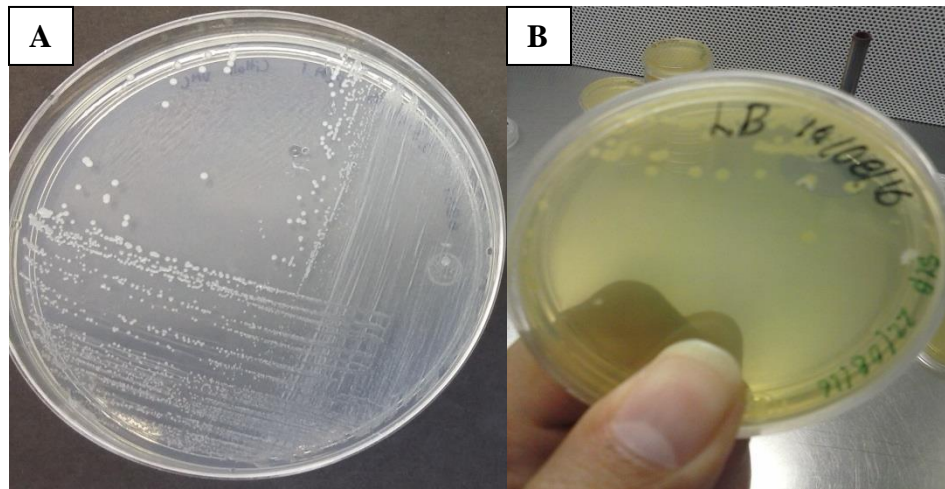
#### **6.4.5 Análisis y Construcción de los árboles filogenéticos**

Una vez obtenido los cromatogramas de las secuencias en sentido Forward y Reverse de cada cepa se analizaron en el programa BioEdit ver. 7.2.5. obteniendo la secuencia consenso. Posteriormente las secuencias consenso fueron comparadas mediante un análisis BLASTn con las secuencias contenidas en la librería de nucleótidos del GenBank. Las secuencias generadas por las cepas de estudio, así como las de las cepas tipo se alinearon y editaron utilizando el programa BioEdit ver. 7.2.5., ClustalX 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) y GenDoc 2.7.

Las alineaciones individuales se concatenaron utilizando DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009) con los parámetros establecidos. Los árboles filogenéticos fueron contruidos mediante el método Neighbor-Joining con base en distancias Maximum Composite Likelihood y por el método de Máxima Verosimilitud mediante el modelo de Tamura-Nei usando 1,000 réplicas de arranque con el programa MEGA v7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016).

## VII. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Las colonias cultivadas en medio sólido PCAT y LB para la reactivación, y NB durante las pruebas, presentaron una morfología colonial blanca, cremosa y puntiforme (Figura 4). Estas características reportadas por Lim *et al.* (2008) y Mavengere *et al.* (2014) son similares para el caso de *Paraburkholderia sediminicola* y *Paraburkholderia aspalathi*, respectivamente. En el caso de GB190 además de presentar estas tres características, se observó un halo transparente alrededor de la colonia.



**Figura 4.** Colonias de color blanco cremoso y mucoide en medio PCAT (A) y medio LB (B)

A continuación se muestran los resultados de las pruebas realizadas de las siete cepas en estudio. En el caso de *P. aspalathi* y *P. sediminicola* son los reportados de artículos (Anexo I).

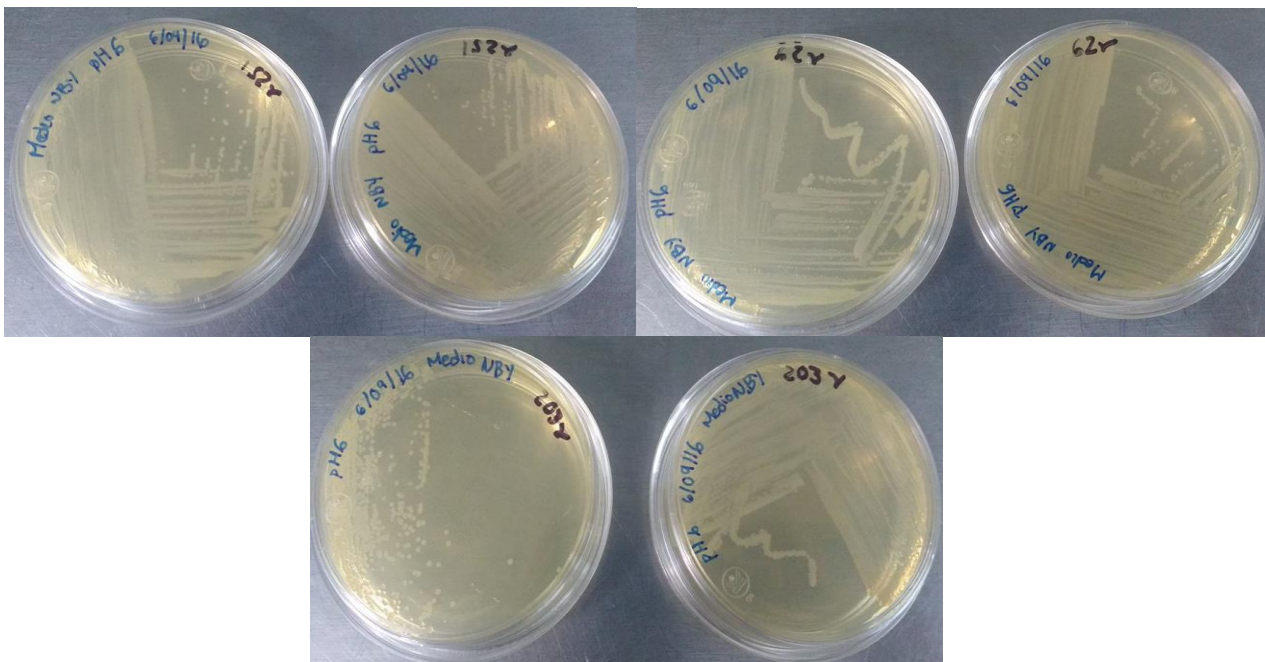
Para el ensayo de temperatura se observó que después de cuatro días sólo seis cepas presentaron ligero crecimiento a 39°C menos la cepa GB190. Por lo cual, la temperatura para un crecimiento óptimo en todas las cepas fue a 35°C el cual se observó después de 48 horas. Comparado estos resultados con *P. sediminicola* el rango de temperatura para el crecimiento es de 15-30°C; no presenta crecimiento a 42°C (Lim *et al.*, 2008). Mientras que la temperatura para un crecimiento óptimo en *P. aspalathi* es de 20-30°C, sin embargo se reporta un crecimiento moderado a 37°C y sin crecimiento a 45°C (Mavengere *et al.*, 2014). Como resultado de esto es posible

que las cepas crezcan mejor a una temperatura de 35°C considerando el lugar de donde fueron aislados que oscila entre los 23-24°C un ambiente ideal para bacterias mesófilas en el suelo. Además, se observó que entre más alta la temperatura, la bacteria tarda más en crecer, se interfiere que las bacterias pueden sobrevivir, pero por un tiempo no hay división, después de un tiempo de adaptación hay una recuperación y comenzaría de nuevo la división. Como en el caso de *B. pseudomallei* las temperaturas altas inducen cambios en las enzimas metabólicas, chaperonas, proteínas de movilidad celular, antioxidantes y proteínas estructurales ocasionando cambios en las fases de crecimiento (Paksanont *et al.*, 2018). Razones por las cuales, la temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en la proliferación y mantenimiento de la vitalidad de los microorganismos. Dicho lo anterior, cada microorganismo tendrá su propia temperatura mínima por debajo de la cual no podrá proliferar, una temperatura óptima para su crecimiento, casi siempre relacionada con la temperatura de su hábitat y temperatura máxima por encima de la cual no podrá multiplicarse (Marchand, 2002; Madigan *et al.*, 2015).

En cuanto al ensayo de NaCl al 1% sólo se observó crecimiento moderado de las cepas GB45, GB53, GB62, GB152 y GB203 después de las 48 horas, pero no en GB51 y GB190. A una concentración al 2% se tiene que sólo GB62 y GB203 presentaron un ligero crecimiento, a partir de una concentración al 3% ya no hay proliferación celular de ninguna de las siete cepas. Por lo tanto, el mejor crecimiento se obtiene sin NaCl en todas las cepas. Comparando con otras especies, se reporta que en *P. sediminicola* es posible el crecimiento en presencia de NaCl al 1.5% incubada a 28°C (Lim *et al.*, 2008), para *P. aspalathi* en una concentración del 1% al 10% (Mavengere *et al.*, 2014), para *P. sartisoli* a una concentración de 0.5% (Vanlaere *et al.*, 2008) sin embargo el crecimiento óptimo es en ausencia de NaCl para estas tres especies así como para las siete cepas estudiadas. Hasta ahora la relación que existe entre las diferentes concentraciones de sal y el crecimiento de los microorganismos, tiene que ver con el funcionamiento de las enzimas, ya que son las principales afectadas o beneficiadas. Las condiciones que permiten a una enzima funcionar vigorosamente pueden también conferirle una importante vía de inactivación; algunas enzimas son estables bajo ciertas condiciones; sin embargo, otras se inhiben severamente afectando el crecimiento celular. Así, la isocitrato deshidrogenasa de un halófilo es muy estable, pero se inhibe fuertemente por 4 o 5 M de NaCl (González-Hernández y Peña, 2002)

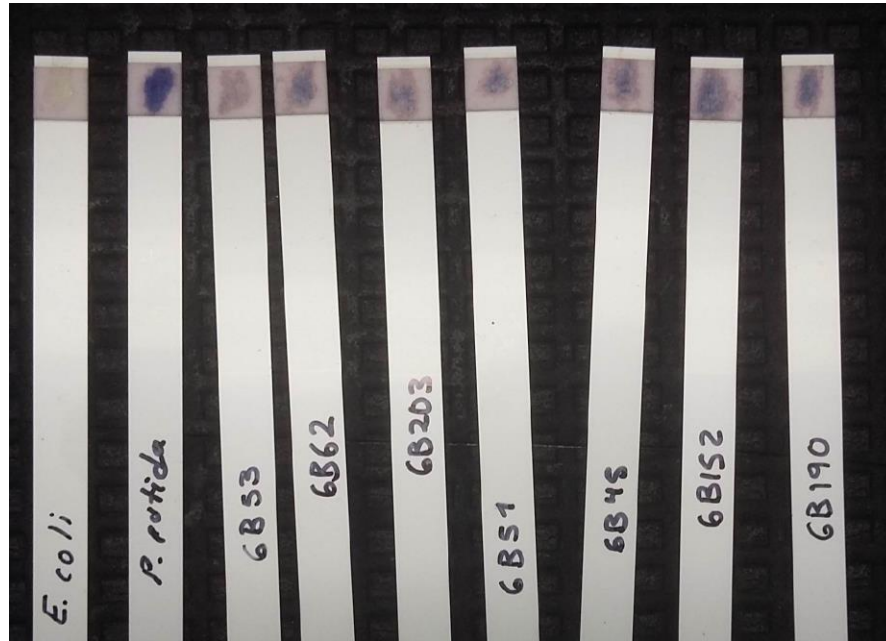
Otra característica importante para estudiar el crecimiento de bacterias en presencia de NaCl es la búsqueda de genotipos bacterianos tolerantes a la salinidad para solucionar los problemas que ocurren con la fijación biológica de nitrógeno (Pereira *et al.*, 2012). Pereira *et al.* (2012) demostraron que altas concentraciones de NaCl, por encima de 10g/L, influyen negativamente el crecimiento bacteriano de *Burkholderia gladioli* y *Paraburkholderia heleia* asociadas a plantas de caña de azúcar cultivadas en Pernambuco, a pesar de que *B. gladioli* presentó más tolerancia a la salinidad que *P. heleia*. También observaron que influye negativamente en la producción del ácido indol acético *in vitro* y que a concentraciones de NaCl por encima de 25 g/L inhibe la capacidad de fijar nitrógeno *in vitro* tanto para *B. gladioli* y de *P. heleia*.

El pH es también un factor muy importante en el metabolismo y la reproducción de las bacterias, ya que la variación en éste puede llegar a inactivar el sistema metabólico y destruir a la bacteria. En el ensayo de pH 4 sólo no se observó crecimiento de dos cepas: GB53 y GB190. En pH 8 crecen todas las cepas pero el crecimiento óptimo se registró en un pH 6 (Figura 5). Con respecto a *P. sedimicola* se ha publicado que las células crecen en un rango de pH 6.0-8.0 y en el caso de *P. aspalathi* se reporta crecimiento en un rango de pH 4-8 a 28°C. Pero en ambos casos se obtiene un crecimiento óptimo a pH 6 y 7. El pH óptimo para el crecimiento de un organismo se refiere únicamente al ambiente *extracelular*; ya que el pH *intracelular* debe permanecer cerca de la neutralidad para impedir la destrucción de las macromoléculas como el DNA, que es lábil frente al ácido, de manera que la célula tiene que mantener esta macromolécula fundamental en un estado estable (Madigan *et al.*, 2015). Existen reportes de aislamientos de *Paraburkholderia* a partir de rizósfera con pH ácido, tales como *P. tropica*, especie aislada en el rango de pH 4.5 a 6.5 (Reis *et al.*, 2004) y *P. unamae*, la cual fue aislada de la rizósfera en un rango de pH de 4.5 -7 (Caballero *et al.*, 2004). Recientemente, *P. acidipaludis* y *P. heleia* fueron aisladas a partir de la planta *Eleocharis dulcis*, la cual crece en pantanos altamente ácidos (pH 2-4) (Aizawa *et al.*, 2010). Por ende, es posible que un determinado rango de pH favorezca el establecimiento de ciertas especies pertenecientes al género.



**Figura 5.** Crecimiento óptimo bacteriano en medio nutritivo ajustado a pH 6 de las cepas GB152, GB62 y GB203.

La prueba de oxidasa (Figura 6) y catalasa resultaron positivo en las siete cepas al igual que *P. sediminicola* y *P. aspalathi*, por lo cual existe la enzima citocromo c oxidasa capaz de catalizar la transferencia de electrones desde el citocromo c al oxígeno terminal para formar agua. Y por medio de la enzima catalasa se lleva a cabo la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua. La catalasa es una enzima que caracteriza a la mayoría de las bacterias aerobias la cual presentan las siete cepas.



**Figura 6.** Prueba de oxidasa positiva; *E.coli* (control negativo) y *P. putida* (control positivo)

Por otra parte, en la prueba bioquímica de agar lisina hierro resultaron negativas para la descarboxilación y desaminación de la lisina. No obstante, las descarboxilasas han adquirido un significado especial gracias a sus propiedades fisiológicas. Este tipo de enzimas se clasifican en dos grupos independientes: enzimas constitutivas o inducibles (López Revelles, 2005). Por lo cual, algunos microorganismos son capaces de provocar la descarboxilación de los aminoácidos, el resultado de esta descarboxilación es la producción de una amina (o diamina) y dióxido de carbono. Tal es el caso de la producción de la enzima lisina descarboxilasa la cual al actuar sobre la lisina produce la diamina cadaverina. En el medio LIA se va a detectar la producción de la lisina descarboxilasa ya que se produce una reacción coloreada por un cambio en el pH del medio, que contiene como indicador púrpura de bromocresol. Un cambio del color original del medio (morado) hacia amarillo en el fondo indica una reacción ácida por la fermentación de una pequeña cantidad de glucosa en el medio. Si el microorganismo posee la lisina descarboxilasa, la acción de esta enzima sobre la lisina dará lugar a la cadaverina, la cual provocará un cambio de pH hacia la alcalinidad dando un color morado que sobrepasa la acidez debida a la glucosa lo que se consideraría como enzimas inducibles. A pesar de que las cepas no fermentaron la glucosa, no se puede asegurar que realmente no hubo descarboxilación de la lisina ya

que dentro de este grupo de organismos existe una gran variabilidad de rutas para el catabolismo de lisina, teniendo incluso que distinguir entre aerobiosis y anaerobiosis. Como es el caso de *Pseudomas putida* que puede suceder mediante enzimas constitutivas (que están presentes en un bajo nivel de expresión) (López Revelles, 2005).

En cuanto a la prueba TSI no se observó fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa por parte de algunas de las cepas, en el caso de *P. aspalathi* lleva acabo la oxidación de glucosa de manera aeróbicamente pero no anaeróbicamente en medio oxidativo-fermentativo. Esta prueba es usada principalmente para la identificación de bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y observar la fermentación de los carbohidratos descartando la posibilidad de que alguna de estas cepas perteneciera a esta familia (Mahon *et al.*, 2007). Mientras que la asimilación de d-manosa, d-sorbitol tampoco se llevó acabo ni la oxidación de d-gluconato. Solo fueron capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono para su metabolismo, provocando alcalinidad, considerando que su metabolismo prefiera más ácidos orgánicos y aminoácidos que azúcares.

La Base de Agar Sangre es adecuada para aislar y cultivar diversos microorganismos de difícil crecimiento y posibles bacterias dañinas a la salud humana. Al añadir sangre, puede usarse para mostrar la actividad hemolítica debido a que los microorganismos hemolíticos liberan enzimas (hemolisinas) al medio que destruyen los glóbulos rojos apareciendo halos de hemólisis. Sin embargo, se observó ausencia de lisis de los glóbulos rojos ya que el medio no presentó modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio.

Por otra parte, en la prueba de mentales se observó que en níquel, cobalto, molibdeno y plomo hay crecimiento de las siete cepas hasta una concentración de 250, 50, 300 y 300 ppm, respectivamente (Anexo I; Tabla 6). Mientras tanto, en zinc y en vanadio sólo GB51 fue capaz de crecer después de dos días en una concentración de 200 y 50 ppm, correspondientemente. Existe diversos reportes sobre *Burkholderia* (s.l) capaces de crecer en metales pesados, como *Burkholderia* sp. J62 la cual fue la mejor solubilizando el plomo y el cadmio en cultivo en disolución (Jiang *et al.*, 2008).

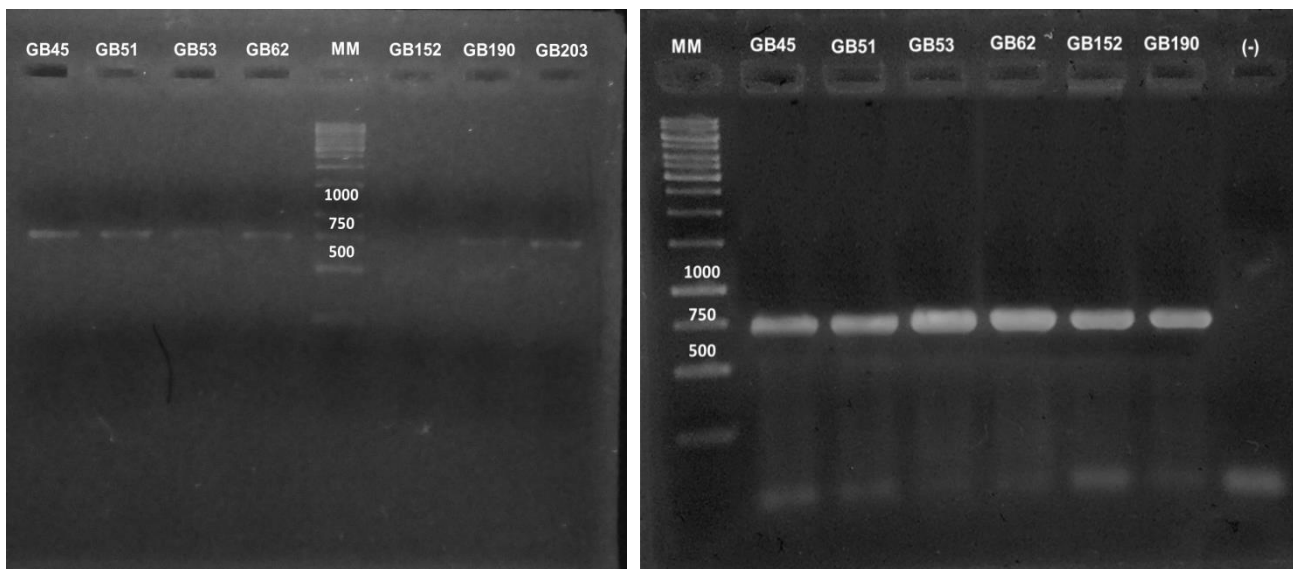
Otras especies que son capaces de inmovilizar metales pesados y reducir su translocación en las plantas mediante precipitación, formación de complejos y adsorción promoviendo el crecimiento en plantas. Por ejemplo, *Burkholderia gladioli*

en la mitigación del estrés por Cd en *Lycopersicon esculentum* (Khanna *et al.*, 2019) y *Burkholderia cepacia* CS2-1 que mejoró el crecimiento en *Brassica rapa* al disminuir la absorción de  $Zn^{+}$  indicando que es adecuada para la biorremediación (Kang *et al.*, 2017).

Existen diversos mecanismos en las bacterias a través de los cuales un sistema puede conferir resistencia a metales pesados; algunos están codificados en plásmidos y tienden a ser específicos para un metal en particular. También se han encontrado la producción de sustancias poliméricas extracelulares que se unen fuertemente a los metales. Los exopolímeros microbianos son particularmente eficientes en la unión de metales pesados, como plomo, cadmio y uranio, como es el caso de *Burkholderia cepacia* GYP1 que tiene una gran capacidad de acumulación para que el cadmio alcanzando 116 mg/g de biomasa (peso seco) al producir estas sustancias poliméricas extracelulares (Zhang, 2019).

Ciertos metales de transición como cobalto, cobre, níquel y zinc, a concentraciones traza (10-1 mmol/L), son esenciales para algunos procesos celulares, ya que ejercen funciones catalíticas en determinadas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, actúan como micronutrientes o cofactores enzimáticos, o pueden estabilizar estructuras proteicas (Nies, 2003) Sin embargo, a concentraciones superiores ejercen un marcado efecto citotóxico. Así mismo, las cepas GB45, GB53, GB152, GB190 y GB203 crecieron en Ampicilina a una concentración de 150  $\mu\text{g/mL}$ , estas cepas presentaron resistencia a ampicilina y cloranfenicol, y solo GB190 fue capaz de crecer en kanamicina y gentamicina (Anexo I; Tabla 7). Hasta el momento se cree que la primera línea de defensa contra los antimicrobianos en las especies de *Burkholderia* es la barrera de penetración de la membrana externa impermeable y por las proteínas efluentes eficientes (Quintilliani y Courvalin 1995).

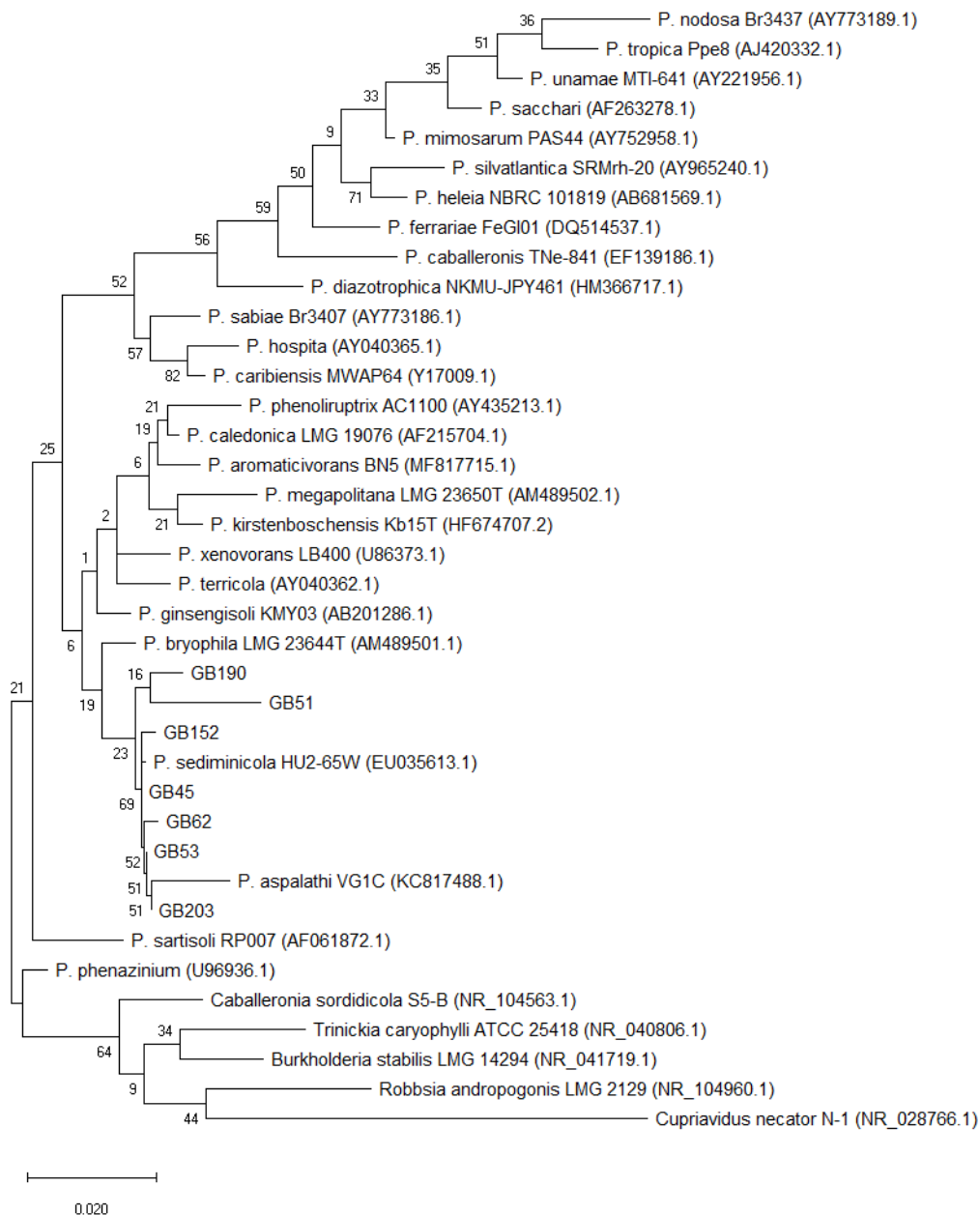
Por otra parte, la identificación genotípica de las siete cepas se verificó mediante la amplificación de los genes de mantenimiento: *recA* y *atpD* junto con la cepa control *Paraburkholderia unamae*, y la secuenciación. Cuando en la muestra se observaron bandas de 704 pb para *recA* y 756 pb para *atpD* se identificó como *Burkholderia* spp. que coincide con los resultados obtenidos por Spilker *et al.* (2009) (Figura 7).



**Figura 7.** Amplificación obtenida utilizando cebadores *atpDF* y *atpDR* (izquierda) y *recAF- recAR* (derecha).

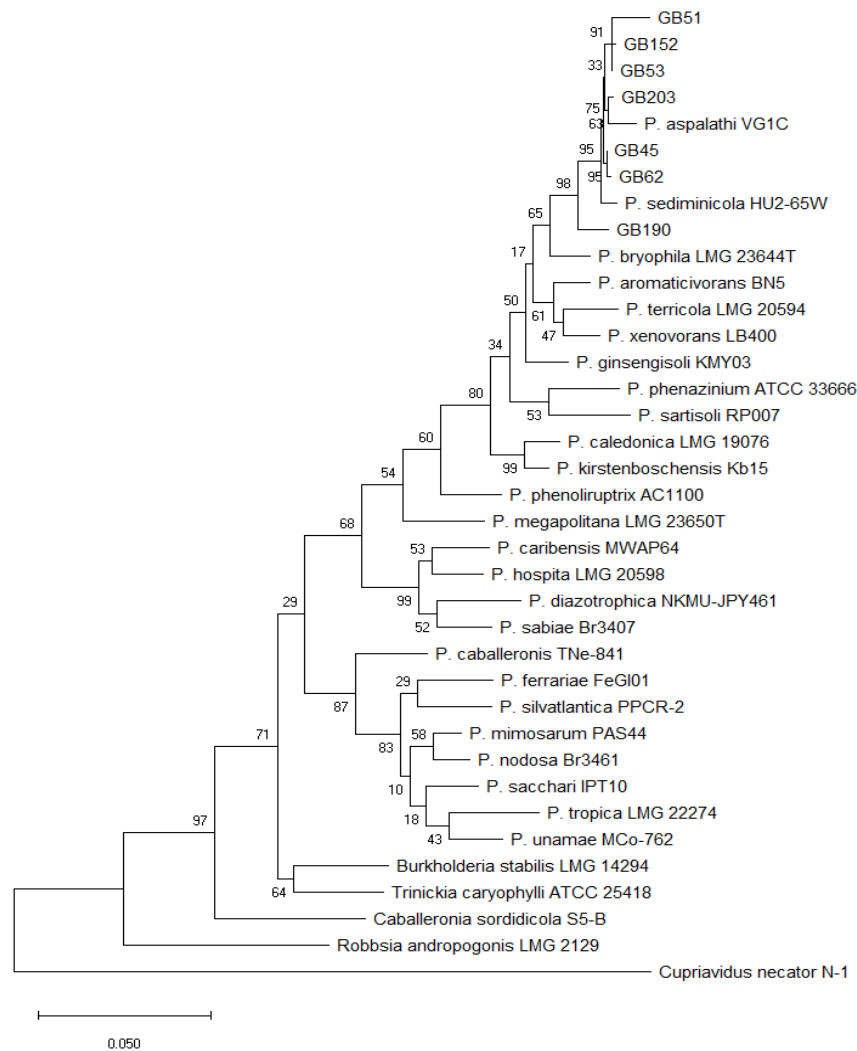
Al comparar por BLAST las secuencias del ARNr 16S de las siete cepas con la base de datos de nucleótidos de NCBI mostraron que eran similares a las especies del género *Paraburkholderia*. Por ejemplo, las secuencias del ARNr 16S de las cepas GB45, GB53, GB62, GB152 y GB203 compartieron entre el 100 y el 99.78% de identidad con *P. sediminicola*, y en menor porcentaje con otras especies descritas del género como es *P. aspalathi*. En cuanto a GB51 mostró identidad del 99.75% con otros aislados de la plataforma y con *P. caledonica* el 99.35%, así mismo, la cepa GB190 se alineó con otros aislados reportados como es la cepa RL18-085-BID-A con un porcentaje de identidad del 99.42%. Para determinar la relación general de las siete cepas de *Paraburkholderia* con otros miembros del género, se generó una filogenia del gen ARNr 16S (1120 pb), que incluía algunas de las especies del género válidamente nombradas (Fig. 8). Esto mostró que GB45, GB53, GB62, GB152 y GB203 forman un clúster estrechamente relacionado con *P. sediminicola* y *P. aspalathi*. Ahora bien, las cepas GB190 y GB51 formaron un linaje filético claramente distinto de las especies de *Paraburkholderia* estrechamente relacionadas dentro del género (Fig. 8). Se han observado altos valores con respecto a la identidad de nucleótidos del ARNr 16S en *Paraburkholderia* debido a la alta conservación de

este gen en el género (Lv *et al.* 2016; Bournaud *et al.* 2017; Huo *et al.* 2018). Sin embargo, a pesar de conservarse, fue posible observar que dos cepas formaron un grupo distinto en relación con las otras especies de *Paraburkholderia*.



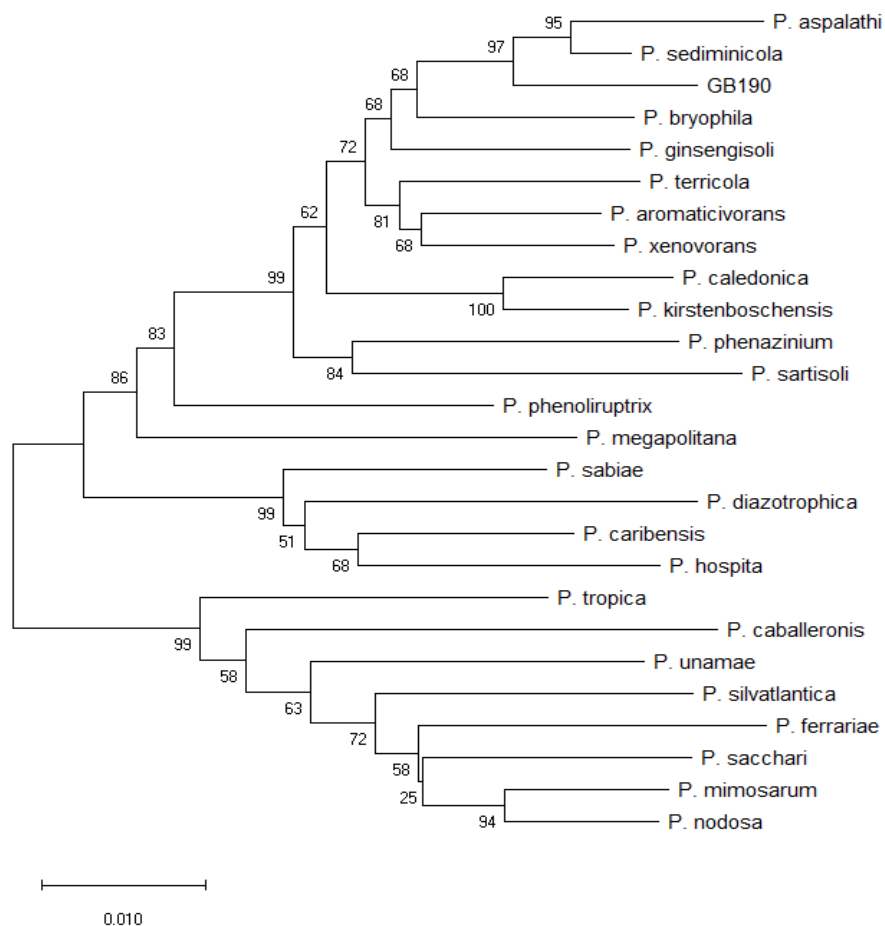
**Figura 8.** Filogenia por el método Máxima Verosimilitud basado en el gen ARNr 16S que muestran las relaciones de las cepas y otros miembros del género. Con Bootstrap de 1000 repeticiones. Enraizado con *Burkholderia stabilis*, *Trinickia caryophylli*, *Caballeronia sordidicola*, *Robbsia andropogonis* y *Cupriavidus necator*.

Considerando el menor poder de discriminación del gen ARNr 16S en el género *Paraburkholderia*, debido a que los organismos están tan cercanos genéticamente hablando unos de otros que solo, éste gen, no es suficiente para poder tener una resolución suficiente entre ellos. Procedimos con el análisis de los genes *recA* y *atpD*, que ha sido ampliamente adoptados en estudios filogenéticos y taxonómicos dentro de este género, incluida la reclasificación reciente de las especies ambientales de *Paraburkholderia* (Sawana *et al.* 2014; Dobritsa y Samadpour 2016). Al construir el árbol filogenético con las secuencias concatenadas parciales de los tres genes de mantenimiento; ARNr 16S, *recA* y *atpD* (2135 pb), las cepas GB45, GB53, GB62, GB152 y GB203, incluso GB51, se relacionaron estrechamente con *P. aspalathi* VG1C y *P. sediminicola* HU2-65W (Fig. 6). En cuanto a la cepa GB190 se observó fuera de este clúster aún, con un bootstrap del 98% (Fig. 9).



**Figura 9.** Filogenia por el método Máxima Verosimilitud basado en las secuencias de genes concatenados (16S rRNA + *recA* + *atpD*) (2135 pb) que muestran las relaciones de las cepas y otros miembros del género. Con Bootstrap de 1000 repeticiones. Enraizado con *Burkholderia stabilis*, *Trinickia caryophylli*, *Caballeronia sordidicola*, *Robbsia andropogonis* y *Cupriavidus necator*.

Para especificar solo las relaciones entre los taxones y GB190 se construyó un árbol mediante Neighbor- Joining sin enraizar, observando que esta cepa se mantiene exclusiva de las dos especies de *Paraburkholderia* (Fig. 10). La cepa GB190 presentó ciertas diferencias con las demás cepas, por ejemplo; a pesar de ser aislada de pino como GB203 no creció a una temperatura de 39°C y a un pH 4, pero fue la única cepa que creció en gentamicina y kanamicina, además, en su morfología se observa un halo transparente alrededor de la colonia durante su crecimiento.



**Figura 10.** Filogenia por el método Neighbor- Joining basado en las secuencias de genes concatenados (16S rRNA + recA + atpD) (2135 pb) que muestran la separación de GB190 con respecto de *P. sedimicola* y *P. aspalathi*. Con Bootstrap de 1000 repeticiones. Sin enraizar.

Como se mencionó anteriormente, en las últimas décadas han surgido numerosos estudios en torno al género *Paraburkholderia* ya que han sido aislados en todos los continentes. De hecho, las cepas de la misma especie se han recuperado de lugares distantes y de muy diferentes nichos. Tal como se presenta en este estudio, las cepas GB45, GB51, GB53, GB62 y GB152 que fueron aisladas de rizósfera de helecho, bromelia y pino, formaron un clúster más cercano con *P. sedimicola*, mientras que GB203 con *P. aspalathi*, las cuales fueron aisladas de sedimento de agua dulce y de nódulos de raíces de una leguminosa, respectivamente. Mientras que GB190 se colocó fuera de este grupo como se observó durante los análisis filogenéticos y el uso basado en herramientas moleculares. Otro punto a delimitar son los rasgos fisiológicos y bioquímicos, ya que los organismos estrechamente relacionados y aislados de diferentes ubicaciones pueden tener fisiologías y procesos metabólicos muy distintos, para elucidar algunas diferencias en esta parte de las cepas GB190 y GB203 con *P. sedimicola* y *P. aspalathi*, fue posible mediante los ensayos de NaCl donde se observó que GB190 es distintas de las especies tipo, así mismo, en la prueba de pH GB190 sigue mostrando diferencias al no crecer en pH 4 como lo hacen GB45, GB51, GB62, GB152 y GB203 (Tabla 4). Cabe mencionar que GB203 presenta un patrón similar a *P. aspalathi* que incluye la prueba de pH y NaCl. Pero es la prueba de manosa y d-gluconato que se emparejan con *P. sedimicola* al ser negativas para ambas pruebas (Tabla 4).

**Tabla 4.** Aspectos comparativos de GB190 y GB203 con respecto a *P. sedimicola* y *P. aspalathi*

Código de Cepas y fuente de aislamiento / Pruebas	<i>P. sedimicola</i>	GB190 Pino	<i>P. aspalathi</i>	GB203 Pino
Salinidad 1%	+	-	+	+
Salinidad 2%	ND	-	+	+
Salinidad 3%	ND	-	+	-
Sin NaCl	++	++	++	++
pH 4 (crecimiento)	-	-	+	+

pH 6 (crecimiento)	++	++	++	++
pH 8 (crecimiento)	+	+	+	+
Asimilación de carbohidratos: D-manosa	-	(K/K)	+	(K/K)
Oxidación D-gluconato	-	-	+	-

La escasez de características fenotípicas en el grupo bacteriano aún causa problemas en la descripción y diferenciación de los taxones. Además de que la principal desventaja con los métodos fenotípicos es el patrón de expresión génica en el que el mismo organismo podría mostrar diferentes caracteres fenotípicos en diferentes condiciones ambientales. Por lo tanto, los resultados fenotípicos deben compararse con un conjunto de datos similar de una cepa tipo de organismos relacionados.

Al encontrar aislados de las mismas especies y posible nueva especie se debe a la posibilidad de que las plantas tengan preferencias por determinadas especies de *Paraburkholderia*, y que la ubicación geográfica también pueda ser un factor en esta preferencia. Además, la comunidad microbiana de la rizósfera puede cambiar debido a las características intrínsecas de las plantas, incluido el genotipo de la planta, la etapa de desarrollo y la señalización química involucrada en las interacciones entre plantas y bacterias, como los compuestos de detección de quórum (QS) que juegan un papel importante en el establecimiento de asociaciones de raíces y microbios en las plantas para regular algunos comportamientos bacterianos, como la tasa metabólica, la propagación y la virulencia (Chagas, Pessotti, Caraballo-Rodríguez, & Pupo, 2018; Finkel, Castrillo, Herrera Paredes, Salas González, & Dangl, 2017; Reviews, 2009).

Incluido, la quimiotaxis para el establecimiento de asociaciones bacterianas con las raíces de las plantas mediante la detección de señales extracelulares a través de receptores específicos, por lo cual, la gran diversidad de exudados (ácidos orgánicos, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, nucleósidos, mucílago, etc.) permitirán atraer a las poblaciones microbianas, especialmente aquellas capaces de metabolizar los

compuestos y proliferar en este hábitat (Chagas, Pessotti, Caraballo-Rodríguez, & Pupo, 2018; Finkel, Castrillo, Herrera Paredes, Salas González, & Dangl, 2017; Reviews, 2009).

## VIII. CONCLUSIONES

1. GB45, GB51, GB53, GB152 y GB203 presentaron colonias de color blanco y cremoso como el género *Paraburkholderia*.
2. Únicamente GB190 mostró en su fenotipo un halo transparente alrededor de la colonia blanca y cremosa en medio PCAT.
3. Las cepas crecieron a 35°C y pH 6. Son sensibles en presencia de NaCl. Y no presentaron actividad hemolítica.
4. De las cinco fuentes de carbono; solo el citrato fue utilizado por las siete cepas.
5. GB51 toleró concentraciones de 200 ppm de zinc y 50 ppm de vanadio.
6. Solo GB190 creció en kanamicina (2.5ug/mL) y gentamicina (1 ug/mL).
7. La amplificación de los genes *atpD* y *recA* sirvieron como base para elucidar las relaciones filogenéticas entre las cepas y las especies de *Paraburkholderia*.
8. Las características fenotípicas y genotípicas permitieron distinguir a GB190 como posible nueva especie perteneciente al género *Paraburkholderia*.
9. Las cepas GB45, GB51, GB53 y GB152 se identifican como *Paraburkholderia sediminicola*, y GB203 como *Parburkholderia aspalathi*.

---

**IX. LITERATURA CITADA**

1. Aizawa, T., Ve, N. B., Nakajima, M., & Sunairi, M. (2010a). *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(5), 1152–1157. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.015198-0>
2. Aizawa, T., Ve, N. B., Vijarnsorn, P., Nakajima, M., & Sunairi, M. (2010). *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminium-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(9), 2036–2041. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018283-0>
3. Antonio-Flores, A.L. (2015). Aislamiento e identificación de especies pertenecientes al género de *Burkholderia* sp., en dos regiones del Estado de Puebla (Tesis). Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Químicas.
4. Balandreau, J., Viallard, V., Cournoyer, B., Coenye, T., Laevens, S., & Vandamme, P. (2001). *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Applied and environmental microbiology*, *67*(2), 982-985.
5. Barriuso, J., Pereyra, M. T., García, J. A. L., Megías, M., Mañero, F. J. G., & Ramos, B. (2005). Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. *Microbial Ecology*, *50*(1), 82–89. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0112-9>
6. Benizri, E., Nguyen, C., Piutti, S., Slezack-Deschaumes, S., & Philippot, L. (2007). Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. *Soil biology and biochemistry*, *39*(5), 1230-1233.
7. Beukes, C. W., Palmer, M., Manyaka, P., Chan, W. Y., Avontuur, J. R., van Zyl, E., ... Steenkamp, E. T. (2017). Genome data provides high support for generic boundaries in *Burkholderia* sensu lato. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01154>
8. Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, *13*(1), 66.
9. Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1327-1350.
10. Bisen, P. S., Debnath, M., & Prasad, G. B. (2012). *Microbes: concepts and applications*. John Wiley & Sons.
11. Bolívar-Anillo, H. J., Contreras-Zentella, M. L., & Teherán-Sierra, L. G. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *TIP*, *19*(2), 102-108 (2016).

12. Burkholder, W. H. (1942). Three bacterial plant pathogens: *Phytomonas earyophylli* sp. n., *Phytomonas alliicola* sp. n., and *Phytomonas manihotis* (Arthaud-Berthet et Sondar) Viégas. *Phytopathology*, *32*(2), 141-149.
13. Burkholder, W. H. (1950). Sour skin, a bacterial rot. *Phytopathology*, *40*, 115-17.
14. Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., & Estrada-de los Santos, P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(4), 1165–1172. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02951-0>
15. Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-De Los Santos, P., & Martínez-Aguilar, L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, *73*(16), 5308-5319.
16. Calvo Vélez, P., Reymundo Meneses, L., & Zúñiga Dávila, D. (2008). A STUDY OF POTATO (*Solanum tuberosum*) CROP RHIZOSPHERE MICROBIAL POPULATION IN HIGHLAND ZONES. *Ecología Aplicada*, *7*(1).
17. Carson, J. K., Campbell, L., Rooney, D., Clipson, N., & Gleeson, D. B. (2009). Minerals in soil select distinct bacterial communities in their microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology*, *67*(3), 381-388.
18. Castorena, G., Mugica, V., Le Borgne, S., Acuña, M. E., Bustos-Jaimes, I., & Aburto, J. (2006). Carbazole biodegradation in gas oil/water biphasic media by a new isolated bacterium *Burkholderia* sp. strain IMP5GC. *Journal of applied microbiology*, *739*-745.
19. Chagas, F. O., Pessotti, R. D. C., Caraballo-Rodríguez, A. M., & Pupo, M. T. (2018). Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chemical Society Reviews*, *47*(5), 1652–1704. <https://doi.org/10.1039/c7cs00343a>
20. Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., & Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *science*, *311*(5765), 1283-1287.
21. Coenye, T., Laevens, S., Willems, A., Ohlén, M., Hannant, W., Govan, J. R. W., ... Vandamme, P. (2001). *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*(3), 1099–1107. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1099>
22. Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clement, C., & Ait Barka, E. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00113.x>
23. De Zelicourt, A., Al-Yousif, M., & Hirt, H. (2013). Rhizosphere microbes as essential partners for plant stress tolerance. *Molecular Plant*. <https://doi.org/10.1093/mp/sst028>

24. Dobritsa, A. P., & Samadpour, M. (2016). Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *66*(8), 2836-2846.
25. Doornbos, R. F., Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0028-y>
26. Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z., & Lugtenberg, B. (2008). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental microbiology*, *10*(1), 1-9.
27. Estrada-de los Santos, P., Palmer, M., Chávez-Ramírez, B., Beukes, C., Steenkamp, E. T., Briscoe, L., ... James, E. K. (2018). Whole genome analyses suggests that *Burkholderia* sensu lato contains two additional novel genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): Implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the Burkholderiaceae. *Genes*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/genes9080389>
28. Estrada-De Los Santos, P., Rojas-Rojas, F. U., Tapia-García, E. Y., Vásquez-Murrieta, M. S., & Hirsch, A. M. (2016). To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Annals of microbiology*, *66*(3), 1303-1314.
29. Estrada-De Los Santos, P., Vinuesa, P., Martínez-Aguilar, L., Hirsch, A. M., & Caballero-Mellado, J. (2013). Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Current microbiology*, *67*(1), 51-60.
30. Finkel, O. M., Castrillo, G., Herrera Paredes, S., Salas González, I., & Dangl, J. L. (2017). Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, *38*, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.018>
31. Foster, R. C. (1988). Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and fertility of soils*, *6*(3), 189-203.
32. Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A. C., Cacco, G., & van Elsas, J. D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, *38*(1-2), 1-15.
33. González-Hernández, J. C., & Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *44*(3-4), 137-156.
34. Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen, J. F., ... Vandamme, P. (2004a). Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(5),

- 1677–1681. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63101-0>
35. Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen, J. F., ... Vandamme, P. (2004b). Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(5), 1677–1681. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63101-0>
36. Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(4), 367–402. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00031-0)
37. Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. M., Elliott, G. N., Bontemps, C., ... & Young, J. P. W. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular plant-microbe interactions*, *24*(11), 1276-1288.
38. Harayama, S., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Yamamoto, S., Kasai, H., & Vivian, A. (2015). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, *146*(10), 2385–2394. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2385>
39. Jiang, C. Y., Sheng, X. F., Qian, M., & Wang, Q. Y. (2008). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, *72*(2), 157-164.
40. Kang, S. M., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, A. L., You, Y. H., Lee, W. H., ... Lee, I. J. (2017). Metabolism-mediated induction of zinc tolerance in *Brassica rapa* by *Burkholderia cepacia* CS2-1. *Journal of Microbiology*, *55*(12), 955–965. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7305-7>
41. Khanna, K., Jamwal, V. L., Gandhi, S. G., Ohri, P., & Bhardwaj, R. (2019). Metal resistant PGPR lowered Cd uptake and expression of metal transporter genes with improved growth and photosynthetic pigments in *Lycopersicon esculentum* under metal toxicity. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41899-3>
42. Kim, H. Bin, Park, M. J., Yang, H. C., An, D. S., Jin, H. Z., & Yang, D. C. (2006). *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., a  $\beta$ -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(11), 2529–2533. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64387-0>
43. Lavelle, P., & Spain, A. V. (2001). *Soil ecology*. Springer Science & Business Media.
44. Lim, J. H., Baek, S. H., & Lee, S. T. (2008). *Burkholderia sediminicola* sp. nov., isolated from freshwater sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65502-0>
45. López Revelles, M. O. (2005). Caracterización de las rutas de catabolismo de L-

- lisina en *Pseudomonas putida* KT2440. Retrieved from <http://hera.ugr.es/tesisugr/15437346.pdf>
46. Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2015). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 14). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
  47. Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., ... Hikichi, Y. (2006). Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), 1031–1038. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64184-0>
  48. Marchand Pajares, E. O. (2002). Microorganismos indicadores de la calidad del agua del consumo humano en Lima- Peru. Tesis en Microbiología y Parasitología , 6, 22-42.
  49. Mavengere, N. R., Ellis, A. G., & Le Roux, J. J. (2014). *Burkholderia aspalathi* sp. nov., isolated from root nodules of the South African legume *Aspalathus abietina* Thunb. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.057067-0>
  50. Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 313-339
  51. Paksanont, S., Sintiprungrat, K., Yimthin, T., Pumirat, P., Peacock, S. J., & Chantratita, N. (2018). Effect of temperature on *Burkholderia pseudomallei* growth, proteomic changes, motility and resistance to stress environments. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27356-7>
  52. Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., & Doudoroff, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23(4), 333–339. <https://doi.org/10.1099/00207713-23-4-333>
  53. Pereira, A. D. A., Silva, M. D. B., Oliveira, J. D. S., Ramos, A. D. S., Freire, M. B. G. S., Freire, F. J., & Kuklinsky-Sobral, J. (2012). Salinity influence on the growth and production of indole acetic acid by endophytic *Burkholderia* spp. from sugarcane. *Bioscience Journal*, 28(1, Suppl. 1), 112-121.
  54. Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research*, 169(5-6), 325-336.
  55. Perin, L., Martínez-Aguilar, L., Castro-González, R., Estrada-De Los Santos, P., Cabellos-Avelar, T., Guedes, H. V., & Caballero-Mellado, J. (2006). Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Applied and environmental microbiology*, 3103-3110.
  56. Perin, L., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Baldani, J. I., Estrada-de los Santos, P., Reis, V. M., & Caballero-Mellado, J. (2006). *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,

- 56(8), 1931–1937. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64362-0>
57. Postma, J., & van Veen, J. A. (1990). Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* introduced into soil. *Microbial Ecology*, 19(2), 149-161.
  58. Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Gourbiere, F., Thioulouse, J., & Nazaret, S. (2000). Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbial Ecology*, 39(4), 263-272.
  59. Reis, V. M., Estrada-de los Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S., ... Caballero-Mellado, J. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2155–2162. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02879-0>
  60. Rooney, D. C., & Clipson, N. J. (2009). Phosphate addition and plant species alters microbial community structure in acidic upland grassland soil. *Microbial ecology*, 57(1), 4.
  61. Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
  62. Sawana, A., Adeolu, M., & Gupta, R. S. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in genetics*, 5, 429.
  63. Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A. V., Vandamme, P., Barka, E. A., Salles, J. F., ... Nowak, J. (2005). *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1187–1192. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63149-0>
  64. Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H., & Kandeler, E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and environmental microbiology*, 67(9), 4215-4224.
  65. Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2012). Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microbial Ecology*, 63(2), 249-266.
  66. Vacaseydel-Aceves. (2012). Aislamiento y diversidad de especies del género *Burkholderia* en el estado de Tamaulipas.
  67. Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.

68. Vanlaere, E., van der Meer, J. R., Falsen, E., Salles, J. F., de Brandt, E., & Vandamme, P. (2008). *Burkholderia sartisoli* sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 420–423. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65451-0>
69. Viallard, V., Poirier, I., Cournoyer, B., Haurat, J., Wiebkin, S., Ophel-keller, K., & Balandreaul, J. (1998). *Burkholderia* species , and reassessment of Burkholderia. *International Journal of Systematic Bacteriology*, (1 998), 549–563.
70. White, R. A., Rivas-Ubach, A., Borkum, M. I., Köberl, M., Bilbao, A., Colby, S. M., ... Jansson, C. (2017). The state of rhizospheric science in the era of multi-omics: A practical guide to omics technologies. *Rhizosphere*, 3(June), 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.05.003>
71. Wong-Villarreal, A., & Caballero-Mellado, J. (2010). Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.10.004>
72. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., & Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology*, 36(12), 1251-1275.
73. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of Two Burkholderia and An *Alcaligenes* Species to *Ralstonia* Gen. Nov. Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. *Microbiology and immunology*, 39(11), 897-904.
74. Yamamoto, S., & Harayama, S. (1998). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of gyrB, rpoD and 16s rRNA genes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 488(1), 3–8.
75. Yang, L., Tang, R., Zhu, J., Liu, H., Mueller-Roeber, B., Xia, H., & Zhang, H. (2008). Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants constitutively expressing AtIpk2 $\beta$ , an inositol polyphosphate 6-/3-kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 66(4), 329-343.
76. Zuleta, L. F. G., de Oliveira Cunha, C., De Carvalho, F. M., Ciapina, L. P., Souza, R. C., Mercante, F. M., & De Vasconcelos, A. T. R. (2014). The complete genome of *Burkholderia phenoliruptrix* strain BR3459a, a symbiont of *Mimosa flocculosa*: highlighting the coexistence of symbiotic and pathogenic genes. *BMC genomics*, 15(1), 535.

## X. ANEXOS

## ANEXO I

**Tabla 5.** Resultados de las pruebas. ++, Condición óptima de crecimiento; +, crecimiento; -, cepa negativa; ND, no determinado. \*otro tipo de medio

Código de Cepas y fuente de aislamiento / Pruebas	GB45 Helecho	GB51 Helecho	GB53 Helecho	GB62 Helecho	GB152 Bromelia	GB190 Pino	GB203 Pino	<i>P.aspalathi</i>	<i>P. sedimicola</i>
Temperatura 39°C	+	+	+	+	+	-	+	ND	ND
Temperatura 35°C	++	++	++	++	++	++	++	ND	ND
Salinidad 1%	+	-	+	+	+	-	+	+	ND*
Salinidad 2%	-	-	-	+	-	-	+	+	ND
Salinidad 3%	-	-	-	-	-	-	-	+	ND
Sin NaCl	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pH 4 (crecimiento)	+	+	-	+	+	-	+	+	-
pH 6 (crecimiento)	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pH 8 (crecimiento)	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Prueba de Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba de Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba agar Lisina Hierro (LIA): Decarboxilación de la lisina	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND

Prueba agar Lisina Hierro (LIA): Desaminación de la lisina y Producción de ácido sulfhídrico	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Prueba triple azúcar hierro agar (TSI)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	ND*	ND*
Asimilación de carbohidratos: D-manosa	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	+	-
D-sorbitol	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	(K/K)	+	+
Prueba citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidación D-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Actividad hemolítica	Hemólisis gamma	Hemólisis gamma	Hemólisis gamma	Hemólisis gamma	Hemólisis gamma	Hemólisis gamma	Hemólisis gamma	ND	ND

**Tabla 6.** Resultados del ensayo a metales: +, crecimiento; -, no crecimiento; ND, no determinado.

Código de Cepas y fuente de aislamiento / Tipo de metal	GB190 Helecho	GB51 Helecho	GB203 Helecho	GB62 Helecho	GB45 Bromelia	GB53 Pino	GB152 Pino	<i>P. putida</i> KT2440	<i>B.aspalathi</i>	<i>B. sediminicola</i>
Níquel 25 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Níquel 50 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Níquel 100 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Níquel 200 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Níquel 250 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Níquel 300 ppm	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND
Cobalto 25 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Cobalto 50 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Cobalto 100 ppm	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND
Cobalto 200 ppm	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Molibdeno 25 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Molibdeno 50 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Molibdeno 100 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Molibdeno 200 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND

Molibdeno 250 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Molibdeno 300 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Zinc 25 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Zinc 50 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Zinc 100 ppm	-	+	-	-	-	-	-	+	ND	ND
Zinc 200 ppm	-	+	-	-	-	-	-	+	ND	ND
Plomo 25 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Plomo 50 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Plomo 100 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Plomo 200 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Plomo 250 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Plomo 300 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Vanadio 25 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Vanadio 50 ppm	-	+	-	-	-	-	-	+	ND	ND
Vanadio 100 ppm	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND
Vanadio 200 ppm	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND

**Tabla 7.** Resultados del ensayo de antibióticos: +, crecimiento; -, cepa negativa; ND, no determinado.

Código de Cepas y fuente de aislamiento / Antibiótico	GB190 Helecho	GB51 Helecho	GB203 Helecho	GB62 Helecho	GB45 Bromelia	GB53 Pino	GB152 Pino	<i>P. putida</i> KT2440	<i>B.aspalathi</i>	<i>B. sedimicola</i>
Ampicilina 10 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ampicilina 20 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ampicilina 50 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ampicilina 100 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ampicilina 150 µg/mL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Cloranfenicol 1 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Cloranfenicol 2.5 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Cloranfenicol 5 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Cloranfenicol 7.5 µg/mL	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Cloranfenicol 10 µg/mL	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Cloranfenicol 15 µg/mL	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Cloranfenicol 20 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gentamicina 1 µg/mL	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gentamicina 2.5 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gentamicina 5 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gentamicina 7.5 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina 2.5 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Tetraciclina 5 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina 10 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina 15 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina 20 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamicina 1 µg/mL	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Kanamicina 2.5 µg/mL	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamicina 5 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamicina 7.5 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamicina 10 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamicina 15 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamicina 20 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**ANEXO II****Medios de cultivo****Luria Bertani o LB (g/L):**

Peptona de caseína,	10.0
Extracto de levadura,	5.0
NaCl,	10.0
Agar,	15.0

***Pseudomonas cepacia* ácido azelaico triptamina o PCAT (g/L):**

MgSO <sub>4</sub> ,	0.1
Ácido azelaico,	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,	4.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	4.0
Extracto de levadura,	0.2
Agar,	15.0
Ajustar pH: 5.7 ±0.2	

**Caldo Nutritivo o NB (g/L):**

Pluripeptona,	5.0
Extracto de carne,	3.0
Agar,	15.0

**Lisina Hierro Agar o LIA (g/L):**

Peptona de Gelatina	5.0
Extracto de Levadura	3.0
Dextrosa,	1.0
L- Lisina,	10.0
Citrato de Amonio Férrico,	0.50
Tiosulfato de Sodio,	0.04
Púrpura de Bromocresol,	0.02
Agar,	13.50

Ajustar pH:  $6.7 \pm 0.2$

**Caldo gluconato peptona (g/L):**

Peptona de caseína,	1.5
Extracto de levadura,	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,	1.0
Gluconato de potasio,	40.0
Ajustar pH: $7.0 \pm 0.2$	

El gluconato de potasio puede ser reemplazado por 37.25 g de gluconato de sodio.

**Caldo rojo fenol (g/L):**

Peptona de caseína,	10.0
Extracto de levadura,	1.0
Cloruro de sodio,	3.0
Rojo fenol,	0.018
Ajustar pH: $7.4 \pm 0.2$	

**Citrato de Simmons (g/L):**

Sulfato de magnesio, MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O,	0.2
Fosfato monoamónico, NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	1.0
Fosfato dipotásico, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,	1.0
Citrato de sodio,	2.0
Cloruro de sodio, NaCl,	3.0
Agar,	15.0
Ajustar pH: $6.9 \pm 0.2$	

**Interpretación de Resultados****Catalasa**

El desprendimiento de burbujas (en 5-10 segundos) procedentes del oxígeno indicaba que la prueba era positiva.

**Oxidasa**

La aparición de un color morado-azul indicaba que la prueba era positiva y el viraje de un color amarillo indicaba prueba negativa. Como control positivo se tomó a *Pseudomonas* y como control negativo a *Escherichia coli*.

**Prueba Lisina Hierro Agar (LIA)**

Descarboxilación de la lisina:

- Prueba Positiva: Pico violeta/ fondo violeta.
- Prueba Negativa: Pico violeta/ fondo amarillo.

Desaminación de la lisina:

- Pico rojizo/ fondo amarillo. Esto sucede con cepas del género *Proteus*, *Providencia* y algunas cepas de *Morganella* spp.

Producción de ácido sulfhídrico:

- Prueba positiva: Ennegrecimiento del medio (especialmente en el límite del pico y fondo).

**Prueba Agar Hierro-Triple azúcar (TSI)**

La fermentación de azúcares se determinó por el cambio de color; acidificación (color amarillo) o alcalinización (color rosa) en la correspondiente región del tubo. Se considera positiva la fermentación de glucosa (sin fermentación de lactosa ni de sacarosa) en el caso de observarse pico alcalino y fondo ácido (K/A). Se considera positiva la fermentación de lactosa y/o sacarosa (además de glucosa) en caso de observarse pico y fondo ácidos (A/A). En los casos en que se observa pico y fondo alcalinos la fermentación de azúcares se considera negativa (k/k). La producción de H<sub>2</sub>S es positiva en caso de notarse un ennegrecimiento en el fondo del tubo. La producción de gas se evaluó por la presencia de burbujas en el agar o desprendimiento del mismo.

**Oxidación de D-gluconato**

Positivo: precipitado de verde a naranja.

Negativo: el color azul del reactivo no cambia o verde azulado.

**Asimilación de carbohidratos**

- Prueba Positiva: crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta.

-Prueba Negativa: ausencia de crecimiento y ningún cambio de color (verde).

**Actividad hemolítica**

Hemólisis alfa: es una hemólisis parcial y la zona de crecimiento aparece rodeada de un halo de color verdoso.

Hemólisis beta: en este caso la hemólisis es total y el halo que rodea a las colonias es totalmente transparente.

Hemólisis gamma (no hemólisis): el microorganismo en cuestión no es capaz de realizar la hemólisis y por tanto no existe halo alrededor de la colonia.

**ANEXO III****➤ Secuencias *atpD*****>GB45**

CGTGGAATCCC GCGTGACCACATGCCGAAGATTTACGACGCGCTCATTCTCGACGGTTCGGAAGTGA  
 ACCCTCGAAGTCCAGCAACAGCTGGGGCGACGGCGTCGTCCGCACCATCTGTCTGGGTGCCTCGGACG  
 GTCTGCGCCGTGGTACGACGGTGAAGAACACCGGTAAGCCGATCAGCGTGCCGGTTGGCAAGCCGA  
 CCCTCGGCCGATCATGGACGTGCTGGGTGCGCCGATCGACGAAGCCGGCCCGATCAACTCGGACGT  
 GGTTGCGGTATTACACAGAAGGCTCCGGCGTTCGACGAAGTTCGCGCGTTCGACGGAAGTTCGAA  
 ACCGGCATCAAGGTTATCGACCTGATCTGCCCCTCGCCAAGGGCGGTAAGGTTGGCCTGTTGCGGTG  
 GCGCCGGTGTGGGCAAGACCGTGAACATGATGGAAGTTCGACGAAGTTCGCGCGTTCGAAACATCGCTAAGGAACACGGT  
 GTTACTCCGTGTTGCGCCGTGTTGGCGAGCGTACCCGCGAAGGGAACGACTTCTATCACGAAATGAA  
 GGACTCGAACGTTCTCGACAAGGTCGCGCTGGTGTACGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGCAACCG  
 TCTGCGCGTTCGCGCTGACCGGTCTGACGATGGCTGAGCACT

**>GB51**

GTGGAATCCC GCGTGACCACATGCCGAAGATTTACGACGCGCTCATTCTCGACGGTTCGGAAGTGA  
 CCCTCGAAGTCCAGCAACAGCTGGGGCGACGGCGTCGTCCGCACCATCTGTCTGGGTGCCTCGGACG  
 TCTGCGCCGCGGTACGACGGTGAAGAACACCGGTAAGCCGATCAGCGTGCCGGTTGGCAAGCCGAC  
 CCTCGGCCGATCATGGACGTGCTGGGTGCGCCGATCGACGAAGCCGGCCCGATCAACTCGGACGT  
 GTTTCGCGGTATTACACAGAAGGCTCCGGCGTTCGACGAAGTTCGCGCGTTCGACGGAAGTTCGAAA  
 CTGGCATCAAGGTTATCGACCTGATCTGCCCCTCGCCAAGGGCGGTAAGGTTGGCCTGTTGCGGTG  
 CGCCGGTGTGGGCAAGACCGTGAACATGATGGAAGTTCGACGAAGTTCGCGCGTTCGAAACATCGCTAAGGAACACGGT  
 TTATTCCGTGTTGCGCTGGTGTGGTGAGCGTACCCGCGAAGGGAACGACTTCTATCACGAAATGAAG  
 GACTCGAACGTTCTCGACAAGGTCGCGCTGGTGTACGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGCAACCGT  
 TGCGCGTTCGCGCTGACCGGTCTGACGATGGCTGAGCA

**>GB53**

ACGTGGAATCCC GCGTGACCACATGCCGAAGATTTACGACGCGCTCATTCTCGACGGTTCGGAAGTGA  
 GACCCTCGAAGTCCAGCAACAGCTGGGGCGACGGCGTCGTCCGCACCATCTGTCTGGGTGCCTCGGAC  
 GGTTGCGCCGCGGTACGACGGTGAAGAACACCGGTAAGCCGATCAGCGTGCCGGTTGGCAAGCCG  
 ACCCTCGGCCGATCATGGACGTGCTGGGTGCGCCGATCGACGAAGCCGGCCCGATCAACTCGGACG  
 TGGTTCGCGGTATTACACAGAAGGCTCCGGCGTTCGACGAAGTTCGCGCGTTCGACGGAAGTTCGGA  
 AACTGGCATCAAGGTTATCGACCTGATCTGCCCCTCGCCAAGGGCGGTAAGGTTGGCCTGTTGCGGT  
 GGCGCCGGTGTGGGCAAGACCGTGAACATGATGGAAGTTCGACGAAGTTCGCGCGTTCGAAACATCGCTAAGGAACACGGT  
 GGTTATTCCGTGTTGCGCTGGTGTGGTGAGCGTACCCGCGAAGGGAACGACTTCTATCACGAAATGA  
 AGGACTCGAACGTTCTCGACAAGGTCGCGCTGGTGTACGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGCAAC  
 GTCTGCGCGTTCGCGCTGACCGGTCTGACGATGGCTGAGCAC

**>GB62**

ACGTGGAATCCC GCGTGACCACATGCCGAAGATTTACGACGCGCTCATTCTCGACGGTTCGGAAGTGA  
 GACCCTCGAAGTCCAGCAACAGCTGGGGCGACGGCGTCGTCCGCACCATCTGTCTGGGTGCCTCGGAC  
 GGTTGCGCCGCGGTACGACGGTGAAGAACACCGGTAAGCCGATCAGCGTGCCGGTTGGCAAGCCG  
 ACCCTCGGCCGATCATGGACGTGCTGGGTGCGCCGATCGACGAAGCCGGCCCGATCAACTCGGACG  
 TGGTTCGCGGTATTACACAGAAGGCTCCGGCGTTCGACGAAGTTCGCGCGTTCGACGGAAGTTCGGA  
 AACCGGCATCAAGGTTATCGACCTGATCTGCCCCTCGCCAAGGGCGGTAAGGTTGGCCTGTTGCGGT  
 GGCGCCGGTGTGGGCAAGACCGTGAACATGATGGAAGTTCGACGAAGTTCGCGCGTTCGAAACATCGCTAAGGAACACGGT  
 GGTTACTCCGTGTTGCGCCGTGTTGGCGAGCGTACCCGCGAAGGGAACGACTTCTATCACGAAATGA  
 AGGACTCGAACGTTCTCGACAAGGTCGCGCTGGTGTACGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGCAAC  
 GTCTGCGCGTTCGCGCTGACCGGTCTGACGATGGCTGAGCAC

## &gt;GB152

ATTCCC GCGTGACCACATGCCGAAGATTTACGACGCGCTCATTCTCGACGGTTCGGAAGTACCCCTC  
 GAAGTCCAGCAACAGCTGGGCGACGGCGTTCGCCACCATCTGTCTGGGTGCCTCGGACGGTCTGC  
 GCCGCGGTACGACGGTGAAGAACACCGGTAAGCCGATCAGCGTGCCGGTTGGCAAGCCGACCCTCG  
 GCCGGATCATGGACGTGCTGGGTGCCCCGATCGACGAAGCCGGCCCCGATCAACTCGGACGTGGTTCG  
 CGGTATTCACCAGAAGGCTCCGGCGTTCGACGAAGTTCGCCGTCGACGGAAGTCTCGAAACTGGC  
 ATCAAGGTTATCGACCTGATCTGCCCCGTTCCGAAGGGCGGTAAGGTTGGCCTGTTCCGGTGGCGCCG  
 GTGTGGCAAGACCGTGAACATGATGGAAGTATCAACAACATCGCTAAGGAACACGGTGGTTATTC  
 CGTGTTCGCTGGTGTGGTGAGCGTACCCGCGAAGGGAACGACTTCTATCACGAAATGAAGGACTCG  
 AACGTTCTCGACAAGGTCGCGCTGGTGTACGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGCAACCGTCTGCGCG  
 TCGCGCTGACCGGTCTGACGATGGCTGAGCACT

## &gt;GB190

ACGTGGAATTTCCGCGTGAAACCATGCCGAAGATTTACGACGCGCTCATTCTCGAAGGTTCCGGAAGT  
 GACCCTCGAAGTCCAGCAACAGCTGGGCGACGGCGTTCGCCACCATCTGTCTGGGTGCATCGGAC  
 GGACTGCGTCGCGGTACGGTTCGTAAGAACACGGGTAAGCCGATCAGCGTGCCGGTTGGCAAGCCG  
 ACCCTCGGCCGGATCATGGACGTGCTGGGTGCCCCGATCGACGAAGCCGGCCCCGATCAACTCGGACG  
 TGGTTCGCGGTATTCACCAGAAGGCTCCGGCGTTCGACGAAGTTCGCCGTCGACGGAAGTCTCGA  
 AACCGGCATCAAGGTTATCGACCTGATCTGCCCCGTTCCGAAGGGCGGTAAGGTTGGCCTGTTCCGGT  
 GCGCCGGTGTGGCAAGACCGTGAACATGATGGAAGTATCAACAACATCGCTAAGGAACACGGT  
 GGTACTCCGTGTTCCGCCGGTGTGGCGAGCGTACCCGCGAAGGTAACGACTTCTATCACGAAATGA  
 AGGACTCGAACGTTCTCGACAAGGTCGCGCTGGTGTACGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGCAACC  
 GTCTGCGCGTTCGCGTGACCGGCCTGACGATGGCTGAGCACT

## &gt;GB203

CGTGGAATTTCCGCGTGACCACATGCCGAAGATTTACGACGCGCTCATTCTCGACGGTTCGGAAGT  
 ACCCTCGAAGTCCAGCAACAGCTGGGCGACGGCGTTCGCCACCATCTGTCTGGGTGCCTCGGACG  
 GTCTGCGCCGCGGTACGACGGTGAAGAACACCGGTAAGCCGATCAGCGTGCCGGTTGGCAAGCCGA  
 CCCTCGGCCGGATCATGGACGTGCTGGGTGCCCCGATCGACGAAGCCGGCCCCGATCAACTCGGACG  
 GTTCGCGGTATTCACCAGAAGGCTCCGGCGTTCGACGAAGTTCGCCGTCGACGGAAGTCTCGAG  
 ACCGGCATCAAGGTTATCGACCTGATCTGCCCCGTTCCGAAGGGCGGTAAGGTTGGCCTGTTCCGGT  
 GCGCCGGTGTGGCAAGACCGTGAACATGATGGAAGTATCAACAACATCGCTAAGGAACACGGT  
 GTTACTCCGTGTTCCGCCGGTGTGGCGAGCGTACCCGCGAAGGGAACGACTTCTATCACGAAATGA  
 GGACTCGAACGTTCTCGACAAGGTCGCGCTGGTGTACGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGCAACCG  
 TCTGCGCGTTCGCGTGACCGGTCTGACGATGGCTGAGCAC

➤ **Secuencias *recA***

## &gt;GB45

GCTGCCGCGTTCGCGCAGATCGAAAAGCAGTTCGGCAAAGGGTTCGGTTCATGCGGCTCGGCCGCGGT  
 GAGGCGGTTCGAAGATATCCAGGTGGTCTCAACGGGATCACTCGGCCTCGATATCGCGCTGGGCGTCCG  
 GCGGTTTGCCGCGTGGCCGGGTGGTTCGAAATTTATGGTCCGGAGTTCGCGGTAAAACCACGCTGAC  
 GCTGCAAGTTCGCGCGAAATGCAGAAGCTCGGCCGACGGCAGCGTTATCGACGCGGAGCACGC  
 GCTGGATATCCAGTATGCGGGCAAGCTCGGCCGTAACGTC AACGACCTGCTGGTTTCGAGCCGGAC  
 ACCGGTGAACAGGCGCTCGAAATCGCCGACGACTCGTGCCTCGGGCTCGATCGACATGATCGTGA  
 TCGACTCGGTTCGCGGCACTCGTGCCGAAGGCCGAAATCGAAGGCGAAATGGGCGACTCGCTGCCG  
 GTCTGCAAGCGCGTCTGATGTCGCAAGCGCTGCGCAAGCTCACCGGTACGATCAAGCGCACCAACTG  
 CCTCGTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAGATCGG

>GB51

ACTCGCTGCCGCGCTTGCGCAGATCGAAAAGCAGTTCGGCAAAGGGTCGGTCATGCGGCTCGGGCGCA  
GGTGAGGCGGTCTGAAGATATCCAGGTGGTCTCAACGGGATCACTCGGCCTCGATATCGCGCTGGGCGT  
TCGGCGTTTGCCGCGTGGCCGGGTGGTCGAAATTTATGGTCCGGAGTCGTCCGGTAAAACCACGCT  
GACGCTGCAAGTCGTGCGCCGAAATGCAGAAGCTCGGCCGCACGGCAGCGTTTATCGACGCGGAGCA  
CGCGCTGGATATCCAGTACGCGGGCAAGCTCGGCGTGAACGTCAACGACCTGCTGGTTTCGCAGCCG  
GACACCGGTGAACAGGCGCTCGAAATCGCTGACGCACTCGTGCCTCGGGCTCGATCGACATGATCG  
TGATCGACTCGGTGCGGGCACTCGTGCCGAAGGCTGAAATCGAAGGCGAAATGGGCGACTCGCTGCC  
GGGTCTGCAAGCGCGTCTGATGTCGCAAGCGCTGCGCAAGCTCACCGGTACGATCAAGCGCACCAAC  
TGCTCGTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAGATCGGTGT

>GB53

TCGCTGCCGCGCTTGCGCAGATCGAAAAGCAGTTCGGCAAAGGGTCGGTCATGCGGCTCGGGCAGG  
TGAGGCGGTCTGAAGATATCCAGGTGGTCTCAACGGGATCACTCGGCCTCGATATCGCGCTGGGCGTC  
GGCGTTTGCCGCGTGGCCGGGTGGTCGAAATTTATGGTCCGGAGTCGTCCGGTAAAACCACGCTGA  
CGCTGCAAGTCGTGCGCCGAAATGCAGAAGCTCGGCCGCACGGCAGCGTTTATCGACGCGGAGCACG  
CGCTGGATATCCAGTACGCGGGCAAGCTCGGCGTGAACGTCAACGACCTGCTGGTTTCGCAGCCGGA  
CACCGGTGAACAGGCGCTCGAAATCGCTGACGCACTCGTGCCTCGGGCTCGATCGACATGATCGTG  
ATCGACTCGGTGCGGGCACTCGTGCCGAAGGCTGAAATCGAAGGCGAAATGGGCGACTCGCTGCCG  
GGTCTGCAAGCGCGTCTGATGTCGCAAGCGCTGCGCAAGCTCACCGGTACGATCAAGCGCACCAACT  
GCCTCGTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAGATCGGT

>GB62

CTCGCTGCCGCGCTTGCGCAGATCGAAAAGCAGTTCGGCAAAGGGTCGGTCATGCGGCTCGGGCGGG  
GTGAGGCGGTCTGAAGATATCCAGGTGGTCTCAACGGGATCACTCGGCCTCGATATCGCGCTGGGCGT  
CGGCGTTTGCCGCGTGGCCGGGTGGTCGAAATTTATGGTCCGGAGTCGTCCGGTAAAACCACGCTG  
ACGTGCAAGTCGTGCGCCGAAATGCAGAAGCTCGGCCGCACGGCAGCGTTTATCGACGCGGAGCAC  
GCGCTGGATATCCAGTATGCGGGCAAGCTCGGCGTGAACGTCAACGACCTGCTGGTTTCGCAGCCGG  
ACACCGGTGAACAGGCGCTCGAAATCGCCGACGCACTCGTGCCTCGGGCTCGATCGACATGATCGT  
GATCGACTCGGTGCGGGCACTCGTGCCGAAGGCGAAATCGAAGGCGAAATGGGCGACTCGCTGCC  
GGGTCTGCAAGCGCGTCTGATGTCGCAAGCGCTGCGCAAGCTCACCGGTACGATCAAGCGCACCAAC  
TGCTCGTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAGATCGGTGT

>GB152

CGCTGCCGCGCTTGCGCAGATCGAAAAGCAGTTCGGCAAAGGGTCGGTCATGCGGCTCGGGCGCAGGT  
GAGGCGGTCTGAAGATATCCAGGTGGTCTCAACGGGATCACTCGGCCTCGATATCGCGCTGGGCGTCC  
GCGTTTGCCGCGTGGCCGGGTGGTCGAAATTTATGGTCCGGAGTCGTCCGGTAAAACCACGCTGAC  
GCTGCAAGTCGTGCGCCGAAATGCAGAAGCTCGGCCGCACGGCAGCGTTTATCGACGCGGAGCACGC  
GCTGGATATCCAGTACGCGGGCAAGCTCGGCGTGAACGTCAACGACCTGCTGGTTTCGCAGCCGGAC  
ACCGGTGAACAGGCGCTCGAAATCGCTGACGCACTCGTGCCTCGGGCTCGATCGACATGATCGTGA  
TCGACTCGGTGCGGGCACTCGTGCCGAAGGCTGAAATCGAAGGCGAAATGGGCGACTCGCTGCCG  
GTCTGCAAGCGCGTCTGATGTCGCAAGCGCTGCGCAAGCTCACCGGTACGATCAAGCGCACCAACTG  
CCTCGTGATCTTCATCAACCAGATCCGTATGAAGATCGGTGTGA

>GB190

CTCGCTGCCGCGCTTGCAGATCGAAAAGCAGTTCGGCAAAGGGTCGGTCATGCGGCTCGGGCGCAG  
GTGAGGCGGTTCGAAGATATTCAGGTGGTCTCAACGGGATCACTTGGCCTCGACATCGCGCTGGGCGT  
CGGCGTTTGCCGCGTGGCCGTGTGGTCGAAATTTACGGTCCGGAATCGTCCGGTAAAACCACGCTG  
ACGCTGCAAGTCGTCGCCGAAATGCAGAAGCTCGGGCCACGGCAGCGTTTATCGACGCGGAGCAC  
GCGCTGGATATCCAGTACGCGGGCAAGCTCGGCGTGAACGTCAATGACCTGCTGGTTTCGCAACCGG  
ACACCGGTGAACAGGCGCTCGAAATCGCCGACGCACTGGTTCGCTCGGGTTCGATCGACATGATCGT  
GATCGACTCGGTCGCGGCACTCGTGCCGAAGGCCGAAATCGAAGGCCGAAATGGGCGACTCGCTGCC  
GGGTCTGCAAGCGCTCTGATGTCGCAAGCGCTGCGCAAGCTCACCGGCACGATCAAGCGCACCAAC  
TGCCTCGTGATCTTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGTGTG

>GB203

GCTGCCGCGCTTGCAGATCGAAAAGCAGTTCGGCAAAGGGTCGGTCATGCGGCTCGGGCGCAGGT  
GAGGCGGTTCGAAGATATCCAGGTGGTCTCAACGGGATCACTCGGCCTCGATATCGCGCTGGGCGTCG  
GCGTTTGCCGCGTGGCCGGGTGGTCGAAATTTACGGTCCGAGTCGTCCGGTAAAACCACGCTGAC  
GCTGCAAGTCGTCGCCGAAATGCAGAAGCTTGGCGGCACAGCAGCGTTTATCGACGCGGAGCACGC  
GCTGGATATCCAGTACGCGGGCAAGCTCGGCGTGAACGTCAACGACCTGCTGGTTTCGAGCCGGAC  
ACCGGTGAACAGGCGCTCGAAATCGCTGACGCACTCGTGCGCTCGGGCTCGATCGACATGATCGTGA  
TCGACTCGGTCGCGGCACTCGTGCCGAAGGCCGAAATCGAAGGCCGAAATGGGCGACTCGCTGCCG  
GTCTGCAAGCGCTCTGATGTCGCAAGCGCTGCGCAAGCTCACCGGTACGATCAAGCGCACCAACTG  
CCTCGTGATCTTCATCAACCAGATCCGCTATGAAGATCGGTGTG