

## Caracterización de cepas rizosféricas pertenecientes al género *Paraburkholderia* sp. aisladas de la sierra norte del Estado de Puebla

Itzia Citlali Guevara-González<sup>1</sup> **ID**, Ricardo Carreño-López<sup>2</sup> **ID**, Luis Ramiro Caso-Vargas<sup>1</sup> **ID**,  
Vianey Marín-Cevada<sup>2\*</sup> **ID**.

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Biotecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, México. Edificio IC-11, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570.

\*Email autor corresponsal: [vianey.marin@correo.buap.mx](mailto:vianey.marin@correo.buap.mx)

**Recibido:** 3 marzo 2021. **Aceptado:** 24 abril 2021

### RESUMEN

El género *Paraburkholderia* comprende más de 100 especies, las cuales pueden ser aisladas de diversos ambientes como plantas, suelos agrícolas, suelos volcánicos e incluso, a partir de cuerpos de agua. Existen pocos estudios en nuestro país que reportan el aislamiento de miembros pertenecientes a este género. En éste 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 de plantas silvestres como los helechos y las bromelias, utilizando un enfoque taxonómico polifásico. Con base en las secuencias de los genes ARNr 16S, *atpD* y *recA* se confirmó 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*, con excepción de la cepa GB190, la cual podría representar una nueva especie al separarse de este grupo como lo demuestran los árboles filogenéticos. Con respecto a la caracterización fenotípica, las siete cepas de *Paraburkholderia* mostraron un crecimiento óptimo a una temperatura de 35 °C y un pH 6 en ausencia de NaCl. La tolerancia a distintas concentraciones de metales pesados (Co, Pb, Mo, Ni, Zn y V) fue diversa, así como en las pruebas de antibióticos. La cepa GB51 fue la única que creció en presencia de zinc hasta 200 ppm y en vanadio hasta 50 ppm, mientras que la cepa GB190 no creció a 39 °C y a un pH 4 pero fue la única cepa que si lo hizo en presencia de gentamicina a una concentración

de 1 µg/mL y kanamicina a 2.5 µg/mL, estas características fueron las que la diferenciaron del resto de los aislamientos.

**Palabras clave:** *Burkholderia* sensu lato, metales pesados, resistencia a antibióticos, filogenia, árboles maderables, plantas silvestres.

## ABSTRACT

The genus *Paraburkholderia* comprises more than 100 species, isolated from various environments such as plants, agricultural soils, volcanic soils, and even water bodies. Few studies in our country report the isolation of members belonging to this genus. In this work, we focus on the taxonomic position of seven rhizospheric strains belonging to the *Burkholderia* sensu lato group, all of them were isolated from timber trees such as pine and wild plants such as fern and bromeliads, in the municipality of Chignahuapan situated in the state of Puebla using an approach polyphasic taxonomic. Based on the sequences analysis of the 16S rRNA, *atpD*, and *recA* genes confirmed that all the strains belong to the genus *Paraburkholderia*, even GB45, GB51, GB53, GB62, GB152, and GB203 form a cluster with *Paraburkholderia sediminicola* and *Paraburkholderia aspalathi*, except for the GB190 strain, which might represent a new species of this genus because it is separated from this group, as shown by phylogenetic trees. Regarding the phenotypic characterization, the seven strains showed an optimal growth at at 35 °C and pH 6.0 in the absence of NaCl. The ability to tolerate different heavy metal concentrations (Co, Pb, Mo, Ni, Zn, and V) and antibiotics concentrations (ampicilin, gentamicin, tetracyclin, kanamycin, and chloramphenicol) was diverse. Only the GB51 strain grew in the presence of zinc ( $\leq 200$  ppm) and vanadium ( $\leq 50$  ppm). The GB190 strain was not able to grow at 39 °C and pH 4.0 but it was the only strain resistant to gentamicin (1 µg/mL) and kanamycin (2.5 µg/mL), characteristics that also differentiated it from the rest of the isolates.

**Keywords:** *Burkholderia* sensu lato, heavy metals, antibiotic resistance assay, phylogeny, timber trees, wild plants.

## INTRODUCCIÓN

Durante muchos años se han descrito nuevas especies bacterianas basadas en el análisis de un

conjunto muy limitado de aislados [1], 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. Lo anterior era cierto para muchas especies bacterianas, incluidas varias que pertenecen al grupo de *Burkholderia* sensu lato [2, 3]. 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 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 [3]. El género tipo, *Burkholderia* (s.l.), se encuentra constituido por más de 200 especies que habitan diferentes ambientes, como el agua y el suelo [4]. 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 [5]. Beukes y colaboradores (2017) utilizaron datos completos de las secuencias del genoma de 78 cepas tipo, mostrando, por un lado, una división formal entre las especies patógenas y las especies ambientales beneficiosas para las plantas (PBE) sobre la base de sus genomas centrales; por otro lado, resolvieron las relaciones filogenéticas y propusieron arreglos taxonómicos entre las especies de los géneros *Paraburkholderia* y *Caballeronia*. Además, a partir de este punto, sería considerado como perteneciente al grupo *Burkholderia* (s.l.) [6]. Posteriormente, la división de este grupo fue respaldada por Estrada-de los Santos y colaboradores (2018) aclarando las posiciones de diversas cepas dentro de *Burkholderia* (s.l.) desde un enfoque filogenómico basado en un análisis de máxima verosimilitud de genes conservados de más de 100 especies [3].

*Paraburkholderia* es un género de  $\beta$ -proteobacterias, Gram-negativas, bacilos rectos o ligeramente curvados, 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 102 especies identificadas en diversos ambientes, incluidos suelos agrícolas, suelos volcánicos, agua y plantas [7, 4]. A diferencia de las especies de *Burkholderia* (s.s.), los

miembros de *Paraburkholderia* no se asocian comúnmente con infecciones humanas. 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* (s.s), en combinación con el hallazgo de secuencias conservadas de insertos y deleciones (Conserved Signature Indels, CSI) que son exclusivas de las especies de *Paraburkholderia*. Los CSI en proteínas que distinguen este género como son: transposasa A, glicosiltransferasa del grupo 1, undecaprenilfosfato glucosa fosfotransferasa y monooxigenasa 4-hidroxiacetofenona fueron descritas por Sawana y colaboradores [8]. Con respecto al contenido en C+G, los miembros de este clado asociado a plantas muestran diferencias en su genoma con respecto a miembros del género *Burkholderia* (s.l), oscilando la proporción de guaninas y citosinas entre 59-65%, distinguiéndose del género *Burkholderia* (s.l.) (fitopatógenos o patógenos oportunistas de mamíferos) que presentan un alto contenido de G+C, mayor a 65%. Además, se han reportado especies del género *Paraburkholderia* con potencial para el control biológico, biorremediación o bacterias que promueven fijación de nitrógeno en plantas [9]. La rizósfera es el hábitat más frecuente de

*Paraburkholderia* [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16] y 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 [17].

En México, se han identificado especies diazotróficas del género *Paraburkholderia* 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 nitrógeno exhibieron actividades relacionadas a biorremediación, promoción del crecimiento vegetal y control biológico *in vitro*. *P. 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 [10]. 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 [18]. En Oaxaca, se lograron aislar de suelo de un campo de maíz algunas cepas de *Burkholderia* sp. endófitas fijadoras de nitrógeno, y, además, se aislaron otras identificados como *P. tropica* a partir de plantas de maíz en Tlayacapan, Morelos y Coatepec, Veracruz [13].

Nuestro grupo de investigación recolectó muestras de suelos rizosféricos a partir de

plantas silvestres y especies maderables en el municipio de Chignahuapan, Puebla. Antonio-Flores (2015) [19] y Cervantes-Álvarez (2016) [20], aislaron e identificaron cepas bacterianas mediante secuenciación y análisis filogenético del gen ribosomal 16S demostrando que los aislados GB45, GB51, GB53, GB62, GB152, GB190 y GB203 pertenecen al grupo *Burkholderia* (s.l), además, están estrechamente relacionados con las cepas tipo: *Paraburkholderia sediminicola* y *Paraburkholderia aspalathi*, aisladas de sedimento de agua dulce y de nódulos de raíces de una leguminosa, respectivamente [21, 22]. La existencia de pocos estudios que evidencien la presencia de este género asociado a un mayor número de plantas, impulsan este trabajo para ampliar el conocimiento de este género con la finalidad de elucidar que ciertas especies no solo son propias de cuerpos de agua o asociadas a leguminosas. Por lo anterior, se plantea aportar conocimiento de su presencia e identificación a través de una taxonomía preliminar de estas siete cepas, miembros del género *Paraburkholderia* aisladas en el Estado de Puebla, proponiéndose como objetivos: i) evaluar el crecimiento de las cepas rizosféricas de acuerdo con algunos parámetros fisicoquímicos y bioquímicos; ii) determinar el grado de tolerancia a metales pesados de las cepas rizosféricas y la resistencia antibiótica de

las cepas rizosféricas; iii) identificar las cepas a partir del análisis filogenético del gen 16S y de los genes de mantenimiento: *recA* y *atpD*.

## METODOLOGÍA

### Material biológico

Se reactivaron las siete cepas aisladas de rizósfera de pino (GB190, GB203), y helecho (GB45, GB51, GB53, GB62) y bromelia (GB152) en medio de cultivo Luria Bertani (LB), y un medio semi-selectivo para el género *Burkholderia* y *Pseudomonas cepacia* (PCAT) [23].

### Caracterización fenotípica

Se evaluó durante cinco días el crecimiento de las siete cepas bajo diferentes parámetros: temperatura (30, 35 y 39 °C, incubación 120 h), pH (4, 6, 7; incubación 72 h) y salinidad (1, 2, 3% NaCl; incubación 72 h). También se realizaron algunas pruebas bioquímicas clave para identificar cepas *Paraburkholderia* sp. (asimilación de carbohidratos como D-manosa, D-sorbitol, prueba citrato, oxidación D-gluconato, actividad hemolítica). Por otro lado, se determinó el grado de tolerancia de las cepas rizosféricas a metales pesados en presencia de diferentes concentraciones de estos en agar nutritivo: Ni (25, 50, 100, 200, 250 y 300 ppm), Co (25, 50, 100 y 200 ppm), Mo (250 y 300 ppm), Zn (25, 50 100 y 200 ppm), Pb (25, 50,

100, 200, 250 y 300 pm) y V (25, 50, 100 y 200 ppm). También se probó su resistencia antibiótica: Amp (10, 20, 50, 100 y 150 µg/mL), Cm (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 20 µg/mL), Gm (1, 2.5, 5 y 7.5 µg/mL), Tc (2.5, 5, 10, 15 y 20 µg/mL) y Km (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 20 µg/mL). La cepa *Pseudomonas putida* KT2440 se utilizó como control positivo para los ensayos de tolerancia a metales y resistencia antibiótica. Todos ensayos se realizaron por triplicado.

### Caracterización genotípica

Primeramente, se realizó la extracción del ADN genómico de las cepas utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para amplificar los genes de mantenimiento *recA* y *atpD* se utilizaron los cebadores reportados por Spilker *et al* [24]: *recAF* (5'-AGGACGATTCATGGAAGAWAGC) y *recAR* (5'-GACGCACYGAYGMRTAGAACTT), *atpDF* (5'-ATGAGTACTRCTGCTTTGGGTAGAA GG), *atpDR* (5'-CGTGAAACGGTAGATGTTG TCG), generando un amplicón de 704 y 756 pb, respectivamente. 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 s, seguido por la temperatura de alineamiento (58 °C para el gen *recA* y 56 °C para el gen *atpD*) 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 de etidio, y luego, se procedió a cortar la banda correspondiente al tamaño del amplicón. La secuenciación se llevó a cabo en la empresa Macrogen Korean (<https://dna.macrogen.com/esp/>). Otras secuencias del gen ARNr 16S utilizadas en este trabajo fueron obtenidas a partir de los estudios realizados por Cervantes-Álvarez [20].

### 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 con 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 [25] y GeneDoc 2.7 [26]. Las alineaciones individuales se concatenaron

utilizando DnaSP v5 [27] con los parámetros establecidos. Los árboles filogenéticos fueron construidos mediante el método de inferencia de Neighbor-Joining con base en distancias maximum composite likelihood y por el método de máxima verosimilitud mediante el modelo de sustitución Tamura-Nei usando 1,000 réplicas de arranque con el programa MEGA v7 [28].

## RESULTADOS

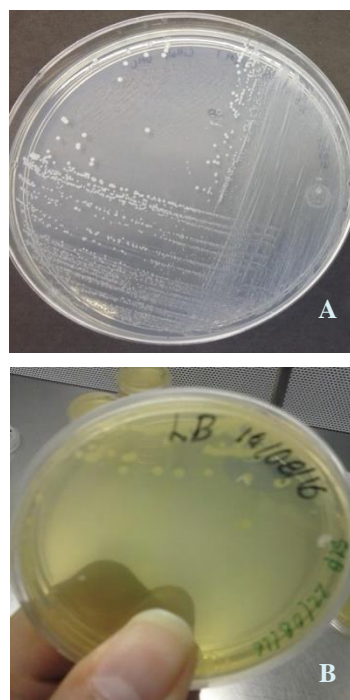
### Caracterización fenotípica

Para su reactivación las colonias cultivadas en medio sólido PCAT y LB, presentaron morfología colonial blanca, cremosa y puntiforme (Figura 1). Con excepción de la cepa GB190 que, además de presentar estas tres características, se observó un halo transparente alrededor de la colonia.

Los resultados de los ensayos con respecto a la evaluación del crecimiento de las siete cepas bajo diferentes parámetros como temperatura, salinidad, pH, asimilación de carbohidratos y actividad hemolítica se muestran en la tabla 1.

Al evaluar la tolerancia a metales en las siete cepas se registraron diferentes grados de tolerancia dependiendo del metal, su concentración y de la cepa. Las siete cepas crecieron hasta una concentración máxima de níquel de 250 ppm; sin embargo, solo la cepa *P. putida* KT2440 (control positivo) creció bajo la

concentración de 300 ppm. Para el cobalto, las siete cepas solo fueron capaces de crecer en presencia de 25 y 50 ppm, y la cepa control positivo en 100 ppm pero no a 200 ppm. En el caso del zinc, todas las cepas crecieron bajo las concentraciones de 25 y 50 ppm, y solo la cepa GB51 y la cepa control positivo crecieron en 100 y 200 ppm.



**Figura 1.** Colonias de color blanco cremoso y mucoide en medio PCAT (A) y medio LB (B).

Todas las cepas crecieron en presencia de vanadio (25 ppm) y solo la cepa GB51 creció en 50 ppm. La cepa *P. putida* KT2440 creció bajo todas las concentraciones evaluadas para vanadio (25, 50, 100 y 200 ppm). Molibdeno y plomo, fueron los únicos metales que no mostraron afectación en el crecimiento de todas

las cepas bajo las concentraciones evaluadas (25, 50, 100, 200, 250 y 300 ppm), incluyendo al control positivo.

En la tabla 2 se muestra los resultados que

distinguen las diferencias entre las cepas en presencia de metales pesados bajo diferentes concentraciones.

**Tabla 1.** Resultados de las pruebas fenotípicas.

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. sediminicola</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)	++	++	++	+	+	+	+	+	+
<b>Asimilación de carbohidratos:</b>									
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidación D-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Actividad hemolítica	[γ]	[γ]	[γ]	[γ]	[γ]	[γ]	[γ]	ND	ND

++, Condición óptima de crecimiento; +, crecimiento; -, cepa negativa; ND, no determinado.

[γ] Hemólisis gamma

**Tabla 2.** Resistencia a metales pesados de los aislamientos bacterianos.

Código de cepas/Tipo de metal	GB190	GB51	GB203	GB62	GB45	GB53	GB152	<i>P. putida</i> KT2440
Níquel 250 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+
Níquel 300 ppm	-	-	-	-	-	-	-	+
Cobalto 50 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+
Cobalto 100 ppm	-	-	-	-	-	-	-	+
Molibdeno 300 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+
Zinc 200 ppm	-	+	-	-	-	-	-	+
Plomo 300 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+
Vanadio 50 ppm	-	+	-	-	-	-	-	+
Vanadio 200 ppm	-	-	-	-	-	-	-	+

+, crecimiento; -, no crecimiento; ND, no determinado

Los resultados del ensayo de resistencia a antibióticos se muestran en la tabla 3, la ampicilina y el cloranfenicol, mostraron algunas coincidencias con lo reportado de las cepas tipo *P. aspalathi* y *P. sediminicola*. Fue el caso de todas las concentraciones evaluadas para la ampicilina, con excepción de las cepas GB51 y GB62, en las cuales no se observó crecimiento bajo la concentración de 150 µg/mL. Para el caso del cloranfenicol, solo *P. aspalathi* ha reportado sensibilidad a este antibiótico y *P. sediminicola* está reportada por su resistencia a cloranfenicol a la concentración de 5 µg/mL, lo que coincidió con dos cepas

evaluadas (GB62 y GB53). Además, se observó crecimiento de las cepas (GB45, GB51, GB152, GB190 y GB203) bajo las concentraciones de cloranfenicol evaluadas, excepto en 20 µg/mL. La cepa *P. putida* KT2440 utilizada como control positivo creció bajo todas las concentraciones de ampicilina y cloranfenicol evaluadas. De las siete cepas evaluadas, únicamente la cepa GB190 creció bajo la concentración de gentamicina más baja (1 µg/mL) y en la cepa control positivo se observó crecimiento en 1 y 2.5 µg/mL. La tetraciclina fue el único antibiótico en el cual no se registró crecimiento para las siete cepas evaluadas bajo

ninguna concentración, y solo el control positivo creció en la concentración más baja (2.5 µg/mL). La cepa GB190 fue la única cepa que creció bajo la concentración de 1 y 2.5 µg/mL de kanamicina. El control positivo solo

creció en la concentración más baja de este antibiótico (1 µg/mL). Según la literatura, las cepas tipo, *P. sediminicola* y *P. aspalathi*, son sensibles a la presencia de gentamicina, tetraciclina y kanamicina [21, 22].

**Tabla 3.** Resistencia de antibióticos de las siete cepas bacterianas.

Código de cepas / Antibiótico	GB190	GB51	GB203	GB62	GB45	GB53	GB152	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. aspalathi</i>	<i>P. sediminicola</i>
Ampicilina 10 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ampicilina 150 µg/ml	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Cloranfenicol 1 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Cloranfenicol 15 µg/ml	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Gentamicina 1 µg/ml	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gentamicina 2.5 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Tetraciclina 2.5µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Kanamicina 1 µg/ml	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Kanamicina 2.5 µg/ml	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+, crecimiento; -, cepa negativa; ND, no determinado

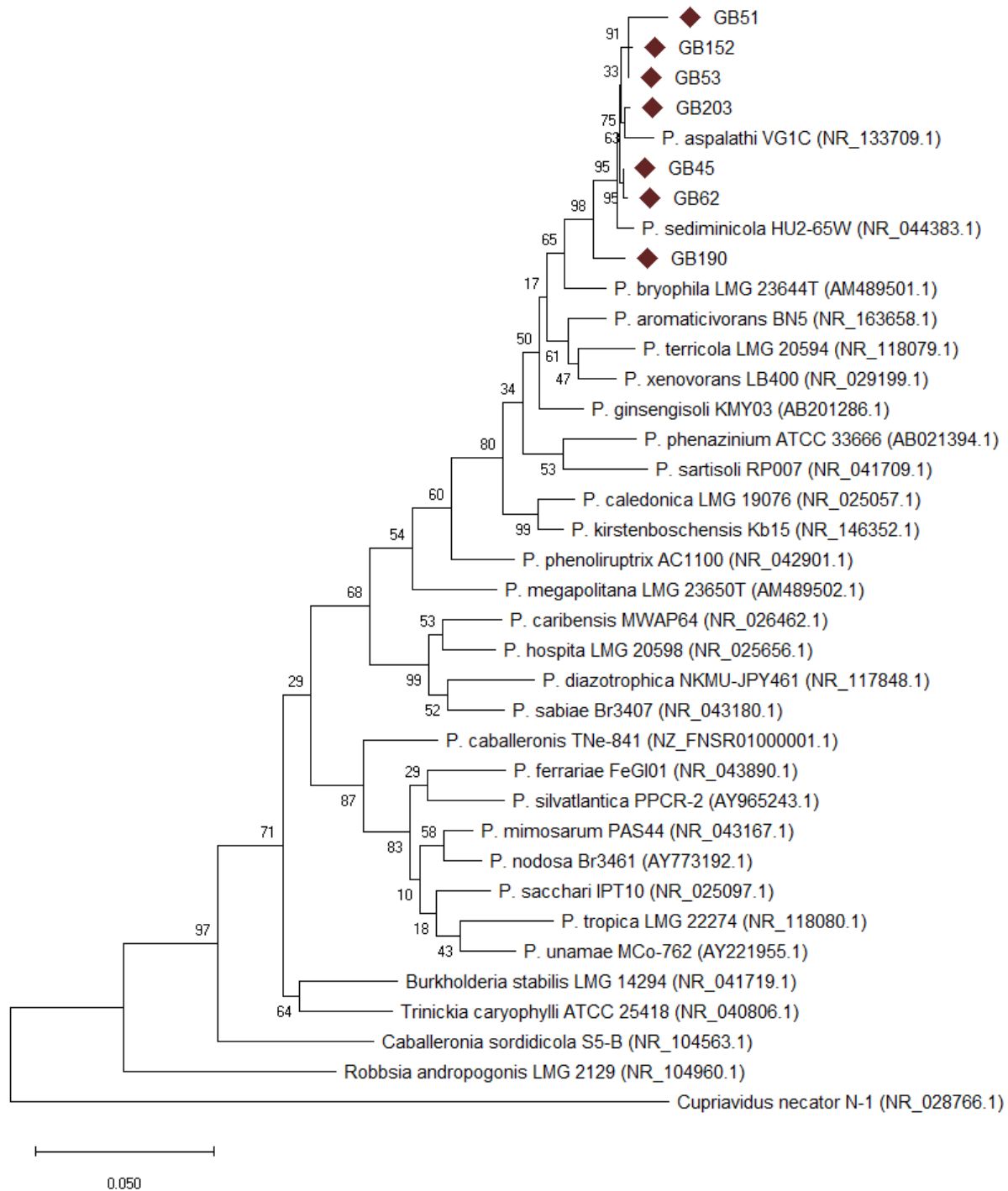
## Caracterización genotípica

La identificación genotípica de las siete cepas se verificó mediante la amplificación de los genes de mantenimiento: *recA* y *atpD* utilizando a la cepa control *Paraburkholderia unamae* MT1-641, y la secuenciación. Los amplicones obtenidos y visualizados de 704 pb para el gen *recA* y 756 pb para el gen *atpD* se identificaron como *Burkholderia* spp. que coincide con lo establecido por Spilker *et al.* [24]. Al comparar por BLAST las secuencias del ARNr 16S (~1380 pb) de las siete cepas con la base de datos de nucleótidos de NCBI mostraron que se agrupaban con 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 99.55% con *B. phytofirmans* y con *P. caledonica* el 99.35%, así mismo, la cepa GB190 se alineó con otros siete aislados identificados como *Paraburkholderia* sp. en el GenBank (NCBI), como es el caso de la cepa PA-G9 y PA-C10 con un porcentaje de identidad del 99.50% y 99.21%, respectivamente. En todos los casos el valor de expectancia E (E-value) fue de 0.0.

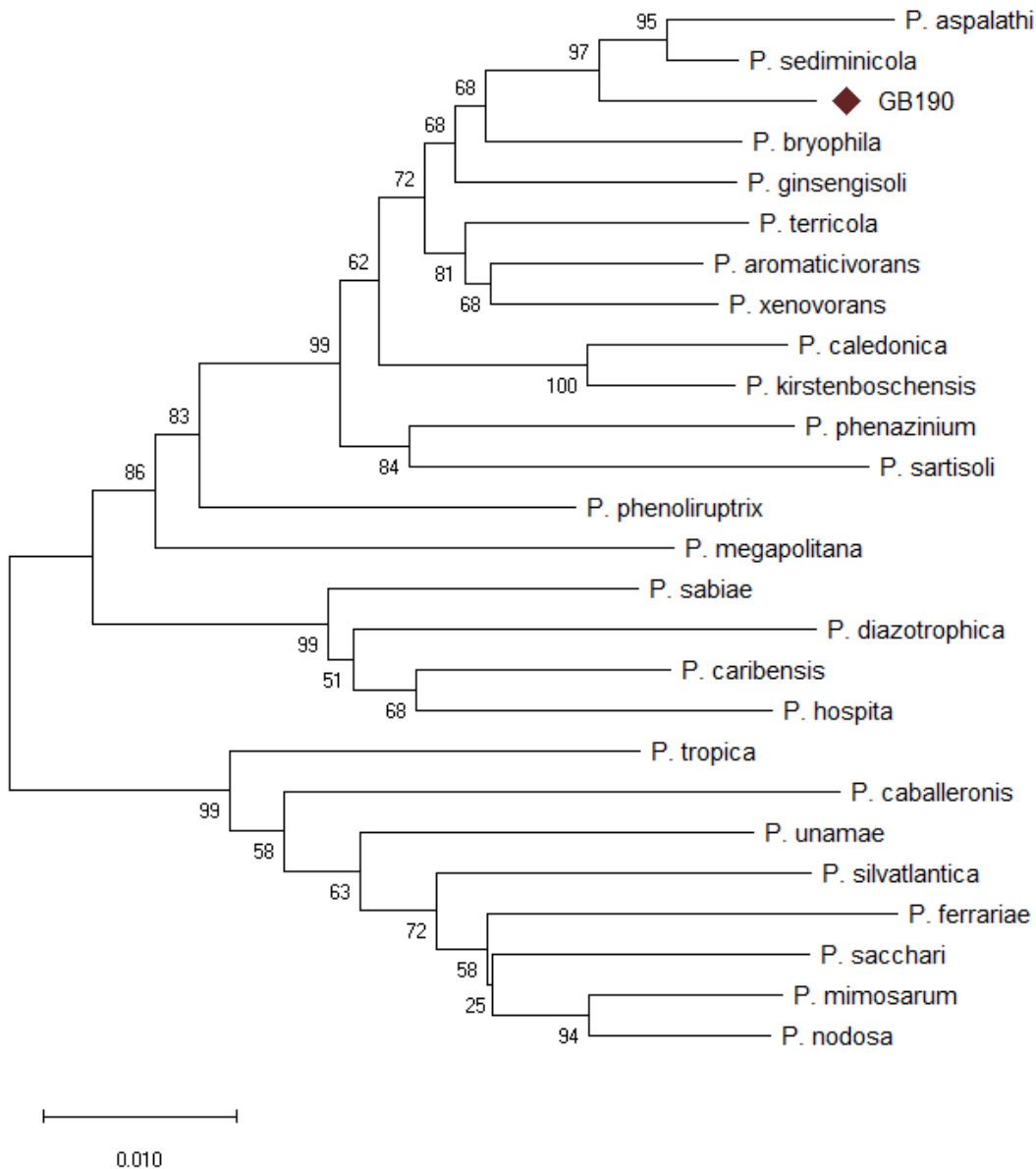
## Construcción y análisis de los árboles filogenéticos

Cervantes-Álvarez (2016) [20], evidenció un bajo poder de discriminación cuando se genera una filogenia a partir del gen marcador ARNr 16S, el cual es sumamente conservado en el grupo *Burkholderia* (s.l), con los siete aislamientos de este estudio, debido a la cercanía genética unos de otros obteniendo un árbol filogenético poco resuelto. Sin embargo, al construir el árbol filogenético con las secuencias de los genes *recA* y *atpD* (material suplementario), así como también con las secuencias concatenadas parciales de los tres genes de mantenimiento; ARNr 16S, *recA* y *atpD* (2135 pb), se observa que las cepas GB45, GB53, GB62, GB152 y GB203 e incluso GB51, se posicionaron muy cerca de *P. aspalathi* VG1C y *P. sediminicola* HU2-65W. En cuanto a la cepa GB190 se observó fuera de este clúster aún, con un bootstrap del 98% (Fig. 2).

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 separada de las dos especies de *Paraburkholderia* (Figura 3).



**Figura 2.** Árbol filogenético 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. El árbol se enraizó con *Cupriavidus necator* (Bootstrap de 1000 repeticiones). El rombo muestra las cepas de interés.



**Figura 3.** 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*. (Bootstrap de 1000 repeticiones, sin enraizar). El rombo muestra las cepas de interés.

## DISCUSIÓN

La morfología colonial que exhibieron las siete cepas en medios PCAT y LB coincide con lo

reportado para *Paraburkholderia sedimicola* y *Paraburkholderia aspalathi* [21, 22]. No obstante, GB190 además de presentar las tres

características morfológicas (blanca, cremosa y puntiforme), **mostró** un halo transparente alrededor de la colonia lo que la distingue del resto. De igual modo, para el ensayo de temperatura, en particular a 39 °C, después de 96 h de incubación, la cepa GB190 no creció a diferencia del resto de las cepas que presentaron ligero crecimiento. 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 [22]. 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 [21]. Como resultado de este estudio, se observó un crecimiento óptimo a una temperatura de 35 °C después de 48 h de incubación, considerando que esta temperatura está dentro del rango de temperaturas propia que caracterizan a bacterias mesófilas en el suelo (30-39 °C) [29]. Además, se observó que entre más alta la temperatura, los aislados tardaban más en crecer, infiriendo que las bacterias quizás pueden sobrevivir, pero por un tiempo determinado no hay división celular sino hasta después de su adaptación, conllevando a una recuperación y comenzando 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 [30]. Razones por las cuales, la temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en la proliferación y mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos.

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, mostraron cierta sensibilidad en presencia de cloruro de sodio, dependiendo la cepa, y 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 [22], para *P. aspalathi* en una concentración del 1% al 10% [21], *P. sartisoli* crece a una concentración de 0.5% [14], sin embargo, el crecimiento óptimo es en ausencia de NaCl para estas tres especies, así como para las siete cepas estudiadas. 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 [31] demostrando que altas concentraciones de NaCl, por encima de 10g/L, influyen negativamente en el crecimiento bacteriano de *Burkholderia gladioli* y *Paraburkholderia heleia* asociadas a plantas de caña de azúcar cultivadas en Pernambuco, Brasil; a pesar de que *B. gladioli* presentó más tolerancia a la salinidad que *P. heleia*. Como un efecto indirecto, Pereira y colaboradores, observaron que altas concentraciones de NaCl (> 25 g/L) influye negativamente en la producción del ácido indol acético *in vitro* e 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. Las siete cepas utilizadas en este estudio se aislaron en un rango de pH (5.2–5.8). Con respecto a *P. sediminicola* 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. 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 [10] y *P. unamae*, la cual fue aislada de la rizósfera en un rango de pH de 4.5–7 [18]. *P. acidipaludis* y *P. heleia* fueron aisladas a partir de la planta *Eleocharis dulcis*, la cual crece en pantanos altamente ácidos (pH 2–4) [15]. Por ende, es posible que un determinado rango de pH favorezca el establecimiento de ciertas especies pertenecientes al género.

Se conoce que la base de agar sangre es adecuada para aislar y cultivar diversos microorganismos de difícil crecimiento y posibles bacterias que podrían afectar la salud humana, y en este caso se utilizó como una prueba indirecta para vislumbrar la posibilidad de que los aislados fueran agentes patógenos en mamíferos o humanos. 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. En el género

*Burkholderia sensu stricto* algunas cepas han mostrado actividad hemolítica, aun siendo aisladas del ambiente y con potencial biotecnológico. A la fecha, ha sido claro que el linaje *Paraburkholderia* no contiene cepas patógenas, estudios de análisis de genómica comparativa han validado su potencial no patogénico, lo cual establece la posibilidad de su uso como promotoras de crecimiento en plantas, manejo de enfermedades y otras aplicaciones biotecnológicas [32].

Por otra parte, en la prueba de metales 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. 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. Los resultados mostraron que estas cepas bacterianas pueden estar bajo concentraciones elevadas de diversos metales pesados, y esto podría deberse a las diferencias en la estructura de su pared celular o variaciones en sus mecanismos de resistencia. A pesar de que a la fecha no existen evidencias experimentales de la tolerancia a metales pesados de las cepas. *P. sediminicula* y *P. aspalathi*, existen diversos reportes sobre *Burkholderia* (s.l) capaces de crecer en presencia de metales pesados, como *Burkholderia* sp. J62 la cual fue la mejor

solubilizando el plomo y el cadmio en cultivo en disolución [33]. Otras especies que son capaces de inmovilizar metales pesados y reducir su translocación en las plantas mediante precipitación, formación de complejos y adsorción, promueven el crecimiento en plantas. Por ejemplo, *Burkholderia gladioli* en la mitigación del estrés por cadmio en *Lycopersicon esculentum* [34] 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 [35]. 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 ha observado la producción de sustancias poliméricas extracelulares que se unen fuertemente a los metales. Los exopolímeros microbianos, los cuales están compuestos de residuos de azúcares que son secretados al medio circundante, son particularmente eficientes en la unión de metales pesados, como plomo, cadmio y uranio, coadyuvando en la absorción de metales pesados para células bacterianas en ambientes naturales [36]. En el caso particular de *Burkholderia cepacia* GYP1, la cual se aisló de suelos agrícolas contaminados con metales pesados, Zhang y colaboradores evidenciaron

que esta cepa bajo condiciones oligotróficas, es decir, un ambiente en donde existen bajas concentraciones de fuentes de carbono, fosfatos, nitratos y hierro, tuvo una alta capacidad de acumulación de cadmio de hasta 116 mg/g de biomasa (peso seco) al producir estas sustancias poliméricas extracelulares [37].

Por otro lado, este estudio reveló que las siete cepas no mostraron sensibilidad hacia dos antibióticos, ampicilina y cloranfenicol, y ninguna de ellas creció en presencia de tetraciclina. Solo GB190 fue capaz de crecer en kanamicina (1 y 2.5 µg/ml) y gentamicina (1 µg/ml), diferencias que podrían ser aprovechadas para ser utilizadas como marcador para evaluar su supervivencia en experimentación posterior, si fuera el caso. 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 [38], no obstante, existen diversos estudios que han reportado la sensibilidad a aminoglicósidos, como son la gentamicina, kanamicina, en cepas pertenecientes al género *Paraburkholderia* [39, 40, 41].

Entre los marcadores moleculares, los genes constitutivos *recA* y *atpD*, han sido ampliamente adoptados en estudios

filogenéticos y taxonómicos dentro del grupo *Burkholderia* (s.l), incluido la reclasificación reciente de las especies ambientales de *Paraburkholderia* [8, 42]. En este estudio, las topologías de los árboles filogenéticos obtenidos, por una parte, muestran la estrecha relación de cinco de las siete cepas utilizadas en este estudio con *P. sediminicola* y *P. aspalathi*, y, además, que la cepa GB190 en ambas topologías, se distingue claramente fuera de este grupo, representando un linaje separado, sugiriendo que representa una nueva especie. De igual modo, se evidenció una similar posición taxonómica de la cepa GB190 cuando se realizó la filogenia a partir de los genes de mantenimiento por separado (Material suplementario).

## CONCLUSIONES

Los aislados utilizados en este estudio presentaron una morfología colonial muy similar, caracterizándose por ser de color blanco y cremoso como el género *Paraburkholderia*, a excepción del aislado GB190 que mostró en su fenotipo un halo transparente alrededor de la colonia blanca y cremosa en medio PCAT. Todas las cepas crecieron a 35 °C y a un pH 6 y mostraron sensibilidad en presencia de NaCl, incluso al 1% como fue el caso para las cepas GB51 y GB190. Al evaluarse la actividad hemolítica,

todas las cepas mostraron hemólisis tipo gamma, es decir, ninguna fue capaz de realizar hemólisis ya que no hubo halo alrededor de la colonia. De las cinco fuentes de carbono; solo el citrato fue utilizado por las siete cepas. GB51 toleró concentraciones de 200 ppm de zinc y 50 ppm de vanadio. La cepa GB190 presentó ciertas diferencias con las demás cepas, por ejemplo; a pesar de ser aislada del mismo 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 (1 µg/mL) y kanamicina (2.5µg/mL). La amplificación de los genes *atpD* y *recA* sirvieron como base para elucidar las relaciones filogenéticas entre las cepas y las especies de *Paraburkholderia*. Las características fenotípicas y genotípicas permitieron distinguir a GB190 como posible nueva especie perteneciente al género *Paraburkholderia*. Las cepas GB45, GB51, GB53 GB62 y GB152 se identifican como *Paraburkholderia sediminicola*, y GB203 como *Parburkholderia aspalathi*.

### CONFLICTO DE INTERESES

Se declara que no existe un conflicto de intereses por parte de los autores.

### AGRADECIMIENTOS

La cepa *Pseudomonas putida* KT2440 fue proporcionada amablemente por el grupo “Ecology and Survival of Microorganisms”,

Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (CICM-ICUAP).

Se agradece el apoyo brindado por la Dra. Guadalupe Rocha-Bonilla en la instrucción bioinformática.

Los autores también agradecen a la VIEP-BUAP por el apoyo para realizar este trabajo. Así mismo, la primera autora agradece el apoyo y la participación en el programa “Jóvenes Investigadores”.

### REFERENCIAS

- [1]. Rosselló-Mora, R., Amann, R. The species concept for prokaryotes. FEMS microbiology reviews. 2001;25(1), 39-67.
- [2]. Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-De Los Santos P, Martínez-Aguilar L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Appl Environ Microbiol. 2007;73(16):5308–19.
- [3]. Estrada-de los Santos P, Palmer M, Chávez-Ramírez B, Beukes C, Steenkamp ET, Briscoe L, *et al.* 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 (Basel). 2018;9(8).



- [4]. Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:590–592.
- [5]. Estrada-De los Santos P. Taxonomía del género *Burkholderia* sensu lato. *Alianzas y Tendencias-BUAP*. 2019;4(14): 11-29.
- [6]. Beukes CW, Palmer M, Manyaka P, Chan WY, Avontuur JR, van Zyl E, et al. Genome data provides high support for generic boundaries in *Burkholderia* sensu lato. *Front Microbiol*. 2017;8(JUN):1–12.
- [7]. Weber CF, King GM. Volcanic soils as sources of novel CO-oxidizing *Paraburkholderia* and *Burkholderia*: *Paraburkholderia hiiakae* sp. nov., *Paraburkholderia metrosideri* sp. nov., *Paraburkholderia paradisi* sp. nov., *Paraburkholderia peleae* sp. nov., and *Burkholderia alpina* sp. nov. a member of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Front. Microbiol*. 2017; 8(207):1-10.
- [8]. Sawana A, Adeolu M, Gupta RS. 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. *Front Genet*. 2014;5(NOV):1–22.
- [9]. Gyaneshwar, P, Hirsch, AM, Moulin, L, Chen, WM, Elliott, GN, Bontemps, C, et al. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular plant-microbe interactions*. 2011;24(11), 1276-1288.
- [10]. Reis VM, Estrada-de los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, *et al.* *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(6):2155–62.
- [11]. Sessitsch A, Coenye T, Sturz A V., Vandamme P, Barka EA, Salles JF, *et al.* *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55(3):1187–92.
- [12]. Kim H Bin, Park MJ, Yang HC, An DS, Jin HZ, Yang DC. *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., a  $\beta$ -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(11):2529–33.
- [13]. Perin L, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Baldani JI, Estrada-de los Santos P, Reis VM, *et al.* *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(8):1931–7.
- [14]. Vanlaere E, van der Meer JR, Falsen E, Salles JF, de Brandt E, Vandamme P.

*Burkholderia sartisoli* sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58(2):420–3.

[15]. Aizawa T, Ve NB, Vijarnsorn P, Nakajima M, Sunairi M. *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminium-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 60(9):2036–41.

[16]. Wong-Villarreal A, Caballero-Mellado J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. *Syst Appl Microbiol.* 2010;33(1):35–43.

[17]. Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK, Venturi V. Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia*. *Microb Ecol.* 2012;63(2):249–66.

[18]. Caballero-Mellado J, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Estrada-de los Santos P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54(4):1165–72.

[19]. Antonio-Flores AL. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes al

género de *Burkholderia* sp., en dos regiones del Estado de Puebla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: Facultad de Ciencias Químicas, Puebla, Puebla, Mayo 2015

[20]. Cervantes-Álvarez I. Diversidad y filogenia de *Burkholderia* sp. aisladas en diferentes regiones del estado de Puebla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Puebla, Puebla, Noviembre 2016.

[21]. Mavengere NR, Ellis AG, Le Roux JJ. *Burkholderia aspalathi* sp. nov., isolated from root nodules of the South African legume *Aspalathus abietina* Thunb. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(PART 6):1906–12.

[22]. Lim JH, Baek SH, Lee ST. *Burkholderia sediminicola* sp. nov., isolated from freshwater sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58: 565-9.

[23]. Pallud C, Viallard V, Balandreau J, Normand P, Grundmann G. Combined use of a specific probe and PCAT medium to study *Burkholderia* in soil. *J Microbiol Methods.* 2001;47(1):25-34

[24]. Spilker T, Baldwin A, Bumford A, Dowson CG, Mahenthalingam E, LiPuma JJ. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *J Clin Microbiol.* 2009;47(8):2607-2610.

- [25]. Larkin, MA, Blackshields, G, Brown, NP, Chenna, R, McGettigan, PA, McWilliam, H, Valentin, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23. 2947-2948.
- [26]. Nicholas, K, Nicholas, HB. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW. NEWS* 4, 14, 0. 88.
- [27]. Librado, PJR, Rozas, Julio. DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2009;25.
- [28]. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-4.
- [29]. Schiraldi C., De Rosa M. Mesophilic Organisms. In: Drioli E., Giorno L. (eds). *Encyclopedia of Membranes*. 2014. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [30]. Paksanont S, Sintiprungrat K, Yimthin T, Pumirat P, Peacock SJ, Chantratita N. Effect of temperature on *Burkholderia pseudomallei* growth, proteomic changes, motility and resistance to stress environments. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–13.
- [31]. Pereira ADA, Silva MDB, Oliveira JDS, Ramos ADS, Freire MBGS, Freire FJ, Kuklinsky-Sobral J. Salinity influence on the growth and production of indole acetic acid by endophytic *Burkholderia* spp. from sugarcane. *Bioscience J*. 2012;28(1):112-21.
- [32]. Manna M, Park I, Seo YS. Genomic Features and Insights into the Taxonomy, Virulence, and Benevolence of Plant-Associated *Burkholderia* Species. *Int J Mol Sci*. 2018 29;20(1):121.
- [33]. Jiang C yu, Sheng X fang, Qian M, Wang Q ya. 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*. 2008;72(2):157–64.
- [34]. Khanna K, Jamwal VL, Gandhi SG, Ohri P, Bhardwaj R. Metal resistant PGPR lowered Cd uptake and expression of metal transporter genes with improved growth and photosynthetic pigments in *Lycopersicon esculentum* under metal toxicity. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–14.
- [35]. Kang SM, Shahzad R, Bilal S, Khan AL, You YH, Lee WH, et al. Metabolism-mediated induction of zinc tolerance in *Brassica rapa* by *Burkholderia cepacia* CS2-1. *J Microbiol*. 2017;55(12):955–65.
- [36]. Nocelli N, Bogino PC, Banchio E, Giordano W. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. *Materials*. 2016 Jun;9(6):418.

- [37]. Zhang, J., Li, Q., Zeng, Y., Zhang, J., Lu, G., Dang, Z., & Guo, C. Bioaccumulation and distribution of cadmium by *Burkholderia cepacia* GYP1 under oligotrophic condition and mechanism analysis at proteome level. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;176, 162–169.
- [38]. Quintiliani, R. Jr., Courvalin, P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In *Manual of Clinical Microbiology* (P. Murray, E.J. Barron, M. Pfaller, F. Tenover and R.H. Tenover, eds). Washington: ASM Press; 1995; 1308–1320.
- [39]. Gao Z, Yuan Y, Xu L, Liu R, Chen M, Zhang C. *Paraburkholderia caffeinilytica* sp. nov., isolated from the soil of a tea plantation. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(10):4185–90.
- [40]. Kim S, Gong G, Woo HM, Kim Y, Um Y. *Burkholderia jirisanensis* sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(3):1260–7.
- [41]. De Meyer SE, Cnockaert M, Moulin L, Howieson JG, Vandamme P. Symbiotic and non-symbiotic *Paraburkholderia* isolated from south african *Lebeckia ambigua* root nodules and the description of *Paraburkholderia fynbosensis* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018;68(8):2607–14
- [42]. Dobritsa AP, Samadpour M. 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*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(8):2836–46.