



---

## BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA

Facultad de Cs. Químicas  
Departamento de Microbiología

**“Aislamiento e Identificación de especies pertenecientes al género de  
*Burkholderia sp.*, en dos regiones del Estado de Puebla”**

TESIS

Para obtener el Título de:  
Lic. Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:  
Ana Laura Antonio Flores

DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Vianey Marín Cevada  
Dr. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

ASESOR DE TESIS:  
Dra. Ana Marta de los Ángeles Lobo Sánchez

H. Puebla de Zaragoza. Mayo, 2015.

*Me alegrare en el camino de tus mandatos,  
más que en todas las riquezas.  
Meditare en tus preceptos  
y pondré mi atención en tus caminos.  
Me alegro con tus leyes  
y no me olvidaré de tu palabra.  
Sal 119:14-16*

AGRADECIMIENTOS:

*Ha sido un año lleno de esfuerzos y sacrificios, cerrando etapas, me queda agradecer principalmente a Dios por permitirme llegar a esta instancia del camino, en donde me vuelvo una persona profesional*

*Agradezco su amor y espero nunca soltarme de su mano.*

*A mis padres y hermanos por ser los co-autores de todo proceso y por contribuir día a día con sus palabras de apoyo a lograr este, mi sueño.*

*Y mi más sincero y especial agradecimiento a mi asesora de Tesis, Dra. Dianey Marín Cevada, por su gran apoyo, por su comprensión y por siempre guiarme durante el desarrollo de este trabajo.*

*Agradezco también, la beca otorgada por medio del programa, Fortalecimiento del cuerpo académico "Biotecnología Microbiana", otorgada durante los meses de febrero a mayo 2015*

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.

## INDICE

I.	Introducción	1
II.	Marco Teórico	2
	- Generalidades: Dominio Bacteria	2
	- Taxonomía de las Proteobacterias	2
	- Diversidad bacteriana	2
III.	Marco de referencia	5
	- Generalidades del género <i>Burkholderia</i>	5
	- Taxonomía del género <i>Burkholderia</i>	5
	- Hábitat del género <i>Burkholderia</i>	8
IV.	Planteamiento del problema	10
V.	Justificación	11
VI.	Objetivos	12
	- Objetivos específicos	12
VII.	Diseño de la investigación	13
	- Localización del muestreo	13
	o Clima	13
	o Altitud	14
	o Zona de muestreo	14
	- Características de muestreo	15
VIII.	Material y Métodos	16
	- Aislamiento y caracterización fenotípica	16
	- Caracterización genotípica	16
	- Digestión con enzimas de restricción “ <i>in silico</i> ”	17

-	ARDRA ( <i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i> )	17
-	Análisis de ARDRA	18
IX.	Diagrama de trabajo general	19
X.	Resultados y Discusión	20
-	Muestreo	20
-	Nomenclatura	23
-	Aislamiento e identificación preliminar	25
-	Caracterización fenotípica	26
-	Caracterización genotípica	28
-	ARDRA ( <i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i> )	29
-	Análisis de ARDRA	32
XI.	Conclusiones	37
XII.	Bibliografía	38
XIII.	Apéndice I	46
XIV.	Apéndice II	51
XV.	Apéndice III	52
XVI.	Apéndice IV	55

## I. INTRODUCCIÓN

El análisis de la diversidad bacteriana en diferentes ambientes ha conducido a la identificación de organismos importantes para la agricultura, industria, medicina y biotecnología.

El género *Burkholderia* tiene una amplia distribución en la naturaleza y recientemente ha sido de mayor interés por que se han reportado especies con potencial agro-biotecnológico como por ejemplo, el control biológico, biorremediación y promoción del crecimiento vegetal. Además, de participar en el reciclaje de materia orgánica al metabolizar sustratos tales como: ácidos grasos, azúcares, polialcoholes, compuestos aromáticos, aminoácido, entre otros. Y por otro lado, se ha estudiado su papel como patógeno para el ser humano, con alta prevalencia en algunas patologías y también como fitopatógeno afectando seriamente a cultivos, generando pérdidas económicas importantes.

Debido al creciente impacto e importancia que tiene el género *Burkholderia*, su capacidad de colonizar distintos ambientes y el limitado conocimiento sobre su diversidad y distribución en nuestro país, se propuso la búsqueda de especies del género *Burkholderia* en diferentes ambientes y regiones climáticas del estado de Puebla.

Mediante la aplicación de técnicas microbiológicas y complementando con técnicas de microbiología molecular se llevó a cabo la caracterización de especies pertenecientes al género *Burkholderia*, previo a esto se realizó un muestreo en dos localidades del estado de Puebla. Obteniendo como resultado, el aislamiento de cepas pertenecientes al género *Burkholderia*, ubicando a cada aislamiento en un árbol de distancia. Dicho árbol de distancia nos ayudó a concluir que hubo una gran diferenciación entre el primer y segundo muestreo, resaltando la característica en cuanto al valor de pH de cada uno de los aislamientos obtenidos, identificados como especies pertenecientes al género *Burkholderia*.

## II. MARCO TEÓRICO

### ➤ Generalidades: Dominio Bacteria

Desde el origen de la vida, las interacciones entre los microorganismos y el entorno ha moldeado el ambiente actual de nuestro planeta. Algunos estudios han reportado que la biomasa de microorganismos terrestres es muy grande y posiblemente sea el constituyente principal del planeta. Las bacterias juegan un papel esencial en el sostenimiento de nuestra atmosfera, lo cual, se ha dado por ejemplo, a través del desarrollo de los ciclos biogeoquímicos, (Escalante, 2007).

Las bacterias son organismos procariotas, unicelulares que pueden desarrollarse en distintos ambientes y presentar diferente morfología. Existen registros que evidencian a los microorganismos unicelulares como los primeros organismos bióticos que se desarrollaron sobre la tierra desde hace 3 500 millones de años (Schopf, 1993).

### ➤ Taxonomía de las Proteobacteria

Proteobacteria es uno de los principales grupos bacterianos predominantes en distintos ambientes (Connon *et al.*, 2007), (Musilova *et al.*, 2015), (Gründger *et al.*, 2015), las cuales pertenecen al grupo taxonómico más grande del dominio Bacteria (Tortora *et al.*, 2005). Las Proteobacteria son Gram negativas, con una pared celular formada principalmente de polisacárido, su morfología es muy variable, que va desde bacilos hasta coco simples. Su movimiento es por medio de flagelos, aunque algunas lo pueden hacer por deslizamiento bacteriano. Algunas son de vida libre, pero también se incluye una gran variedad de patógenos, tales como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Neisseria*, *Burkholderia*, entre otras. Las Proteobacteria incluyen un gran número de bacterias de importancia en el área de la medicina, industria, agricultura, entre otras (Madigan *et al.*, 2004).

Las Proteobacteria se clasifican en cinco subgrupos de acuerdo a la similaridad de su ARN ribosomal, estos grupos han sido designados con letras griegas: Alfa-Proteobacteria, Beta-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria, Delta-Proteobacteria, Épsilon-Proteobacteria (Tortora *et al.*, 2005), y Zeta-Proteobacteria (Rassa *et al.*, 2009).

### ➤ Diversidad bacteriana

El estudio de la diversidad bacteriana es importante debido al posible potencial que representa en diferentes campos de estudio, por ejemplo en la microbiología, bioquímica, genética molecular o en la

industria por su aplicación en procesos tecnológicos para favorecer el desarrollo en el área de la producción de alimentos así como también, en el desarrollo de productos agrícolas.

La diversidad microbiana es indispensable para el sostenimiento de la biosfera, no sólo por el importante papel que juegan los microorganismos como descomponedores de contaminantes y de restos orgánicos, sino también como productores y consumidores de gases relacionados con el clima del planeta (Sherr y Sherr, 2000).

Actualmente es bien conocido que las bacterias colonizan los más diversos ambientes de la biosfera. Incluso, han sido encontradas en ambientes extremos donde se consideraría que no existiría vida, como es el caso de manantiales ácidos o calientes, fuentes hidrotermales, ambientes contaminados con desechos radioactivos y ambientes extremadamente fríos y áridos como ciertas regiones de la Antártida (Fredrickson *et al.*, 2004).

Durante mucho tiempo, los estudios para conocer a la diversidad bacteriana se basaron en técnicas de cultivos que no permitían conocer en su totalidad la diversidad de especies existentes. Hoy en día se utilizan técnicas no dependientes de cultivo, las cuales se basan principalmente en el análisis de los ácidos nucleicos. Este tipo de técnicas han mostrado que sólo se ha cultivado entre 0.1 y un 10% de las bacterias del ambiente (Rondon *et al.*, 1999; Handelsman *et al.*, 2002; Torsvik y Ovreas; Keller *et al.*, 2004).

La Taxonomía bacteriana se encarga de describir y diferenciar la amplia diversidad de especies bacterianas existentes. Estas diferencias se han establecido con base en varios criterios como por ejemplo, la estructura celular, metabolismo, pruebas bioquímicas que incluyen el contenido de ácidos grasos, antígenos y otros compuestos metabólicos relacionados (Thomson *et al.*, 2001).

Para clasificar un microorganismo desde hace casi dos décadas además de la taxonomía clásica se utiliza, lo que se conoce como taxonomía polifásica, la cual involucra diversas técnicas moleculares para la formación de filogenias; basándose en características como contenido de guanina/citosina, hibridación genoma-genoma, o la secuenciación del ADN ribosomal (Vandamme *et al.*, 1996). Algunas herramientas sofisticadas como técnicas moleculares, tal como, el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S, el diseño de sondas universales para la realizar métodos como: FISH, Dot Blot cuantitativo, Hibridación *in situ*, Técnicas de “Southern Blot” y “Northern Blot”. También el uso de

técnicas de “Fingerprinting” (por sus siglas en inglés, “huellas de ADN”), como el ARDRA, RAPD, T-RFLP (Escalante-Lozada *et al.*, 2004).

Una de las razones importantes por las el gen ribosomal 16S se ha utilizado ampliamente para estudios de diversidad bacteriana, se debe a que es una molécula que se encuentra presente en todas las bacterias, su característica de ser ancestral, con estructura y función conservada a lo largo de su historia evolutiva y con pocos cambios en su secuencia a lo largo de periodos prolongados de tiempo (Rodicio *et al.*, 2005). Dentro del uso de las técnicas de “Finger Printing”, se encuentran el análisis de restricción del ADN ribosomal (ARDRA), también conocida como “huellas de ADN”. Esta técnica consiste en amplificar por PCR el gen ribosomal 16S de las cepas en análisis y posteriormente someterlo a digestión enzimática con diferentes enzimas de restricción de corte frecuente. La comparación de los patrones de restricción generados, permite e identificar diferentes grupos o comunidades distintas (Sklarz *et al.*, 2009).

### III. MARCO DE REFERENCIA

#### ➤ Generalidades del género *Burkholderia*

El género *Burkholderia* fue propuesto por primera vez en 1992 por Yabuuchi y colaboradores. Se compone de varias especies que se habían clasificado originalmente como *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1993) y su nombre se debe al fitopatólogo estadounidense Walter Burkholder, quien, en 1942, describió las primeras especies de "*Burkholderia*", *Phytomonas caryophylli* y *Phytomonas alliicola*, como patógenos de clavel y la cebolla, respectivamente (Burkholder *et al.*, 1942).

La familia *Burkholderiaceae* está compuesta por los géneros *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Lautropia*, *Limnobacter*, *Pandoraea*, *Paucimonas*, *Polynucleobacter* y *Themotrix*. Esta familia presenta una diversidad en sus características fenotípicas, metabólicas y ecológicas. Incluye tanto a aerobios estrictos como facultativos, quimiolitotrofos obligados y facultativos así como a bacterias quimiorganotrofos (quimio heterótrofas) (Garrity *et al.*, 2005).

Las características morfológicas para este género son las siguientes: bacilos rectos, Gram negativos, presentan un metabolismo aerobio, oxidasa y catalasa positivos, con un porcentaje de GC entre 59 y 69.5%. Estas bacterias pueden ser móviles o inmóviles, por lo que constan de un flagelo único o con un penacho de flagelos polares, según la especie de la que se trate (Brenner *et al.*, 2005).

Las características generales de *Burkholderia* son las siguientes: bacterias mesófilas, no esporuladas, que pueden presentarse solas o en pares, de dimensiones aproximadas de 0.5-1 x 1.5-1 µm, quimiorganotrofos y con metabolismo anaerobio. Utilizan una amplia variedad de compuestos orgánicos que utilizan como fuente de carbono. La composición de ácidos grasos y perfiles de proteínas varía de especies por lo que su contenido se utiliza como marcadores taxonómicos (Yabuuchi *et al.*, 1993).

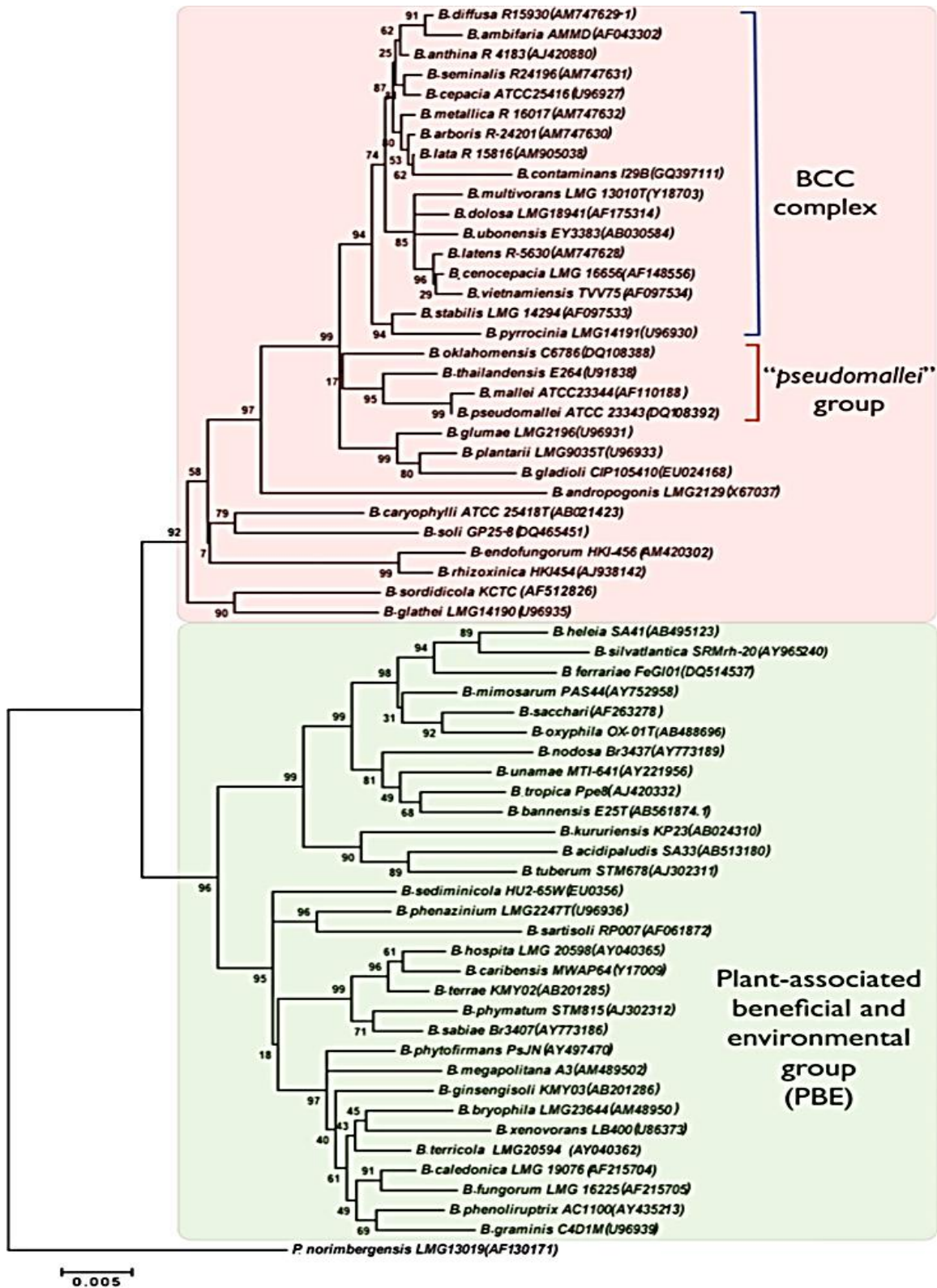
#### ➤ Taxonomía del género *Burkholderia*

En 1966, los estudios exhaustivos realizados del género *Pseudomonas* destacaron la similitud general del grupo mallei-pseudomallei comparando varios rasgos fenotípicos (Redfearn *et al.*, 1966; Stanier *et al.*, 1966). Palleroni *et al.* (1973), reconocieron la heterogeneidad taxonómica con *Pseudomonas* y determinaron cinco grupos de especies homólogas resultados basado en ensayos de hibridación, (Palleroni *et al.*, 1973). Esto llevó a la subdivisión del género *Pseudomonas* en cinco grupos

homólogos de 16S rRNA bien definidos, garantizando al menos cinco denominaciones genéricas independientes. Más tarde, se realiza un análisis taxonómico polifásico, incluyendo datos de la secuencia 16S rRNA, análisis de hibridación ADN-ADN, proporcionado motivo suficiente para la creación del género *Burkholderia* para ordenar las siete especies del Grupo II rRNA (*P. cepacia*, *P. caryophylli*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas solanacearum* y *Pseudomonas picketti*) (Gillis *et al.*, 1995; Yabuuchi *et al.*, 1993). Hasta el 2011 las especies reconocidas eran 62 (Suárez-Moreno *et al.*, 2011), (**Fig. 1**).

La construcción de árboles filogenéticos está basada en el análisis de la secuencia de genes de mantenimiento (16S rRNA, *recA*, *gyrB*, *rpoB*, etc.). Tomados en cuenta este conjunto de análisis, se sugieren dos grupos principales que se pueden distinguir dentro del género *Burkholderia* (Godoy *et al.*, 2003; Onofre-Lemus *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2006; Payne *et al.*, 2005; Tayeb *et al.*, 2008). Al alinear secuencias de 16S rRNA de cepas tipo del género *Burkholderia*, se construyó un árbol de distancia en el que se distinguen dos grupos, el grupo de las patógenas en el que se incluye al BCC y el denominado grupo “*Pseudomallei*”; el segundo grupo de las benéficas asociadas a plantas y al ambiente (PBE), (il. 3) (Suarez-Moreno *et al.*, 2011).

Un grupo de organismos muy cercano a *B. cepacia* y ella misma, se agrupa en un conjunto de distintas especies genómicas conocido como Complejo *Burkholderia cepacia* (BCC). Cada especie fue inicialmente designada como “genomovar”, pero luego adquirieron nombre binomial por especie (Vandamme *et al.*, 1997). El complejo BCC está compuesta por 17 especies que comparten el 98-100% de similitud en su secuencia ARNr 16S, y 94-95% en sus secuencias de genes *recA* (Vanlaere *et al.*, 2009; Vanlaere *et al.*, 2008; Suárez-Moreno *et al.*, 2011). Aunque el género *Burkholderia* tiene gran importancia como patógeno, también es notable su papel agro-biotecnológico. Como ejemplos, la actividad fijadora de nitrógeno de forma libre, en especies como *B. brasiliensis* M130 (Baldani *et al.*, 1997) y *B. kururiensis*, *B. silvatlantica*, *B. vietnamiensis* (De los Santos *et al.*, 2001; Caballero-Mellado, *et al.*, 2004); la fijación de nitrógeno en asociación simbiótica con plantas leguminosas, como es el caso de *B. pymatum*, *B. mimosarum*, *B. tuberum* (Moulin *et al.*, 2001); y la promoción de crecimiento vegetal.



**Figura 1.** Árbol filogenético basado en las secuencias de 16s rRNA de las especies pertenecientes al género *Burkholderia* (Suárez-Moreno, et al., 2011).

➤ **Hábitat del género *Burkholderia***

En las últimas dos décadas, la investigación sobre especies del género *Burkholderia* ha sido constantemente expandida. Varias especies de este género se han aislado a partir de muestras de animales, plantas (**Tab. 1**), suelo y agua.

Cepas	Fuente de aislamiento:
<i>B. phytofirmans</i> <sup>1</sup> , <i>B. tropica</i> <sup>2</sup> , <i>B. unamae</i> <sup>3</sup> y <i>B. silvatlantica</i> <sup>4</sup>	Raíces, tallos, hojas e incluso como endófitos.
<i>B. tropicalis</i> <sup>5</sup> y <i>B. kururiensis</i> <sup>5</sup> , <i>B. tropica</i> <sup>6</sup> , <i>B. unamae</i> <sup>7</sup> , <i>B. silvatlantica</i> <sup>8</sup> y <i>B. xenovorans</i> <sup>9</sup>	Tallos, raíces, hojas, frutos de piña y plátano
<i>B. caledonica</i> <sup>10</sup> , <i>B. graminis</i> <sup>10</sup> , <i>B. phenazinium</i> <sup>10</sup> , <i>B. sacchari</i> <sup>10</sup> , <i>B. caribensis</i> <sup>10</sup> , <i>B. glathei</i> <sup>10</sup> , <i>B. hospita</i> <sup>10</sup> , <i>B. terricola</i> <sup>10</sup>	Suelo

**Tabla 1.** Ejemplos de especies del género *Burkholderia* aisladas de muestras vegetales. <sup>1</sup>(Sessitsch et al., 2005), <sup>2</sup>(Reis et al., 2004), <sup>3</sup>(Caballero-Mellado et al., 2004), <sup>4</sup>(Perin et al., 2006), <sup>5</sup>(Cruz et al., 2001), <sup>6</sup>(Reis et al., 2004), <sup>7</sup>(Caballero-Mellado et al., 2004), <sup>8</sup>(Perin et al., 2006), <sup>9</sup>(Goris et al., 2004) y (Coenye et al., 2003).

Las bacterias promotoras de crecimiento utilizan diferentes mecanismos para la producción de sustancias reguladoras de crecimiento. Ejemplo de ello son la producción de sideróforo en *B. tropica* y *B. unamae*; y la solubilización de fosfatos en *B. tropica*, *B. unamae* y *B. xenovorans*, (Caballero-Mellado, 2007).

Adicionalmente a las especies mencionadas se encuentran algunas especies patógenas en plantas, como *B. caryophylli*, un patógeno del clavel; *B. plantarii*, causante de las enfermedades del arroz y *B. gladioli* patógeno de la cebolla.

Existen especies que se han encontrado como endosimbiontes en insectos de los géneros *Alydus*, *Darmistus*, *Hyalimenus* y *Megalotomus* (Kikuchi et al., 2005). Además existen otras especies de *Burkholderia* que se encuentran asociadas a hongos, entre ellas *B. fungorum*, la cual se aisló del hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Coenye et al., 2001) y *B. sordidicola* asociada con la pudrición blanca *Phanerochaete sordida* (Lim et al., 2003), así como también con especies del género *Fusarium* (Toledo et al., 2002).

A principios de la década de los 80's, las cepas de *B. cepacia* estaban siendo cada vez más recuperadas a partir de muestras de suelo o plantas, como cultivos de vías respiratorias y muestras de pacientes con fibrosis quística (Isles *et al.*, 1984).

Aislamientos reportados en México, pertenecientes al género son: *Burkholderia mallei*, causante de la enfermedad "glanders" en mulas, burros, caballos y además clasificada como arma biológica; *B. vietnamiensis*, Estrada-de-los Santos y colaboradores (2001) aislaron a partir de rizosfera y rizoplano de plantas de maíz y en rizosfera, rizoplano y raíces de plantas de café en algunas regiones del estado de Morelos; *B. unamae* y *B. tropica* halladas en la rizosfera y el rizoplano procedentes de plantas de café y maíz cultivados en los estados de Oaxaca, Chiapas, Querétaro y Veracruz (Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2004

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El género *Burkholderia* comprende un gran número de especies encontradas en diversos ambientes ecológicos. Hasta el momento, existe un gran desconocimiento de su diversidad y distribución geográfica. La mayor atención se centra en las especies con el impacto en el área clínica. Por otro lado, se destaca el potencial biotecnológico que poseen algunas especies de *Burkholderia* y de las que aún se conoce poco de su ecología.

Considerando el potencial del género *Burkholderia* para establecerse y colonizar en distintos ambientes ecológicos, teniendo un rol en el área de la biotecnología y clínica, en el presente estudio, se propone la búsqueda, aislamiento e identificación parcial de este género, considerando que no existen reportes en la literatura de estudios realizados en el Estado de Puebla y muy pocos a nivel nacional.

Analizando la presencia, distribución y la diversidad de este género en diferentes ambientes es posible obtener un mejor entendimiento sobre la interacción que posee en diferentes nichos.

## V. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de tesis, permitirá profundizar en el conocimiento de las características ecológicas del género *Burkholderia* y forma parte del inicio de un estudio biogeográfico de este género en el Estado de Puebla.

Este estudio pretende aportar información sobre la distribución de éste género no solamente delimitado por la diversidad de climas en el estado de Puebla, sino en interacción con plantas silvestres o cultivos agrícola.

## VI. OBJETIVOS

Determinar la presencia y diversidad de especies del género *Burkholderia* en el estado de Puebla.

### ➤ **Objetivos específicos**

- ✓ Aislar cepas del género *Burkholderia* en distintas regiones del estado de Puebla.
- ✓ Identificación preliminar a los aislamientos mediante el uso de técnicas fenotípicas y moleculares.

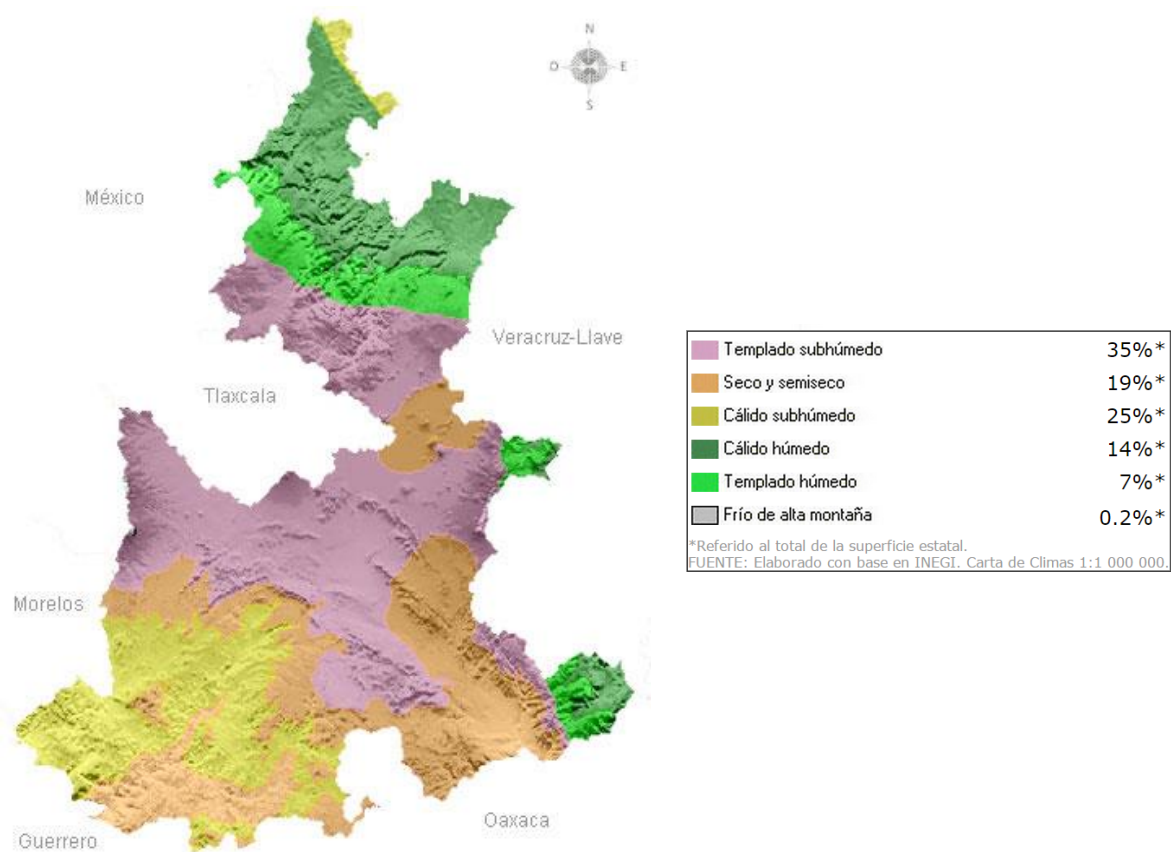
## VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

### ➤ Localización del muestreo

El Estado de Puebla, cuya capital es Puebla de Zaragoza, cuenta con 217 municipios. Posee una extensión de 34 309 km<sup>2</sup>, que corresponde al 1.7% del territorio nacional.

#### - Clima

El clima de Puebla se divide en proporciones de climas, templado-subhúmedo, cálido subhúmedo, seco, semiseco, cálido húmedo y templado húmedo. También existe un pequeño porcentaje (0.2%) de clima frío en la cumbre de los volcanes de mayor altitud (**Fig. 2**).

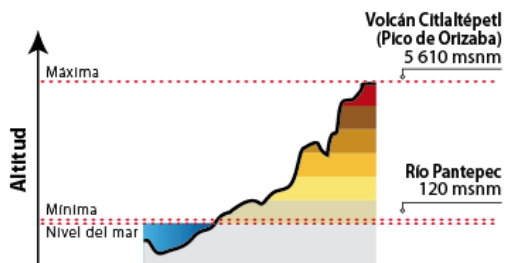


**Figura 2.** Distribución climatológica del Estado de Puebla (INEGI © 1985).

La temperatura media anual del estado es de 17.5°C, siendo la temperatura máxima promedio de **28.5°C** (abril y mayo) y la temperatura mínima promedio de **6.5°C** durante el mes de enero (INEGI ©1985).

## - **Altitud**

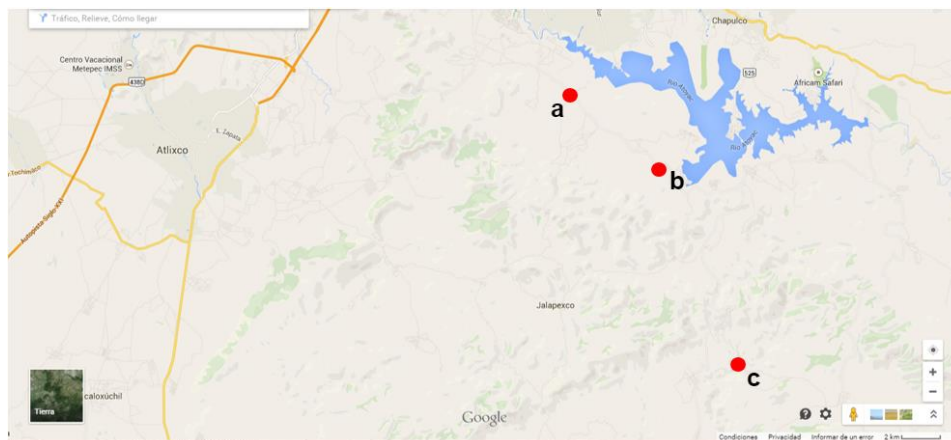
El estado de Puebla, tiene una altitud máxima de 5600 msnm la cual forma parte de la distribución geográfica X del Eje Neovolcánico y una mínima de alrededor de 120 msnm (**Fig. 3**).



**Figura 3.** Altitud del Estado de Puebla, (INEGI ©, 1985).

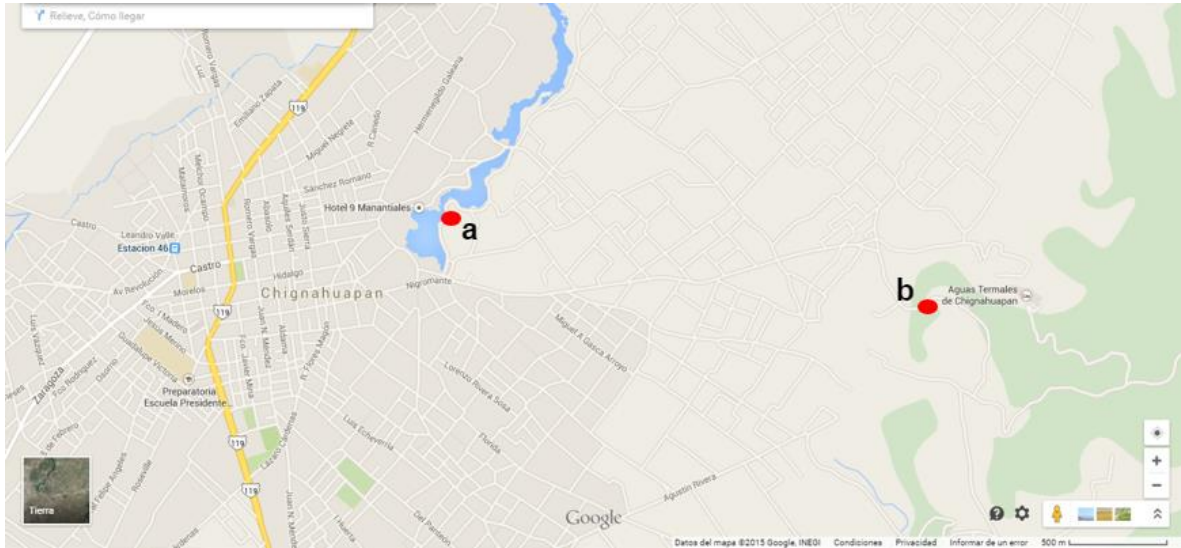
## - **Zona de Muestreo**

Las zonas del estado de Puebla que fueron seleccionadas para llevar a cabo la colecta de muestras biológicas fueron: La Paz Tlaxcolpan, San José del Rincón, San Miguel Atlapulco (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Croquis procedente al primer recorrido, en la primera colecta de muestras. a) La Paz Tlaxcolpan, b) San José del Rincón, c) San Miguel Atlapulco (INEGI © 2014).

La segunda parte del muestreo se realizó en la zona de la Región de Chignahuapan (Laguna de Chignahuapan y Presa la Paz) (**Fig. 5**). Los sitios de muestreo se eligieron aleatoriamente, solo tomando características de clima y condiciones de crecimiento para el género *Burkholderia*.



**Figura 5.** Croquis procedente al segundo recorrido, en la segunda colecta de muestras. a) Laguna de Chignahuapan, b) Presa la Paz (INEGI © 2014).

➤ **Características de Muestreo**

Se tomaron muestras a partir de suelos rizosféricos y especímenes vegetales silvestres (pino, helechos, musgos y orquídeas) y de interés agrícola (maíz, nopal, alfalfa, agave, cactus) de manera aleatoria y por duplicado. Así mismo, se seleccionaron dos cuerpos de agua de interés regional.

## VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

### ➤ Aislamiento y caracterización fenotípica

El aislamiento bacteriano se llevó a cabo tomando 1 g de muestra (suelo rizosféricos y agua) el cual fue resuspendido en 9 ml de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10 mM), y permaneció en agitación, durante 30 minutos. Para el aislamiento a partir de planta/raíz se realizaron varios lavados con agua destilada y se maceraron las muestras y en el caso de las muestras de agua, se centrifugaron (5000 rpm/20 min) y se resuspendieron en 1 ml de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10 mM). Posteriormente para cada muestra, independientemente del origen, se diluyó seriamente y se inocularon las diluciones  $10^{-1}$ -  $10^{-4}$  con 100  $\mu\text{l}$  de cada una de ellas en medio semi selectivo PCAT (por duplicado). Se incubaron las placas a 30°C, durante 24-48 h según el crecimiento (Ver apéndice 1).

Después del tiempo de incubación de las placas, se revisaron cada una de las placas, tomando solo una colonia, considerando el fenotipo característico de *Burkholderia* sp. (colonias de tamaño pequeño, color blanco a nacarado o amarillas y brillantes con bordes definidos). Cada colonia se inoculó en caldo LB (enriquecido con Ac. Succínico, ver apéndice 1). Incubados durante 24 h a 30°C en agitación. Posterior a las 24 h de incubación se sembró por estría cruzada en placas con el medio PCAT, para rectificar pureza de cada una de las colonias aisladas y mostrando semejanza con el fenotipo de las especies tipo pertenecientes al género *Burkholderia*.

También se utilizó otro medio semi-selectivo, agar Cetrimida adicionado con glicerol (0.5%), para descartar a los aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas*, exclusivamente aquellas especies que producen pigmentación como son: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*. La emisión de fluorescencia colonial se evidencia por medio del uso de la cámara de UV, después de haber sido incubada por 48 h a 30°C, (ver apéndice 1).

### ➤ Caracterización genotípica

A las cepas seleccionadas presuntamente como *Burkholderia*, se lavaron y resuspendieron en  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10 mM) para después ser amplificadas por PCR un fragmento del gen ribosomal 16S, utilizando oligonucleótidos específicos (BKH812F 5'CCCTAAACGATGTCAACTAGTTG3' Y BKH1249F 5' ACCCTCTGTTCCGACCAT'3), (Bergmark, *et al.*, 2012). Los cuales amplifican un segmento de aproximadamente 438 pb.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 8 µl bajo las siguientes condiciones: 3 min a 95°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 63°C y 1 min a 72°C, seguido de una extensión final de 4 min a 72°C.

Los aislados que fueron identificados preliminarmente como *Burkholderia* se conservaron en glicerol al 30% y fueron almacenadas a -80°C.

➤ **Digestión con enzimas de restricción “*in silico*”**

Se utilizó el programa NebCutter®, para la búsqueda de enzimas de restricción de corte frecuente a partir de secuencias del gen 16S rRNA de algunas especies pertenecientes al género *Burkholderia*, obtenidas de la base datos de NCBI para la obtención de patrones enzimáticos diversos entre los aislados.

➤ **ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*)**

El gen ribosomal 16S rRNA (~1500 pb) fue amplificado utilizando oligonucleótidos universales (UN27F 5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y UN1392R 5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3'), (Weisburg *et al.*, 1991) bajo las siguientes condiciones.

UN27F 5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

95°C	por	3 min	
94°C		30 s	
57°C		45 s	26 ciclos
72°C		1 min	
72°C	por	10 min	

La reacción de PCR (20µl) contenía 100nM de cada dNTP, 50mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer 10x, Oligonucleotidos 60µM y 5U de Taq polimerasa. Bajo estas condiciones se obtendrán productos de amplificación de aproximadamente 1369 pb.

Los productos de amplificación del gen ribosomal 16S se dirigieron con las enzimas *HaeIII*, *AluI* y *MspI*, de acuerdo con el protocolo (ver apéndice 1). Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% para registrar los patrones de bandas, utilizando el Marcador GeneRuler™ 100 pb DNA

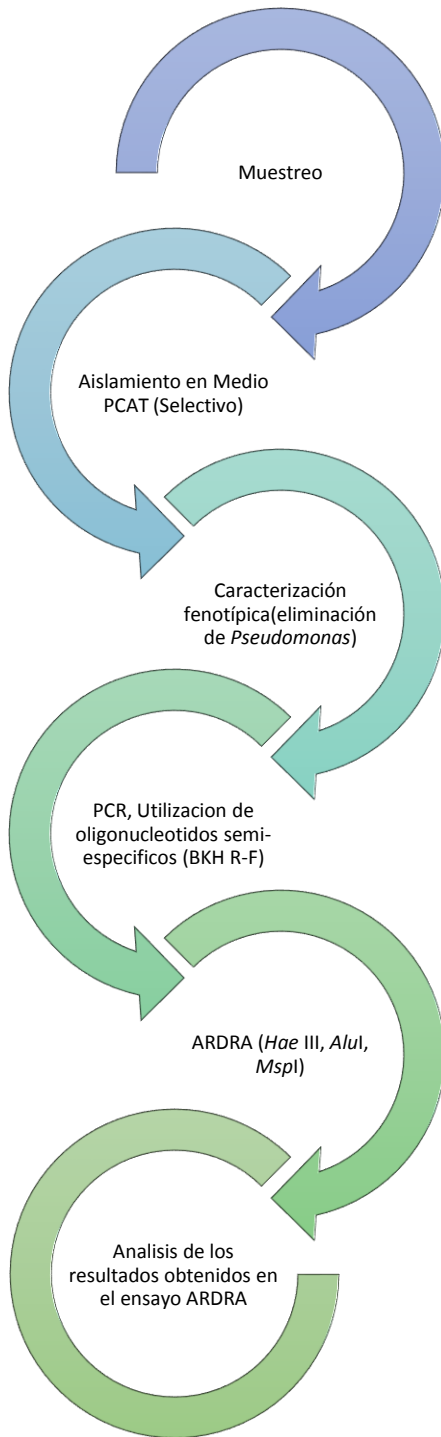
Ladder, ©2013, Thermo Fisher Scientific Inc.; y los geles fueron visualizados con el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System y el programa VisionWorks LS (aplicación 1D Analysis plugin).

➤ **Análisis de ARDRA**

Con base con los patrones de restricción obtenidos a partir del ensayo ARDRA fueron comparados y se tradujeron en una matriz de presencia o ausencia de patrones, la cual se construyó con los caracteres 1 (presencia) y 0 (ausencia).

Posteriormente, dicha matriz fue analizada con el programa computacional FREE TREE ver.0.9.1.50 (Pavlice *et al.*, 1999) que analiza caracteres discretos. El análisis comparativo de los patrones fue mostrado mediante la construcción de una parte del genoma el cual se visualizó por medio del programa TREE VIEW ver.1.24.0.0.

IX. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



## X. RESULTADOS Y DISCUSION

### ➤ Muestreo

El primer muestreo se realizó en la zona centro del estado, caracterizado por un clima semi-seco. Las localidades de estudio fueron: La Paz Tlaxcolpan, San José del Rincón y San Miguel Atlapulco ( $24^{\circ}48'59''N$  y  $107^{\circ}22'41''O$ ), (Fig. 6).



*Figura 6. Primer muestreo, localizado en la zona centro del estado de Puebla.*

En la siguiente tabla, se muestran los datos relevantes del primer muestreo:

No. de muestra	Descripción	Localidad	pH
1A	Suelo rizosféricos de Maíz	Tlaxcolpan	5.2
1B	Planta Maíz	Tlaxcolpan	5.2
2	Suelo rizosféricos de encino	Tlaxcolpan	6.5
3	Suelo rizosféricos de Nopal	Tlaxcolpan	6.5
4A	Suelo rizosféricos de Alfalfa	San José del Rincón	7.5
4B	Planta y raíz de Alfalfa	San José del Rincón	7.5
5	Suelo rizosféricos de Agave	San José del Rincón (Hacienda)	7.4
6	Suelo rizosféricos de órgano o cactus	Atlapulco	7.3
7	Suelo rizosféricos de Palma	Atlapulco	7.3
8	Suelo rizosféricos de leguminosa	Atlapulco	7.3
9A	Suelo rizosféricos de helecho	Atlapulco	7.3
9B	Planta y raíz Helecho	Atlapulco	7.3
10	Agua	San José del Rincón (Laguna de Valsequillo)	8.1

**Tabla 2.** Características del primer muestreo, denominado como (Grupo A).

El segundo muestreo se realizó en la zona norte del estado, localizándose en el municipio de Chignahuapan (19 ° 50'00"N y 98 ° 02'00"O), caracterizado por tener un clima templado húmedo (Fig. 7).



*Figura 7. Segundo muestreo, localizado en el municipio de Chignahuapan.*

En la siguiente tabla, se enlistan las muestras colectadas en el segundo muestreo con sus respectivas características:

N°	Descripción	Localidad	pH
11	Suelo rizosféricos Helecho	Chignahuapan	5.51
12	Suelo rizosféricos Pino	Chignahuapan	5.18
13	Suelo rizosféricos Maguey	Chignahuapan	5.88
14	Planta y raíz Orquídea (Bromelía)	Chignahuapan	5.77
15	Suelo rizosféricos Bromelía	Chignahuapan	5.77
16A	Suelo rizosféricos de Mini helecho	Chignahuapan	4.81
16B	Planta y raíz de Mini helecho	Chignahuapan	4.81
17	Suelo rizosféricos Maíz	Chignahuapan	5.82

18	Suelo rizosféricos Maíz	Laguna Chignahuapan	6.05
19	Suelo rizosféricos Pino	Tlaxco (Bosque de Coníferas)	5.21
20	Agua	Tlaxco (Presa la Luz)	6.9
21	Agua	Chignahuapan (Laguna de Chignahuapan)	7.63
22	Raíz Orquídea (Bromelía)	Chignahuapan	5.76

**Tabla 3.** Características del segundo muestreo, denominado como (Grupo B).

Uno de los parámetros comparables entre el primer y segundo muestreo es el valor de pH de las muestras colectadas. En el primer muestreo la mayoría de los valores de pH registrados, tienden a la neutralidad (6.5 a 7.3), a excepción de la muestra de maíz, que tiene un valor de pH ácido. Para el caso de segundo muestreo, los valores de pH se definen en un rango de pH ácido (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.

Existen reportes de aislamientos de *Burkholderia* a partir de rizosfera con pH ácido, tales como *B. tropica*, especie aislada en el rango de pH 4.5 a 6.5 (Reis *et al.*, 2004) y *B. unamae*, la cual fue aislada de rizosfera en un rango de pH de 4.5-7 (Caballero-Mellado *et al.*, 2004). Recientemente, *B. acidipaludis* y *B. heleia* fueron aisladas a partir de la planta *Eleocharis dulcis*, la cual crece en pantanos altamente ácidos (pH 2-4) (Aizawa *et al.*, 2010a, b). Por ende, es posible que un determinado rango de pH favorezca el establecimiento de ciertas especies pertenecientes al género *Burkholderia*, por lo tanto, sería interesante analizar a partir de muestras ambientales su presencia en regiones donde el pH sea ácido o alcalino.

### ➤ Nomenclatura

La nomenclatura que se utilizó para designar a cada uno de los aislamientos obtenidos, se basa tomando en cuenta las siguientes características:

Las cepas aisladas se nombraron de la siguiente forma:

Ejemplo **A2n2-c**

- ✓ Donde la primera letra, mayúscula corresponde a la sección de muestreo. Usando **A** para (Grupo A), **B** para (Grupo B) según corresponda la muestra :

<b>Muestra</b>	<b>Lugar de muestreo</b>	<b>Fuente de origen</b>	<b>Sección de muestreo</b>	<b>Letra</b>
1	La Paz Tlaxcolpan	Maíz	Grupo A	A
2	Tlaxcolpan	Encino	Grupo A	A
3	Tlaxcolpan	Nopal	Grupo A	A
4	San José del Rincón	Alfalfa	Grupo A	A
5	San José del Rincón	Agave	Grupo A	A
6	San Miguel Atlapulco	Cactus	Grupo A	A
7	San Miguel Atlapulco	Palma (palmito)	Grupo A	A
8	San Miguel Atlapulco	Legumbre	Grupo A	A
9	San Miguel Atlapulco	Helecho	Grupo A	A
10	San José del Rincón	Laguna	Grupo A	A
11	Chignahuapan	Helecho	Grupo B	B
12	Chignahuapan	Pino	Grupo B	B
13	Chignahuapan	Maguey	Grupo B	B
14	Chignahuapan	Orquídea	Grupo B	B
15	Chignahuapan	Broméla	Grupo B	B
16	Chignahuapan	Mini helecho	Grupo B	B
17	Chignahuapan	Maíz	Grupo B	B
18	Laguna de Chignahuapan	Maíz	Grupo B	B
19	Tlaxco	Pino (bosque de coníferas)	Grupo B	B
20	Tlaxco (Presa la Luz)	Agua	Grupo B	B
21	Chignahuapan (Laguna de Chignahuapan)	Agua	Grupo B	B
22	Chignahuapan	Orquídea (Broméla)	Grupo B	B

*Tabla 4. Tabla descriptiva del origen de muestra, para ordenar nomenclatura.*

- ✓ El número después de la letra mayúscula corresponde a la planta de cada especie muestreada del cual proviene el aislado; M2n2-c

1: Individuo uno

2: Individuo dos

3: Individuo tres

- ✓ La letra minúscula después del número corresponde a la zona de la cual proviene la cepa aislada; M2s2-c

s: suelo rizosféricos

r: raíz

p: planta

c: cuerpo de agua

e: endófito/epifito

- ✓ El número después de la letra minúscula corresponde a la dilución de la cual fue aislada la cepa; m2n2-c

1: Dilución 10-1

2: Dilución 10-2

3: Dilución 10-3

- ✓ El número al final se otorgó arbitrariamente para evitar cepas con la misma nomenclatura. M2n2-1

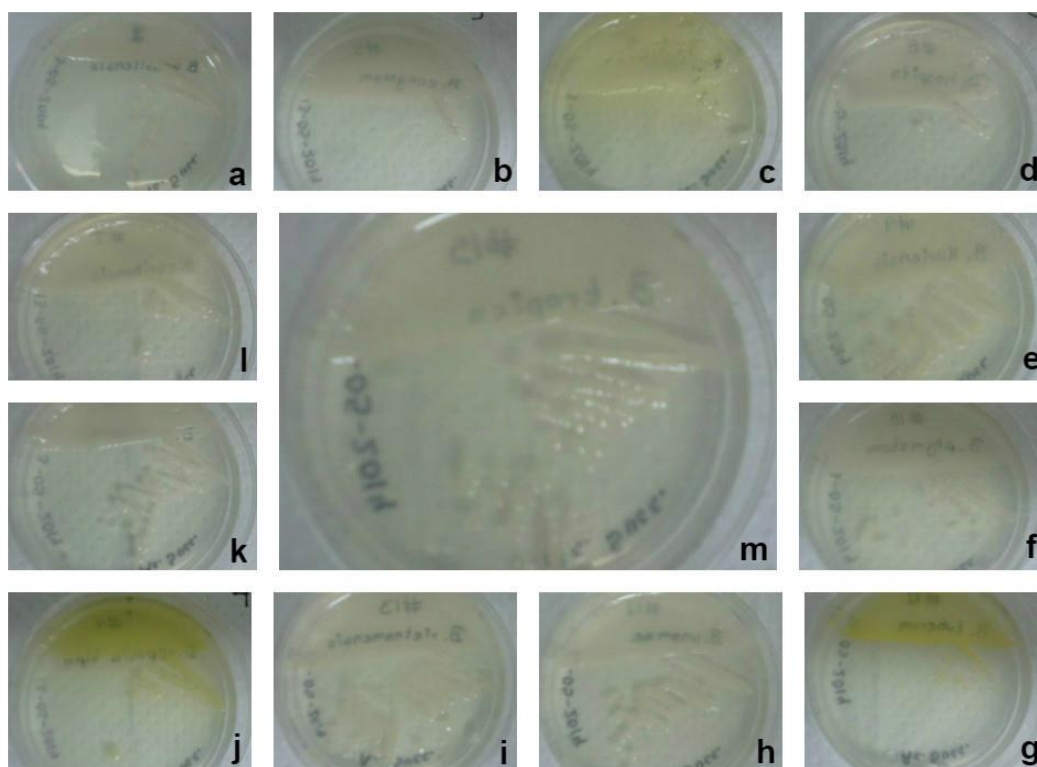
### ➤ **Aislamiento e identificación preliminar**

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas con otros tipos de microorganismos. Los cultivos de estas mezclas se reconocen como cultivos mixtos. Sin embargo, el conocimiento de los microorganismos se consigue mediante el estudio de cepas aisladas, cultivadas en el laboratorio en cultivos puros (o axénicos). Por otro lado, el estudio molecular conduce a la caracterización de los microorganismos, aún en poblaciones mixtas. Sin embargo la identificación bacteriana y la caracterización completa es posible tras el aislamiento de la bacteria y la obtención de cultivos puros (Granada, 2015).

En medio PCAT los aislados presentaron una morfología colonial característica en cuanto a las siguientes características: tamaño, color, forma (puntiforme, circular, irregular), elevación (plana,

elevada, convexa, umbonada), superficie (lisa, rugosa), aspecto (húmedo, seco), bordes (enteros, irregulares), luz reflejada (opaca, mate), consistencia (butirosa, mucoide, friable). En esta primera fase de identificación parcial, se estimó un número de 338 colonias aisladas en medio PCAT.

Se comparó la morfología de cepas tipo (**Fig. 8**) con los aislamientos obtenidos, podemos observar características similares. Esto fue de gran utilidad al seleccionar colonias con morfología característica y continuar con la caracterización fenotípica.

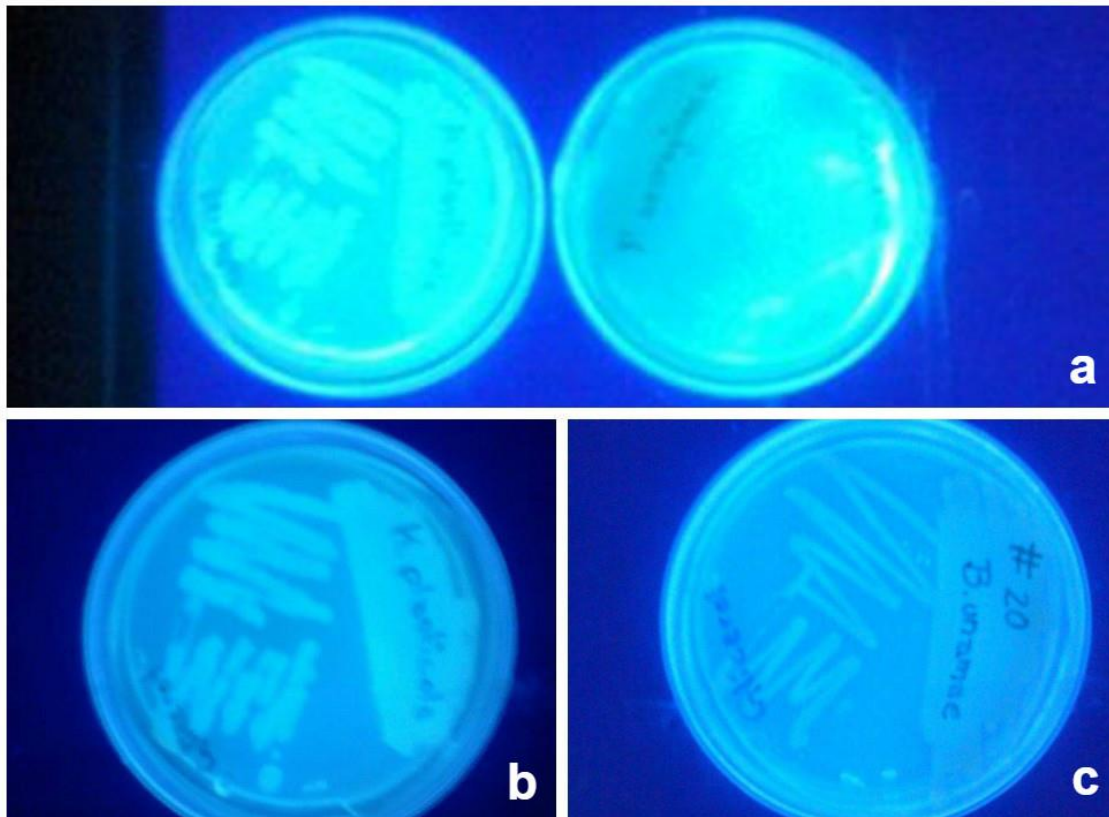


**Figura 8.** Morfología colonial, cepas tipo en medio PCAT. a) *B. brasiliensis* M130, b) *B. fungorum* KMG16225, c) *B. gladioli* AUAPS07070, d) *B. hospita* LMG20598, e) *B. kururiensis* Kv23, f) *B. phymatum* STM815, g) *B. tuberum* STM678, h) *B. unamae* Mtl-641, i) *B. vietnamiensis* TUU75, j) *B. cepacia* tipo ATCC25416, k) *B. tropica* Ppe8T, l) *B. caribensis* MWAP64, m) *B. tropica* MCD762.

### ➤ Caracterización fenotípica

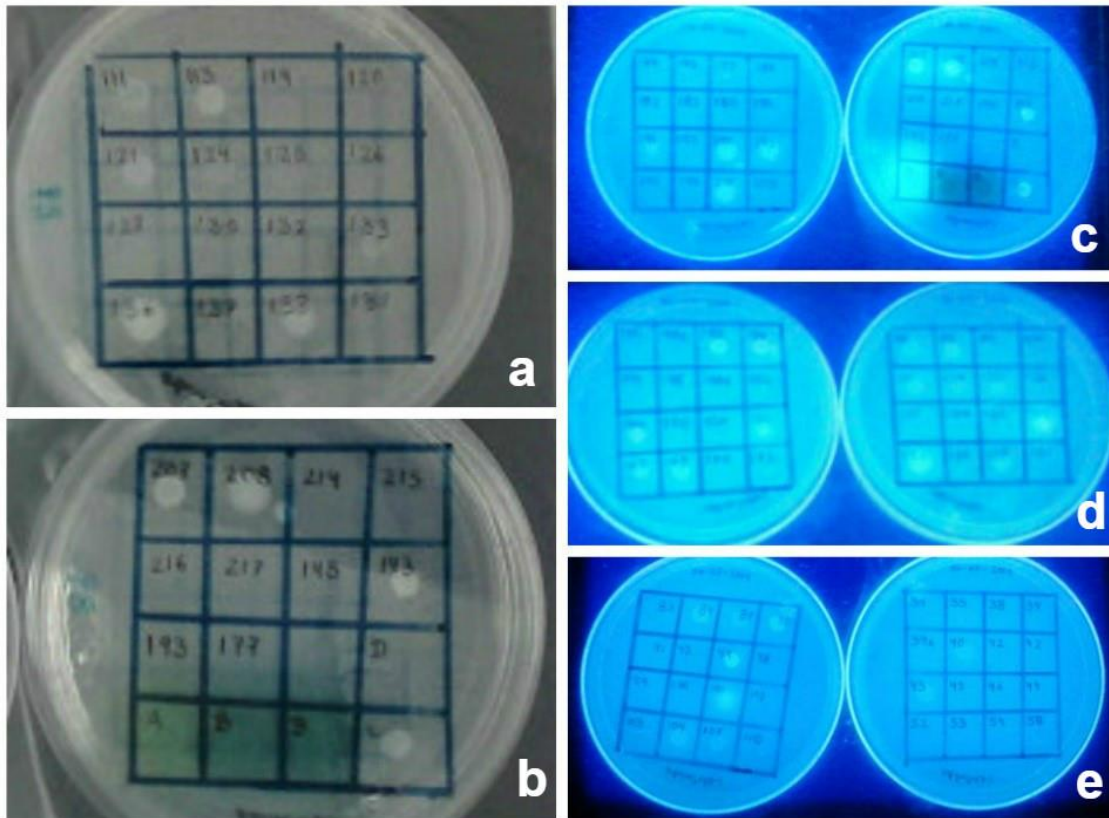
La síntesis de pigmentos por parte de los microorganismos es una característica determinada genéticamente. Su formación en muchos microorganismos es dependiente de la presencia de la luz, de la composición del sustrato, de la edad de la colonia y de la temperatura de incubación. Los

pigmentos derivan de distintos productos químicos: carotenoides, pirroles y otros (Raisman *et al.*, 2013). *Pseudomonas* es uno de los microorganismos fenotípicamente similares a *Burkholderia*, pero en cuanto a la producción de pigmentos se conoce que especies pertenecientes al género de *Pseudomonas* secretan una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) (**Fig. 9**) y piorrubina (rojo pardo), (King *et al.* 1954).



**Figura 9.** Prueba de emisión de fluorescencia. **a)** *P. aeruginosa* (control positivo), produce fluoresceína evidenciada con luz UV; **b)** *Klebsiella planticola* (control negativo), **c)** *B. unamae* Mtl-641 (control negativo). **b)** y **c)** no muestran emisión de fluorescencia debido a que no hay producción de pigmentos.

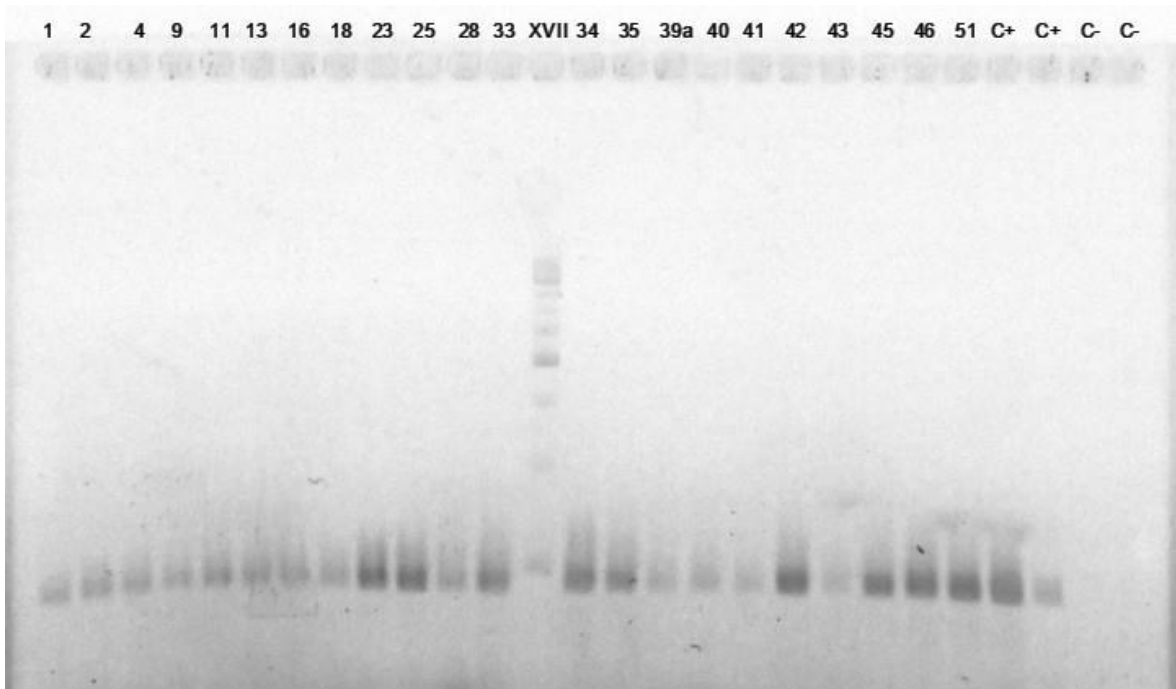
Utilizando el medio Agar Cetrimida adicionado con glicerol de la caracterización fenotípica se logró descartar un gran número de aislamientos que mostraban fenotipo fluorescente (**Fig. 10**) y conservar solo 104 aislamientos seleccionados presuntivamente como *Burkholderia*.



**Figura 10.** Presencia de pigmentos que emiten fluorescencia bajo la exposición a luz UV. a-b) Grupo B; c-d-e) Grupo A

➤ **Caracterización genotípica**

Las cepas presuntivas fueron probadas utilizando los oligonucleótidos específicos BKH (Bergmark *et al.*, 2012) obteniéndose bandas de amplificación del tamaño esperado (~438 pb) (**Fig. 11**).

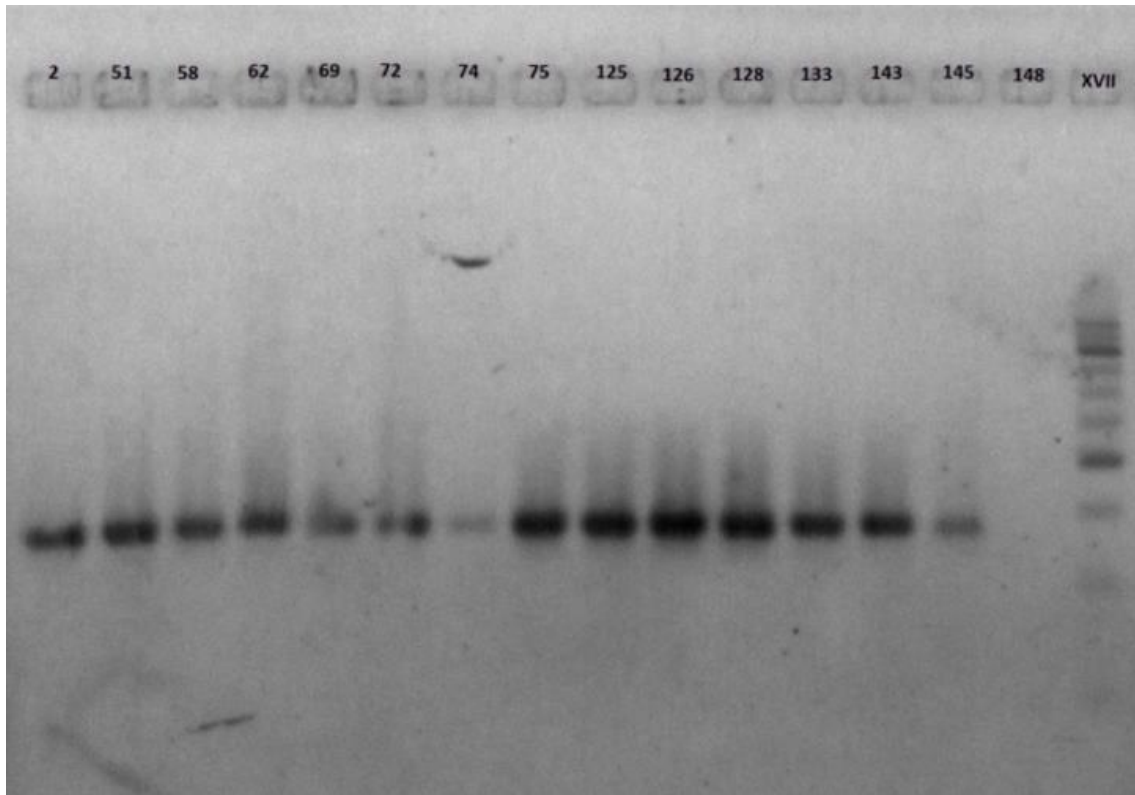


**Figura 11.** Electroforesis de los amplificadores obtenidos, mediante el uso de los oligonucleótidos BKH812F y BKH1249R. (1-51) Aislamientos representativos, donde se logra observar un producto amplificado de tamaño esperado (438 pb). (C+) *B. caryophylli*. (C+) *B. unamae*. (C-) *Pseudomonas* sp. (C-) Agua.

Como resultado de este ensayo se obtuvieron 87 aislados presuntamente identificados como *Burkholderia*. De los cuales en su mayoría provienen de suelo rizosférico, en ambos muestreos. Cepas aisladas de cuerpos de agua, dos en el primer muestreo y tres provenientes del segundo muestreo.

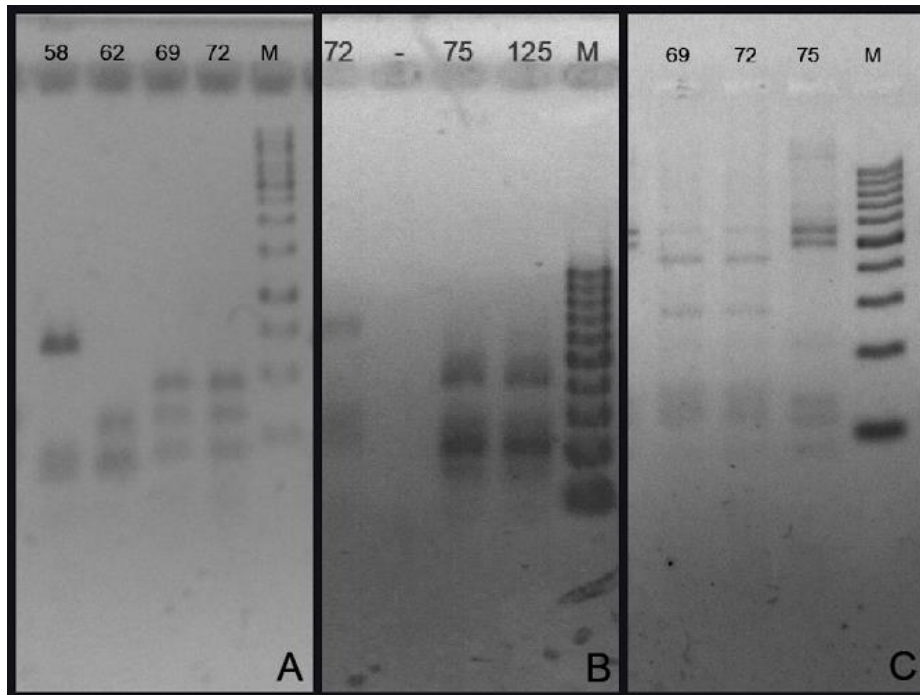
➤ **ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis)**

Previo al análisis ARDRA se amplificó el gen ribosomal 16S rRNA con los oligonucleótidos UN27F y UN1392R (Fig. 12) para ambos muestreos.

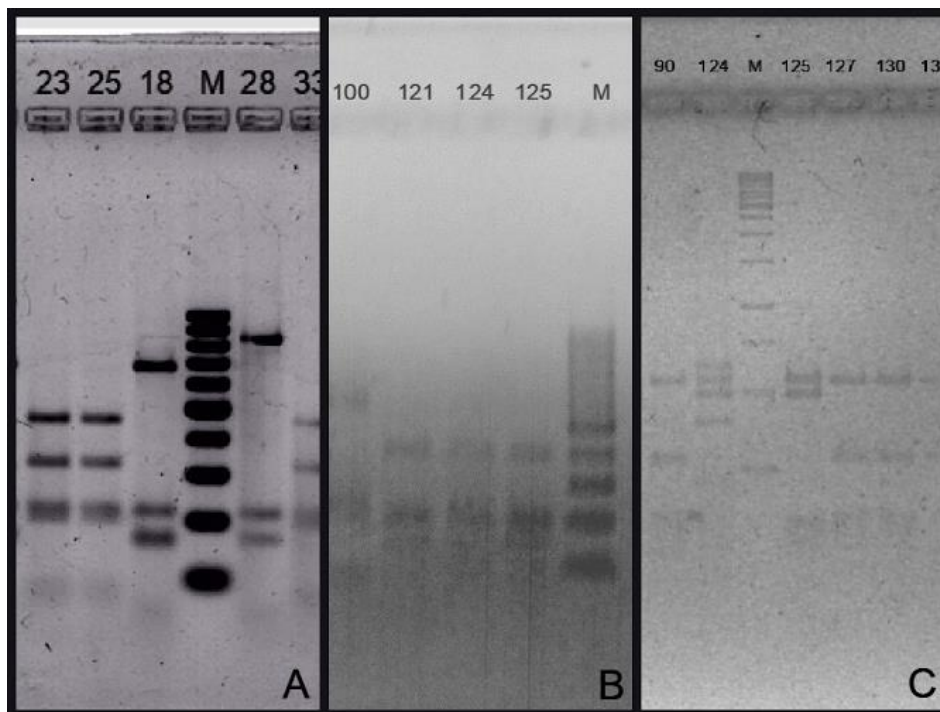


**Figura 12.** Imagen representativa de la amplificación del gen 16S rRNA. XVII marcador 100pb (ver apéndice 2).

Los 87 aislamientos positivos a BKH fueron agrupados mediante ARDRA. Después de obtener los distintos perfiles enzimáticos (**Fig. 13, 14**), se generó una matriz, traduciendo los patrones como presencia o ausencia de bandeo, la cual fue codificada con los caracteres 1 (presencia) y 0 (ausencia), (**Fig. 15**).



**Figura 13.** Imagen representativa del análisis de restricción del gen 16S del grupo A con las enzimas: A) HaeIII. B) AluI. C) MspI. (M) Marcador 100pb.



**Figura 14.** Imagen representativa del análisis de restricción del gen 16S del grupo B con las enzimas: A) HaeIII. B) AluI. C) MspI. (M) Marcador 100pb.

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	A				
1	A1s3-2	A1s5-3	A1s4-4	A1s5-5	A1s3-6	A1s3-7	A1s1-8	A9s4-9	A4s2-10	A9s5-11	A7s2-12	A7s2-13	A7s4-14	A8s3-15	A8s2-16	B1s3-17	B7s3-18	B9s19	B2s2-20	B5s2-21	B3s2-22	B3s2-23	B7s1-24	B4s5-25	B4s5-26	B4s5-27	B10s1-28	B10s3-29	B7s4-30	G1				
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
27	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Figura 15.** Matriz construida a partir de patrones de bandeado como presencia (1) o ausencia (0).

A partir de los perfiles enzimáticos obtenidos mediante ARDRA, se llevó a cabo la agrupación preliminar de los aislamientos.

➤ **Análisis de ARDRA**

La matriz de presencia y ausencia de patrones se analizó con el programa FREE TREE generándose un árbol de distancia, el cual se logró visualizar por medio del programa TREE VIEW ver. 1.24.0.0. La matriz de datos se analizó utilizando los algoritmos Neighbor-Joining y Jaccard.

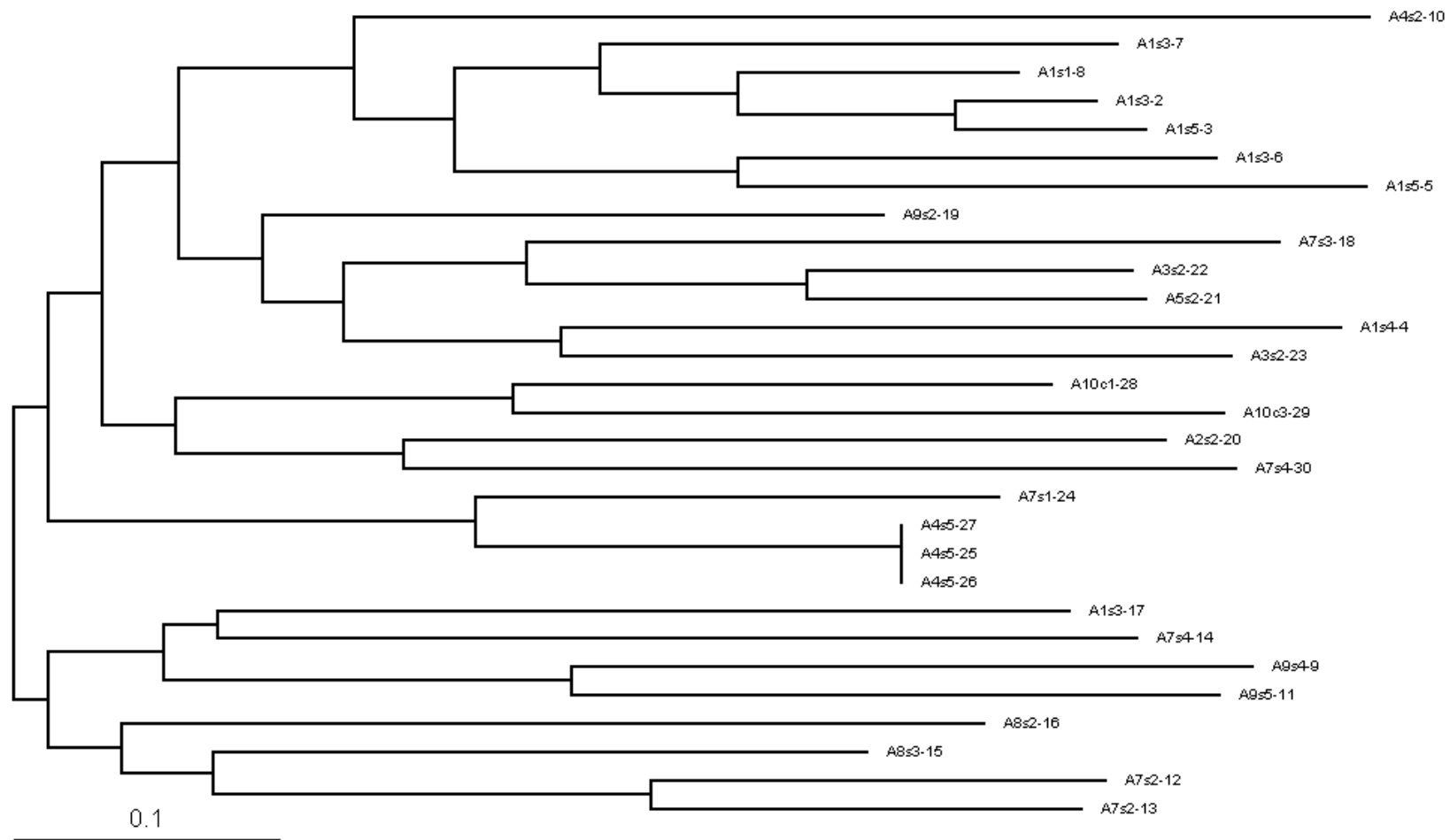
Cabe mencionar, que se intentó construir un árbol filogenético contemplando un análisis que incluída las restricciones teóricas de las especies del genero *Burkholderia*, sin embargo el resultado no fue exitoso, puesto que se generaban dos grandes grupos, uno perteneciente a los aislados y otro al de las especies *Burkholderia*. Lo que indica que para darle continuidad a este estudio se requerirá de un análisis taxonómico polifásico o bien la inclusión de un mayor número de endonucleasas.

Las figuras 16 y 17 muestran un árbol de distancia para cada uno de los muestreos.

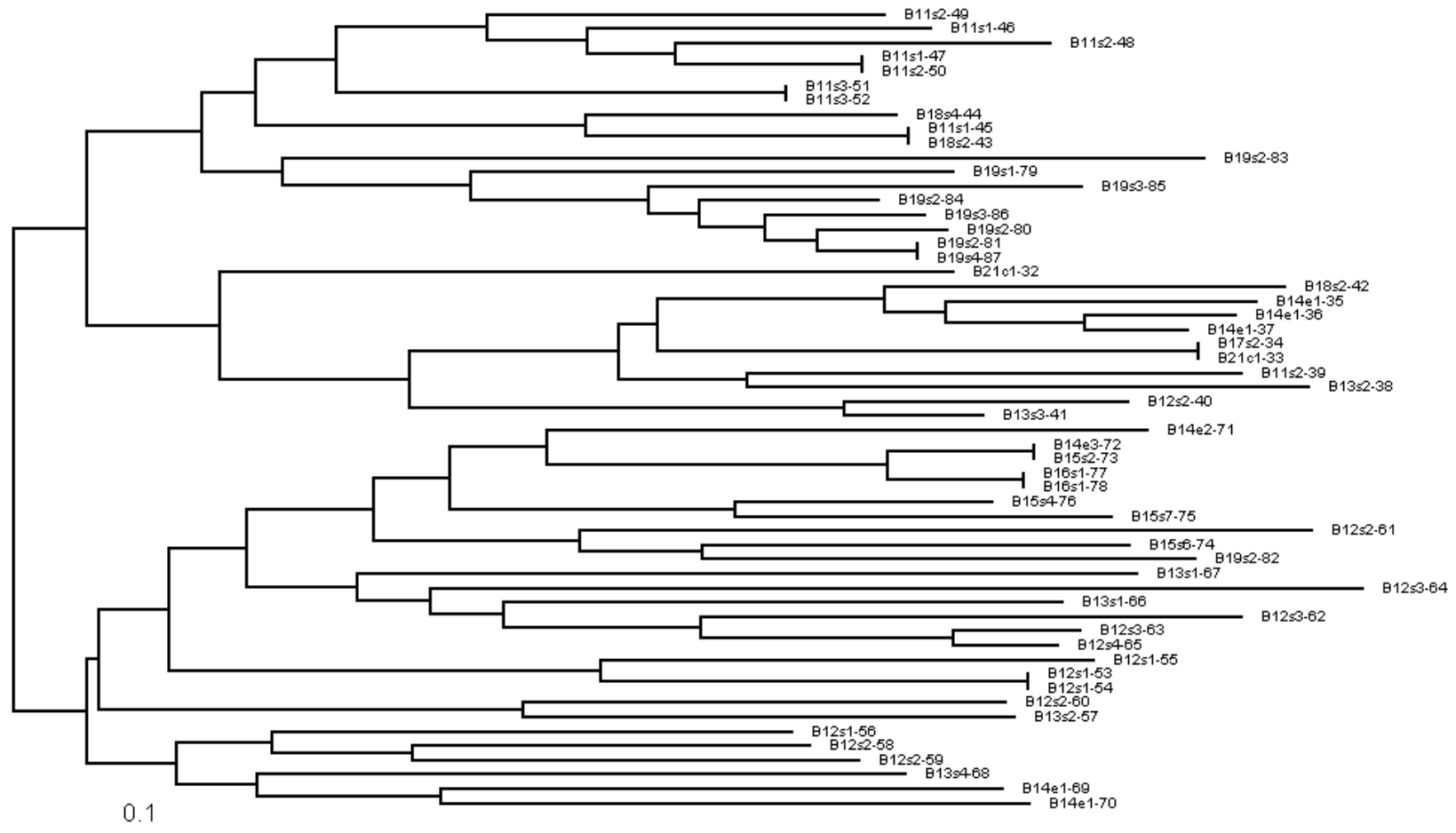
En el árbol de distancia perteneciente al grupo A, es notable la formación de dos grandes agrupaciones, la primera agrupación de aislamientos en la parte inferior, comparte la característica de que en su mayoría poseen un valor de pH neutro (con excepción del aislado A1s3-17, pH 5.2) y que todos se obtuvieron a partir de suelo rizosférico. Esta agrupación está comprendida por los aislados provenientes de palma, helecho y leguminosa.

La segunda agrupación en la parte superior, está comprendida en general por un considerable número de aislados, distinguiéndose la presencia de aquellos obtenidos a partir de maíz en mayor cantidad, luego de palma y seguido en menor número aislados provenientes de alfalfa, helecho, agave, nopal y encino. En comparación con el primer grupo, se coincide en que la mayoría de ellos provienen de suelo rizosférico, a excepción de los aislamientos A10c1-28 y A10c3-29, los cuales se obtuvieron a partir de muestras de agua de la presa de Valsequillo. Adicionalmente, en este segundo grupo se ha formado un subgrupo comprendido por siete aislados de maíz y uniéndose a este subgrupo un aislado de alfalfa.

Por otro lado, se observa claramente en el dendograma que los aislados A4s5-25, A4s5-26, A4s5-27 son clonas que se agruparon bajo un mismo nodo con un aislado obtenido a partir de palma. Además, se observó que un aislado de maíz se agrupó con un aislado de nopal (**Fig. 16**).



**Figura 16.** Árbol de distancia de los aislamientos obtenidos del Grupo A provenientes de la zona semi-árida. Se utilizaron patrones de digestión *HaeIII*, *AluI* y *MspI*. La matriz de datos se analizó con los algoritmos Neighbor-Joining y Jaccard, utilizando los programas FreeTree y TreeView.



**Figura 17.** Árbol de distancia de los aislamientos obtenidos del Grupo B provenientes de la zona templada-húmeda. Se utilizaron patrones de digestión *HaeIII*, *AluI* y *MspI*. La matriz de datos se analizó con los algoritmos Neighbor-Joining y Jaccard, utilizando los programas FreeTree y TreeView.

En la figura 19 se muestra el árbol de distancia perteneciente al grupo B que está comprendido por un total de 57 aislados, si se compara con el primer muestreo, el valor de pH del grupo B oscila en el rango de 4.8 a 6.0, con excepción de las muestras de agua provenientes de la Presa La Paz y la Laguna de Chignahuapan (pH 6.9 y 7.63, respectivamente).

De manera general, se observó que en el grupo B, los aislados en su mayoría se obtuvieron a partir de suelo rizosférico, con excepción de los aislamientos (endófitos/epifitos) obtenidos a partir de la orquídea, y dos aislados a partir de muestras de agua de la Laguna de Chignahuapan.

En el grupo B, también se forman dos grandes grupos. En el grupo inferior, se observa la presencia presuntiva de *Burkholderia* sp., destacándose en primer lugar, en especies forestales como el pino (12 aislados diferentes), y en maguey como segundo lugar, seguido los aislamientos obtenidos a partir de Bromelía, orquídea y musgo. También se observó, que posiblemente se encontró a la misma cepa en diferentes plantas silvestres: orquídea y Bromelía y compartimentos (B14e3-72 y B15s2-73, respectivamente).

En el grupo superior del grupo B, se detectó presuntivamente *Burkholderia* sp. en mayor número tanto en pino como en helecho agrupándose en su mayoría bajo un mismo nodo, y observándose que en algunos casos, se trata de la misma clona. Sin embargo, también existe la posibilidad de que la misma especie colonice ambos ambientes, como es el caso de: B17s2-34 y B21c1-33 (maíz y muestra de agua, Laguna Chignahuapan, respectivamente); B11s1-45 y b18s2-43 (helecho y maíz). Así mismo, se observó presuntivamente la presencia de *Burkholderia* sp. en orquídea y maguey.

A pesar de las limitantes que presenta este estudio preliminar de detección del género *Burkholderia* sin llegar a la identificación total de los aislamientos, tiene la intención de dar a conocer la diversidad que existe de género bajo la metodología empleada como etapa inicial de un estudio global sobre este género en el estado de Puebla. La ampliación y complementación de este estudio aportará favorablemente al conocimiento del género *Burkholderia* en relación a diferentes hábitats.

## XI. CONCLUSIONES

1. Las características climatológicas del estado de Puebla, favorecen el hábitat para el desarrollo de especies pertenecientes al género *Burkholderia*.
2. En el aislamiento, utilizando el medio PCAT se obtuvieron presuntivamente un total de 338 cepas de *Burkholderia* y este número se redujo en un 31% al utilizar medio Cetrimida con glicerol.
3. El uso de oligonucleótidos semi-específicos diseñados en base a regiones multi-variables del gen ribosomal 16S, condujo a la detección de 87 aislados presuntivamente pertenecen al género *Burkholderia*.
4. Bajo la metodología empleada, fue posible detectar la presencia del género *Burkholderia* en cultivos agrícolas (maíz, alfalfa), plantas silvestres (nopal, agave, palma, leguminosas, helecho, maguey, orquídea, bromelia, musgo), arboles maderables (pino y encino) así como en cuerpos de agua.
5. En general, el análisis de ARDRA mostró el agrupamiento de los aislados dependiendo de su origen de aislamiento.
6. La construcción de los árboles de distancia muestra una gran diversidad de microorganismos, lo que nos indica que existe una gran diversidad de cepas presuntas pertenecientes al género *Burkholderia*.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

(s.f.).

1. Aizawa, T., y Col. (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)2036-2041.
2. Avise, J. (2001). *The history and formation of species*. Unites States of America: Library of Congress Cataloging in Publication Data.
3. Bergmark, L., Poulsen, P.H.B., Al-Soud, W.A., Norman, A., Hansen, L.H., Sorensen, S.J. (2012). Assessment of the specificity of *Burkholderia* and *Pseudomonas* qPCR assays for detection of these genera in soil using 454 pyrosequencing. . *Research Letter*.
4. Bevivino, A., Dalmastri, C., Tabacchioni, S., Chiarini, L. (2000). Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biol Fertil Soils*, 225-231.
5. Brenner, D., Krieg, N.R., & Staley, J.T. (2005). The Proteobacteria. *Bergey's Manual of Syst. Bact.* 2ª Ed., 575-603.
6. Caballero-Mellado, J. (2006). Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* , 154-161.
7. 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*, 1165-1172.
8. 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*.
9. Coenye, T., Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches.

10. Coenye, T., Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of Burkholderias species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 719-729.
11. Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J.R.W., LiPuma, J.J. (2001). Taxonomy and Identification of the Burkholderia cepacia Complex. *Journal of Clinical Microbiology*.
12. Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clement, C., Barka, E.A. (2008). Diversity occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. *Microbiology Reviews*, 1574-6976.
13. Cannon, S. A., E. D. Lester, H. S. Shafaat, D. C. Obenhuber, and A. Ponce. (2007). Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils, *Journal of Geophysical research*, vol.112.
14. Cruz, L., de Souza, E.M., Weber, O.B., Baldani, J.I., Dobereiner, J., de Olivera Pedrosa, F. (2001). 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus (L.) Merrill*). *Applied and Environmental Microbiology*, 2375-2379.
15. Dalmastrri, C., y Col. (2005). Efficacy of species-specific recA PCR tests in the identification of Burkholderia cepacia complex environmental isolates. *FEMS (Microbiology Letters)*, 39-45.
16. De los Santos, E. P., Bustillos, R. C., Caballero, J. M. (2001). Burkholderia, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Applied Environmental Microbiology*.
17. Deng, W., Xi, D., Mao, H., Wanapat, M. (2007). The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Springer Science+Business Media*, 265-274.
18. Dreo, J. (2006). Cicle del nitrogen ca. svg.
19. Escalante, A. E. (2007). Ecología Molecular en el Estudio de Comunidades Bacterianas. *Ecología Molecular*, 394-424.
20. Escalante-Lozada, A., y Col. (2004). Diversidad bacteriana del suelo: metodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnologicas. *Red de Revistas Cientificas de America Latina*, 583-592.

21. Estrada, P., Mavingul, P., Cournoyer, B., Fontaine, F., Balandreau, J., Caballero-Mellado, J. (2002). A N<sub>2</sub>-fixing endophytic Burkholderia sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *NRC Research Press*, 285-293.
22. Fredrickson, J. K., y Col. (2004). Geomicrobiology of High-Level Nuclear Waste-Contaminated Vadose Sediments at the Hanford Site, Washington State. *Applied and Environmental Microbiology*, 4230-4241.
23. Frias-Salcedo, J. (2008). Burkholderia cepacia (B. cepacia). Nuevo patógeno de infecciones nosocomiales. Serie de casos clínicos. *Enf Inf Microbiol*, 19-23.
24. Gamboa-Salcedo, T., Cardoso-Hernandez, G., Saucedo-Ramirez, O. J., Peña-Alonso, Y. R. (2008). Burkholderia cepacia y enfermedad granulomatosa crónica. (Informe de un caso). *Mediagraphic Artemisa*.
25. Garrity, G., y Col. (2005). Orden Burkholderiales. *Manual Bergey's of systematic.*, 575-620.
26. Godoy, D., Randle, G., Simpson, Andrew J, Aanensen, D., Pitt, T., Kinoshita, R., Sprett, B. (2003). Multilocus Sequence Typing and Evolutionary Relationships among the Causative Agents of Melioidosis and Glanders, Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei. *Journal of Clinical Microbiology*.
27. Godoy, J. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Revista Científica de Ecología y Medio Ambiente*, 23-33.
28. Goris, J., de Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen III, J. F., Vandamme, P. (2004). Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as Burkholderia xenovorans sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1677-1681.
29. Granada, Universidad de. (2015). *Prácticas Online de Microbiología para Farmacéuticos*.
30. Gründger F., Jimenez N., Thielemann T., Straaten N., Lüders T., Richnow H. H., Krüger M. (2015). Microbial methane formation in deep aquifers of a coal-bearing sedimentary basin, Germany. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 20
31. Handelsman, J., y Col. (2002). Cloning the Metagenome: Culture-independent Access to the Diversity and Functions of the Uncultivated Microbial World. *Cloning the Metagenome*, 33:241-255.

32. Heungens, K., Parke, J.L. (2000). Zoospore Homing and Infection Events: Effects of the Biocontrol Bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on Two Oomycete Pathogens of Pea (*Pisum sativum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*.
33. Keller, M., Zengler, K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 141-150.
34. Kikuchi, Y., Meng, X.Y., Fukatsu, T. (2005). Gut Symbiotic Bacteria of the Genus *Burkholderia* in the Broad-Headed Bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Applied and Environmental Microbiology*.
35. King, E.O., Ward, M.K. y Raney, D.E. «Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin.» *Journal Lab Clin Med.* (2):301-307.
36. Kueda. *Naturalista*. (2014). Obtenido de Naturalista: <http://conabio.inaturalist.org/>
37. Lee, E. (2003). Continuous treatment of gas-phase trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in a two-stage continuous stirred tank reactor/trickling biofilter system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 572-574.
38. Lenntech, b. (2014). *Water Treatment Solutions. Lenntech*. Obtenido de Water Treatment Solutions. Lenntech: Water Treatment Solutions. Lenntech
39. Lim, Y., Baik, K.S., Han, S.K., Kim, S.B., Bae, K.S. (2003). *Burkholderia sordicola* sp. nov., isolated from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1631-1636.
40. LiPuma, J., Dulaney, B.J., McMenamin, D.J., Whitby, P.W., Stull, T.L., Coenye, T., Vandamme, P. (1999). Development of rRNA-Based PCR Assays for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 3167-3170.
41. LiPuma, J. J., y col. (1999). Development of rRNA-Based PCR Assays for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex Isolated Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology* (37): 3167-3170.
42. Lovley, D. R. (2003). Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews Microbiology*, 35-44.

43. Madigan, M. T., y Col. (2004). *Brock of Biology of Microorganisms*. Lippincott, Williams & Wilkins.
44. Maeda, Y., y Col. (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*, 1031-1038.
45. Moreno, S., Mellardo, C., J., Coutinho, G., B., Previato, M., L., James, K., E., Venturio, V. (2011). *Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated Burkholderia*. Springer.
46. Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the Beta-subclass of Proteobacteria. *International weekly journal of Science*, 948-950.
47. Musilova M., Tranter M., Bennett S. A., Wadham J., Anesio A. M. (2015). Stable microbial community composition on the Greenland Ice Sheet. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 20
48. *National Center for Biotechnology Informations*. (2009). Obtenido de National Center for Biotechnology Informations: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
49. Onofre-Lemus, J., Lucas-Hernandez, I., Girard, L., Caballero-Mellado, J. (2009). ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) Deaminase Activity, a Widespread Trait in *Burkholderia* Species, and Its Growth-Promoting Effect on Tomato Plants. *Applied and Environmental Microbiology*.
50. Pallud, C., y Col. (2001). Combined use of a specific probe and PCAT medium to study *Burkholderia* in soil. *Journal of microbiological Methods* (47) 25-34.
51. Plangklang, P. y Reungsang, A. (2012) *Chem Ecol.* (28): 253-266.
52. Payne, G. W., Remette, A., Rose, H. L., Weightman, A. J., Jones, T. H., Tiedje, J. M., Mahenthalingam, E. (2006). Application of a *recA* gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novels diversity in *Burkholderia* species.
53. Payne, G. W., Vandamme, P., Morgan, S. H., LiPuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J., Mahenthalingam, E. (2005). Development of a *recA* Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. *Applied and Environmental Microbiology*.

54. Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Castro-Gonzales, R., Estrada-de los Santos, P., Caballero-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.
55. Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Castro-Gonzalez, 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*.
56. Perin, L., Martinez-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. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1931-1937.
57. Rassa, A. C., McAllister, S. M., Safran, S. A., (2009). Zeta-Proteobacteria Dominate the Colonization and Formation of Microbial Mats in Low-Temperature Hydrothermal Vents at Loihi Seamount, Hawaii. *Geomicrobiology Journal*. (26)623-638.
58. *Red de Accion en Plaguicidas y sus alternativas para America Latina* (2008).
59. Reis, V., 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*, 2155-2162.
60. Rodicio, M. R., Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Formacion Medica Continuada*, 238-245.
61. Rondon, M., y Col. (1999). The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology*, 403-409.
62. Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Ait Barka, E., 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*, 1187-1192.

63. Sklarz, M. Y., Angel, R., Gillor, O., Soares, M. I. M. (2009). Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities. *Springer*, 659-664.
64. Stanier, R. Y., Palleroni, N. J., Doudoroff, M. (1966). The Aerobic Pseudomonas: a Taxonomic Study. *J. gen. Microbiolo.*, 159-271.
65. Tayeb, L. A., Lefevre, M., Passer, V., Diancourt, L., Brisse, S., Grimont, P.A.D. (2008). Comparative phylogenies of burkholderia, Ralstonia, Comamonas, Brevundimonas and related organisms derived from rpoB, gyrB and rrs gene sequences. *Research in Microbiology*, 169-177.
66. Thomson, R., Bertram, H. (2001). Laboratory diagnosis of central nervous system infections. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 1047-71.
67. Toledo, Y., Hernandez, A., Alvarez, M., Martin, G.M., Marquez, R. (2002). Determinacion del efecto antagonico de un biopreparado a partir de una cepa de Burkholderia cepacia ante Fusarium sp en el cultivo del gladiolo (Gladiolus sp). *Cultivos Tropicales*, 11-15.
68. Torsvik, V., Ovreas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 240-245.
69. Tortora, G., (2005). *Microbiology and Introduction*. Pearson.
70. Tran Van, V., Berge, O., Ngo Ke, S., Balandreau, J., Heulin, T. (2002). Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of Burkholderia vietnamiensis on early and late yield components in low fertility sulphates acid soils of Vietnam. *Plant and Soil*, 273-284.
71. Valencia, I., Hernandez, B.A. (2002). *Muestreo de suelos, preparación de muestras y guía de campo*. Mexico.
72. Vanlaere, E., Baldwin, A., Gevers, D., Henry, D., De Brandt, E., LiPuma, J. J., Vandamme, P. (2009). Taxon K, a complex within Burkholderia cepacia complex, comprise at least two novel species, Burkholderia contaminans sp. nov. and Burkholderia lata sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 102-111.
73. Vanlaere, E., Sergeant, K., Dawyndt, P., Kallow, W., Erhard, M., Sutton, H., Vandamme, P. (2008). Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-of-flight mass spectrometry of intact

cell allows rapid identification of Burkholderia cepacia complex. *Journal of Microbiological Methods*, 279-286.

74. Zhang, H., Hanada, S., Shigematsu, T., Shibuya, K., Kamagata, Y., Kanagawa, T., & Kurane, R. (2000). *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 743-749.

## 1. APÉNDICE

### a) Aislamiento

- Solución sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (g/l)

2.4647 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1000 ml Agua

- PCAT (g/l) pH = 5.7

0.1 Sulfato de Magnesio

2 Ácido Acelaico

4.0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

4.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.02 Extracto de Levadura

15.0 Agar

\*75 mg/l Azul de Bromotimol

\*2.5 g/l Clorotalonil (Filtrar antes de agregar. Agregar después de esterilizar)

- CALDO LB (g/l)

10.0 Peptona de Caseína

0.5 Ácido Succinico

15.0 Agar

### b) Caracterización Fenotípica

- AGAR CETRIMIDA (g/l) pH 7.2

20.0 Peptona de Caseína

1.4 Cloruro de Magnesio

10.0 Sulfato de Magnesio

0.3 Ceftriaxona

13.6 Agar

- AGAR LB

10.0 Peptona de Caseína

0.5 Ácido Succínico

15.0 Agar

\*Enriquecer el medio con Glicerol al 10%, para ayudar a las bacterias a emitir fluorescencia en caso de pertenecer al género *Pseudomonas*.

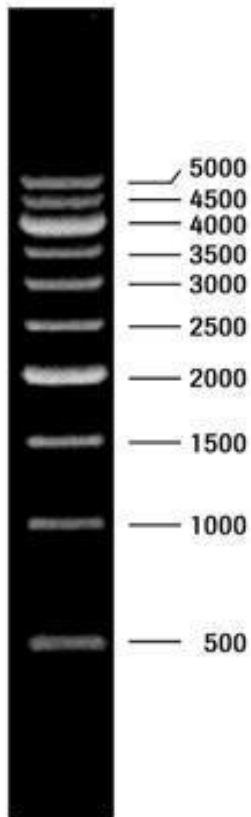
**c) Caracterización genotípica**

- Mix de PCR

	1 PCR/ 8µl
Agua	3.93
Buffer, MgCl	0.8
dNTP's	0.12
Oligos F	1
Oligos R	1
Taq	0.15
[DNA]	[1]

- Marcador de peso molecular

Del inglés, DNA Molecular Weight Marker XVII (0.7 % agarose gel)



- Gel de Agarosa 1%

1%	Agarosa
.20 ml	TAE 50X
97.8 ml	Agua TD

\*Diluir aplicando calor

- TAE 50X

1.- Preparar 40 ml de EDTA 0.5 M (pH 8)

7.44 g de EDTA en 40 ml de agua

2.- Para 250 ml de TAE 50X

Solución #2. Agregar 60.5 g TRIZMA y diluir en 190 ml de agua, mediante agitación

3.- En la solución #2, agregar 10 ml de EDTA 0.5 M (pH 8)

\*Ajustar pH 7.8 – 8.0 con Ácido acético cbp, con agitación.

**d) Perfil enzimático, ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)**

- Enzima HaeIII

Mix de Reacción

	Mix 12 ul
Agua	5.5 ul
Buffer	1.2 ul
Enzima	0.3 ul
DNA	5 ul

\*Se incubara la reacción durante 3 horas 37°C

- Enzima AluI

	Mix 12 ul
Agua	5.5 ul
Buffer	1.2 ul
Enzima	0.3 ul
DNA	5 ul

\*Se incubara la reacción durante 1 hora a 37°C

- Enzima MspI

Mix de Reacción

	Mix 12 ul
Agua	5.5 ul
Buffer	1.2 ul
Enzima	0.3 ul
DNA	5 ul

\*Se incubara la reacción durante 1 hora a 37°C

- Preparación del Gel de Agarosa 2%

2%            Agarosa

.20 ml        TAE 50X

97.8 ml      Agua TD

\*Diluir aplicando calor

## 2. APÉNDICE

Agrupación de los valores de corte obtenidos experimentalmente de los ensayos ARDRA, de nuestros aislamientos obtenidos.

### GRUPO A

Enzima	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>AluI</i>
GRUPO 1	1,4,6,18,23,24,29	18,23,24,29	23,24,
GRUPO 2	45,59	58,59,	58,32,59
GRUPO 3	32,	45,46	4,6
GRUPO 4	46, 58	33	17,18
GRUPO 5	36	36	36
GRUPO 6	54	54	45,46
GRUPO 7	17	1	1
GRUPO 8	33	4,6,32	33
GRUPO 9		17	54
GRUPO 10			29
GRUPO 11	58,74,75,126,128,125	58,69,75,125,126,128	75,125,126,128,
GRUPO 12	51, 133	51	51,69,72
GRUPO 13	62	133	133,
GRUPO 14	166	143	74
GRUPO 15	2,69,72	72	2
GRUPO 16	143	74	58
GRUPO 17		166	62
GRUPO 18		2	143
GRUPO 19		62	166

### GRUPO B

Enzima	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>AluI</i>
GRUPO 1	23,25,33,34,35,45,46,53, 58,62,66,68,69,70,79 <sup>a</sup> ,81, 91,94,98,127,130,137,152, 155,156,169,177,183,185, 190,193, 196, 197,203	34,35,42,45,46,51,53,58,62,66, 68,69,81,91,93,98,79 <sup>a</sup>	23,25,33,34,42,45,46,51,53,58,62 ,66,68,69,70,73,121,124,125,127, 130,185
GRUPO 2	1,2,4,9,11,13,18	90,127,130,137,148,148 <sup>a</sup> ,152,1 55,156, 177,183,190,203	1,2,4,9,13,18,28,35,84, 137
GRUPO 3	42 ,93,148,148 <sup>a</sup>	1,11,13,16,28,33,125	177,183,190,193,196,197,203
GRUPO 4	99,100,	2,4,9,73,84,87,121	91,93, 98,100,152,155,156,169
GRUPO 5	73,84,90	18,23,25	11, 148, 148 <sup>a</sup> ,90
GRUPO 6	16, 124	100,70	79 <sup>a</sup> ,81
GRUPO 7	28,87	169,185	87
GRUPO 8	121	197	94
GRUPO 9	51	94	99
GRUPO 10	125	99	16
GRUPO 11		124	
GRUPO 12		196	
GRUPO 13		193	

### 3. APÉNDICE

Nombre actualizado de los aislamientos obtenidos.

<b>GRUPO A</b>	
<b>Clave anterior</b>	<b>Clave actual</b>
<b>1A</b>	A1s3-1
<b>4A</b>	A1s3-2
<b>6A</b>	A1s5-3
<b>17A</b>	A1s4-4
<b>18A</b>	A1s5-5
<b>23A</b>	A1s3-6
<b>24A</b>	A1s3-7
<b>29A</b>	A1s1-8
<b>32A</b>	A9s4-9
<b>33A</b>	A4s2-10
<b>36A</b>	A9s5-11
<b>45A</b>	A7s2-12
<b>46A</b>	A7s2-13
<b>54A</b>	A7s4-14
<b>58A</b>	A8s3-15
<b>59A</b>	A8s2-16
<b>2B</b>	A1s3-17
<b>51B</b>	A7s3-18
<b>58B</b>	A9s2-19
<b>62B</b>	A2s2-20
<b>69B</b>	A5s2-21
<b>72B</b>	A3s2-22
<b>74B</b>	A3s2-23
<b>75B</b>	A7s1-24
<b>125B</b>	A4s5-25
<b>126B</b>	A4s5-26
<b>128B</b>	A4s5-27
<b>133B</b>	A10c1-28
<b>143B</b>	A10c3-29
<b>166B</b>	A7s4-30

<b>GRUPO B</b>	
<b>Clave anterior</b>	<b>Clave actual</b>
<b>1C</b>	B21c1-31
<b>2C</b>	B21c1-32
<b>4C</b>	B21c1-33
<b>9C</b>	B17s2-34
<b>11C</b>	B14e1-35
<b>13C</b>	B14e1-36
<b>16C</b>	B14e1-37
<b>18C</b>	B13s2-38
<b>23C</b>	B11s2-39
<b>25C</b>	B12s2-40
<b>28C</b>	B13s3-41
<b>33C</b>	B18s2-42
<b>34C</b>	B18s2-43
<b>35C</b>	B18s4-44
<b>42C</b>	B11s1-45
<b>45C</b>	B11s1-46
<b>46C</b>	B11s1-47
<b>51C</b>	B11s2-48
<b>53C</b>	B11s2-49
<b>58C</b>	B11s2-50
<b>62C</b>	B11s3-51
<b>66C</b>	B11s3-52
<b>68C</b>	B12s1-53
<b>69C</b>	B12s1-54
<b>70C</b>	B12s1-55
<b>73C</b>	B12s1-56
<b>79aC</b>	B13s2-57
<b>81C</b>	B12s2-58
<b>84C</b>	B12s2-59
<b>87C</b>	B12s2-60
<b>90C</b>	B12s2-61
<b>91C</b>	B12s3-62
<b>93C</b>	B12s3-63
<b>94C</b>	B12s3-64
<b>98C</b>	B12s4-65
<b>99C</b>	B13s1-66
<b>100C</b>	B13s1-67
<b>121C</b>	B13s4-68
<b>124C</b>	B14e1-69

<b>125C</b>	B14e1-70
<b>127C</b>	B14e2-71
<b>130C</b>	B14e3-72
<b>137C</b>	B15s2-73
<b>148C</b>	B15s6-74
<b>148aC</b>	B15s7-75
<b>152C</b>	B15s4-76
<b>155C</b>	B16s1-77
<b>156C</b>	B16s1-78
<b>169C</b>	B19s1-79
<b>177C</b>	B19s2-80
<b>183C</b>	B19s2-81
<b>185C</b>	B19s2-82
<b>190C</b>	B19s2-83
<b>193C</b>	B19s2-84
<b>196C</b>	B19s3-85
<b>197C</b>	B19s3-86
<b>203C</b>	B19s4-87

#### 4. APÉNDICE



### ***Burkholderia* sp. isolated from different environments in Puebla State with biotechnological potential.**

Ana Laura Antonio-Flores, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez, Ricardo Carreño-López, Jesús Muñoz-Rojas and Vianey Marín-Cevada.

*Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Edif. 103J, Puebla, Pue. 72570, Mexico.*

*E-mail:marincevadavianey@gmail.com*

*Key words: Carbofuran, pesticide, degrading-bacteria.*

**Introduction.** Carbofuran -2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl N methylcarbamate- is a broad spectrum systemic pesticide. The UK Environmental Protection Act (EPA) forbade its use in Europe in 2008; however, in our continent is still widely used in several crops such as maize, wheat, rice, soja, potato, sunflower, fruits and other vegetables as an insecticidal and nematocidal product. In addition, Argentinian farmers are controlling parrots population applying carbofuran into its nests. Humans can absorb it by inhalation, ingestion, through the skin or eyes. Carbofuran is characterised by an inhibition of the enzyme cholinesterase, which has a crucial role in all physiological responses in insects, mammals

and birds. Furthermore, in USA and other countries it has been demonstrated that this pesticide is present in ground and surface water (1).

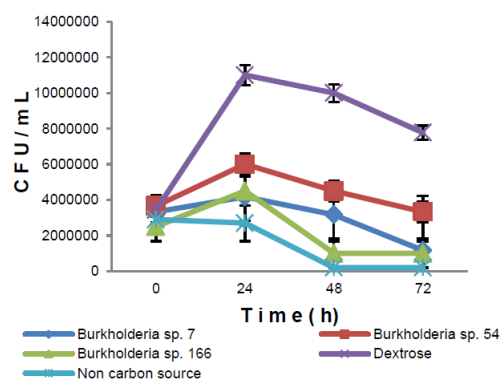
Bacterial carbofuran-degrading capability has been detected only in a reduced number of species of the genera *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Paracoccus*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Bosea*, *Microbacterium*, and *Burkholderia* (2,3). In the genera *Burkholderia*, *B. cepacia* PCL3 (2) and *B. pyrocinia* (3) have the ability to degrade it. The present study was conducted with the aim to isolate local strains of pesticide-degrading bacteria and evaluate their potential for bioremediation of carbofuran.

**Methods.** Soil and water samples were collected from different plants, crops and from Valsequillo dam located in a semi-arid area in Puebla State. For isolating *Burkholderia* spp., the selective medium PCAT was used. After DNA extraction, different multivariate regions of the 16S rRNA gene were amplified with two pairs of specific primers: RHG-F, R; BKH812F and BKH1249R (4,5). The presumptive *Burkholderia* sp. Isolates were spread on minimal agar plate containing different concentrations of carbofuran (50, 100, 150 and 200 mg/L) as a sole carbon source. As a positive control it was used Dextrose a carbon source and as negative control was use any carbon source. The carbofuran-derivatives: 3-keto-carbofuran (KCF) and 7-benzofuran were also tested. The experiment was done in triplicate and repeated three times. It was also determined an individual growth curve for the pesticide-degrading bacteria for 72 h at 30°C/150 rpm.

**Results.** From more than 200 isolates, only three were able to degrade carbofuran and carbofuran-derivatives on agar plate at 30°C during 72 h at different concentrations. The three isolates were able to grow on liquid mineral medium using carbofuran as a sole

carbon source at final concentration of 100 mgL<sup>-1</sup> (Fig.1).

These isolates were obtained from palm (*Chamaedorea nubium*) soil, maize soil and water sample from Valsequillo dam. The bacterial strains were identified by 16S rRNA gene sequence analysis.



**Fig.1** Growth of isolates in minimal medium containing Carbofuran [mgL<sup>-1</sup>].

**Conclusions.** Three isolates identified as *Burkholderia* sp. could degrade carbofuran and carbofuran-derivates as the sole carbon source on solid and liquid minimal agar. Degradation was done around 24 h at 30 °C in liquid minimal medium after inoculation.

**Acknowledgements.** This work was financially supported by VIEP-BUAP.

**References.**

1. Red de Acción en Plaguicidas y sus alternativas para América Latina (RAP-AL), 2008. [www.rap-al.org](http://www.rap-al.org)
2. Plangklang, P. and Reungsang A. (2012). *Chem Ecol.* (28): 253-266.
3. Dong Hs., Kim D.u., Seong C.N., Seong C.N., Song H.F and Ka J.o. (2012). *J. Microbiol. Biotechnol.* (2): 448-456.
4. Li-Puma, J. J., Dulaney, B. J., McMenamin, J. d., Whitby, P.W, Stull, T.T., Coenye T., Vandamme P. (1999). *J.Clin. Microbiol.* (37): 3167-3170.
5. Bergmark, L., Poulsen, P.H. B., Al-Soud, W.A. Norman, A., Hansen, L.K. and Sorensen, S.J. (2012). *Microbiol Lett.* (33): 77-84.