

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de:  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:  
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO *Burkholderia cepacia*,  
BACTERIA PRODUCTORA DE ANTIBIÓTICOS, MEDIANTE PCR EN  
TIEMPO REAL.

AUTOR:  
CRISTOFER WILSON SÁNCHEZ ROBALINO

TUTORA:  
VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

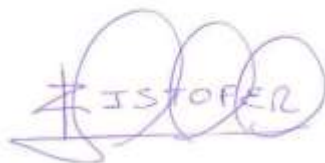
Quito, Septiembre del 2017

## Cesión de derechos de autor

Yo, Cristofer Wilson Sánchez Robalino, con documento de identificación N° 180454283-3, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: "Identificación molecular del Complejo *Burkholderia cepacia*, bacteria productora de antibióticos, mediante PCR en Tiempo Real", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En la aplicación a lo determinado por la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana

Quito, septiembre de 2017



.....  
Cristofer Wilson Sánchez Robalino

CI: 180454283-3

### **Declaratoria de coautoría de la docente tutora**

Yo, Viviana Pamela Chiluisa Utreras, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Identificación molecular del Complejo *Burkholderia cepacia*, bacteria productora de antibióticos mediante PCR en Tiempo Real”, realizado por Cristofer Wilson Sánchez Robalino, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerado como trabajo final de titulación.

Quito, septiembre del 2017



Viviana Pamela Chiluisa Utreras

CI: 171316825-8

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mis padres Teresita Robalino y Wilson Sánchez por su amor, apoyo incondicional, trabajo y sacrificio todos estos años, porque ellos han dado razón a mi vida, y que gracias a sus consejos y su paciencia, todo lo que soy es gracias a ellos.

A mis hermanos Alexis Lara, Viviana y Luigi Bosano, por estar siempre a mi lado, por sus consejos, apoyo, cariño y amor incondicional, por darme la dicha de tener cuatro hermosos sobrinos Matías, Dominic, Ariel y Josué, a los cuales cuidaré y protegeré como a mis hijos.

A mi familia, especialmente a mi abuelita Luz María Robalino por haberme cuidado, protegido y guiado desde pequeño, a mis primos Alexis, Andrés, Bryan, Erick, Carla y Alejandra por el apoyo que siempre me han brindado día a día y más que primos son mis verdaderos amigos.

**“Nada hay bajo el sol que no tenga solución,**

**nunca una noche venció a un amanecer”**

**WarCry**

## **Agradecimientos**

En primera instancia quisiera agradecer a la Universidad Politécnica Salesiana por haberme formado con valores en el transcurso de mi vida universitaria, a su vez a todos los docentes de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, los cuales han impartido sus conocimientos de la mejor manera, para así, formarnos como profesionales de bien y aptos para desempeñarnos en el transcurso de nuestras vidas.

A mi tutora, Ingeniera Viviana Chiluisa MSc., por su paciencia, tiempo y por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a ella impartíendome sus conocimientos.

A los Ingenieros Ivonne Vaca y Daniel Acurio, por todo su apoyo y colaboración prestada en el transcurso del proyecto, del cual surgió una buena amistad.

Al personal de los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, por permitirme hacer uso de sus instalaciones para realizar el proyecto y por su amable acogida.

A todos mis amigos, especialmente a Ruth López y Ricardo Fonseca, por su ayuda y amistad incondicional a lo largo del ciclo universitario compartido junto a ellos; conjuntamente mi gratitud a Lizeth Meza quien desinteresadamente colaboró en la etapa inicial del proyecto.

## Índice

<b>Introducción</b> .....	1
<b>Capítulo 1</b> .....	4
<b>Marco Conceptual</b> .....	4
1.1. Género <i>Burkholderia</i> .....	4
1.1.1. Características generales .....	5
1.1.2. Taxonomía del Complejo <i>Burkholderia cepacia</i> .....	5
1.1.2.1. Taxonomía .....	5
1.1.2.2. Complejo <i>B. cepacia</i> .....	6
1.1.3. Identificación de miembros del Complejo <i>B. cepacia</i> .....	9
1.1.3.1. Métodos de identificación .....	9
1.1.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	10
1.1.3.3. Identificación de genomovares del <i>CBC</i> basado en el gen <i>recA</i> .....	11
1.1.4. Importancia Biotecnológica .....	12
1.2. Métodos moleculares .....	14
1.2.1. Extracción y purificación del ADN .....	15
1.2.2. Cuantificación y Pureza del ADN .....	18
1.2.3. Técnica de análisis de ADN .....	19
1.2.3.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) .....	19

1.2.3.2. PCR en tiempo Real .....	22
<b>Capítulo 2</b> .....	25
<b>Materiales y métodos</b> .....	25
2.1. Selección de la muestra .....	25
2.2. Reactivación de cepas bacterianas .....	26
2.3. Resiembra de cepas .....	27
2.4. Concentración bacteriana .....	27
2.5. Extracción de ácidos nucleicos .....	28
2.5.1. Técnica de extracción y purificación de ADN con kit “High Pure Template Preparation Kit” (ROCHE).....	28
2.5.2. Técnica de extracción de ADN por Ebullición – Modificado .....	29
2.5.3. Técnica de extracción de ADN con solventes orgánicos Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico – Modificado .....	30
2.6. Cuantificación de ADN.....	31
2.7. Pureza de ADN .....	32
2.8. Amplificación mediante PCR tiempo real .....	33
2.9. Análisis estadístico.....	35
2.9.1. Análisis estadístico de la concentración (ng/mL) de ADN .....	35
<b>Capítulo 3</b> .....	36
<b>Resultados y Discusión</b> .....	36
3.1. Concentración bacteriana .....	36
3.2. Extracción de ADN .....	38

3.2.1. Cuantificación de ADN .....	38
3.2.2. Pureza del ADN .....	41
3.3. Identificación molecular de <i>Burkholderia cepacia</i> mediante PCR en tiempo real.	44
<b>Conclusiones</b> .....	49
<b>Recomendaciones</b> .....	51
<b>Referencias</b> .....	52



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> .....	8
<b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas de los métodos tradicionales y comerciales de extracción y purificación de ADN .....	17
<b>Tabla 3.</b> Codificación de las cepas bacterianas .....	25
<b>Tabla 4.</b> Cepas aisladas de suelos de las regiones naturales del Ecuador que presentan capacidad antibiótica.....	26
<b>Tabla 5.</b> Patrones de turbidez McFarland y su equivalencia en UFC/mL .....	27
<b>Tabla 6.</b> Estimación de la pureza de ADN considerando la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm.....	32
<b>Tabla 7.</b> Cebadores de PCR específicos utilizados en la investigación .....	34
<b>Tabla 8.</b> Concentración bacteriana analizada mediante la escala McFarland. ....	37
<b>Tabla 9.</b> Concentración total promedio de ADN en las cepas BC1 y BC2.....	38
<b>Tabla 10.</b> Pureza de ADN en las cepas BC1 Y BC2.....	41

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Burkholderia cepacia</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Reaccion en Cadena de la Polimerasa o PCR.....	20
<b>Figura 3.</b> Amplificación exponencial de la PCR .....	21
<b>Figura 4.</b> Tukey 5% en datos de concentración obtenida para BC1. ....	39
<b>Figura 5.</b> Tukey 5% en datos de concentración obtenida para BC2. ....	40
<b>Figura 6.</b> Curva de amplificación para la cepa BC1. ....	44
<b>Figura 7.</b> Curva de amplificación para la cepa BC2 .....	45

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Activación de cepas bacterianas.....	60
<b>Anexo 2.</b> Estudio de los cebadores para la identificación de <i>Burkholderia cepacia</i> en la base de datos NCBI.....	61
<b>Anexo 3.</b> Parámetros de programación para el equipo LightCycler 2.0.....	64
<b>Anexo 4.</b> Concentración bacteriana (UFC/mL) analizada mediante la técnica McFarland.....	65
<b>Anexo 5.</b> Concentración de ADN total analizada mediante Quibit 2.0 Fluorometer®.....	66

## Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo principal identificar molecularmente bacterias productoras de antibióticos del Complejo *Burkholderia cepacia*; identificadas bioquímicamente como *Burkholderia cepacia* por Egas y Tinajero (2016), con un porcentaje de probabilidad 88,79% y 99,51% para BC1 y BC2 respectivamente. Para alcanzar el objetivo, se analizaron estadísticamente los métodos de extracción y purificación de ADN: Kit-Roche, Ebullición y PCI, la prueba ANOVA y Tukey determinó una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) entre los métodos implementados, la metodología Kit-Roche presentó los mejores resultados de calidad y concentración  $8,80E+03$  y  $3,61E+03$  (ng/mL) de ADN para BC1 y BC2; sin embargo el método por Ebullición se muestra como una alternativa de bajo costo al presentar pureza y una concentración de  $2,40E+03$  y  $2,41E+03$  (ng/mL) de ADN para BC1 y BC2, características de calidad aceptables para la técnica PCR en tiempo real. Para la identificación molecular, se amplificaron las regiones 16S rARN-*CBC*, *Burkholderia sp. (recA)* y *B. cepacia*-genomovar I (*recA*) empleando primers específicos, el análisis de las curvas de amplificación obtenidas mediante PCR en tiempo real confirmaron que BC1 pertenece a la especie *Burkholderia cepacia* (genomovar I), especie que conforma el Complejo *Burkholderia cepacia*; a su vez, se confirmó que BC2 pertenece al: género *Burkholderia*, pero no se corroboró el genomovar del organismo; sin embargo se asevera que la cepa pertenece algún genomovar del *CBC* basándonos en la amplificación de la región 16S para *CBC* y su identificación bioquímica.

**Palabras clave:** Complejo *Burkholderia cepacia*, gen *recA*, genomovar, identificación molecular, PCR en tiempo real.

## Abstract

The following research had as the main objective to identify molecularly bacteria producers of antibiotics from the *Burkholderia cepacia* Complex. They were identified biochemically as *Burkholderia cepacia* by Egas and Tinajero (2016) with a probability percentage of 88,79% and 99,51% for BC1 and BC2, respectively. In order to reach the aim, the methods of extraction and purification of DNA were analyzed statistically by Kit-Roche, Boiling and PCI. The ANOVA test and Tukey determined a significant difference ( $p < 0,001$ ) among the methods implemented. The Kit-Roche methodology presented the best results of quality and concentration of  $8,80E+03$  and  $3,61E+03$  (ng/mL) DNA for BC1 and BC2. However, the boiling method is shown as a low cost alternative to demonstrate purity and concentration of  $2,40E+03$  and  $2,41E+03$  (ng/mL) DNA for BC1 and BC2, which are acceptable quality characteristics for the Real-time PCR technique. For molecular identification, 16S rRNA-CBc regions, *Burkholderia* sp. (*recA*) and *B. cepacia*-genomovar I (*recA*) were amplified using specific primers. The analysis of the amplification curves obtained by Real-time PCR confirmed that BC1 belongs to *Burkholderia cepacia* species (genomovar I), a species that forms the *Burkholderia cepacia* complex. In turn, it was confirmed that BC2 belongs to the *Burkholderia* genus, but the genomovar of the organism was not corroborated; however, it is asserted that the strain belongs to some genomovar CBc based on the amplification of the 16S region for CBc and its biochemical identification.

**Keywords:** *Burkholderia cepacia* Complex, genomovar, molecular identification, Real-time PCR, *recA* gene.

## Introducción

*Burkholderia cepacia*, bacilo gram negativo no fermentador (BGNNF); identificado como un fitopatógeno y reconocido actualmente como un importante patógeno oportunista; comprende un grupo muy heterogéneo de especies fenotípicamente similares pero filogenéticamente distintas, conocidos como genomovares que conforman lo que se denomina Complejo *Burkholderia cepacia* (CBc) (Araque, Flores, Ramírez, Alonso, & Rodríguez, 2008; Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011; Traverso, 2013).

Existen al menos veinte variedades genómicas dentro del CBc, mismos que presentan una estrecha relación tanto en términos genéticos como fenotípicos, por lo que resulta difícil diferenciarlas; las metodologías utilizadas en microbiología básica han resultado insuficientes al momento de generar un diagnóstico preciso en la identificación de dichos genomovares, lo que ha llevado al desarrollo de diferentes técnicas de detección e identificación más rápidas y precisas, como: métodos bioquímicos convencionales y comerciales, pruebas complementarias altamente selectivas y técnicas moleculares, siendo la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizada como herramienta de tipificación definitiva en la detección de genomovares del CBc y géneros relacionados (Araque, 2008; Araque, et al., 2008; Mirabell, 2015).

Las técnicas de identificación molecular en bacterias, han llevado a la búsqueda de genes candidatos que permitieran establecer relaciones filogenéticas entre estos, los genes que codifican para las subunidades 5S, 16S, 23S del ARNr y sus espacios intergénicos han sido muy utilizados en la investigación taxonómica de muchos

géneros bacterianos, sin embargo, el análisis de 16S ARNr para establecer diferencias filogenéticas dentro del *CBC* queda limitada, por lo que una alternativa es la amplificación de los fragmentos del gen *recA*, ya que presenta suficiente variación nucleotídica para permitir dicha discriminación entre sus variantes (Canale, 2004; Bou et al., 2011).

La técnica de PCR en tiempo real presenta grandes ventajas y sencillez en su empleo, acoplando en una misma reacción, la química de la PCR convencional con la detección de una sonda fluorescente al producto amplificado, proporcionando resultados de excelente sensibilidad y especificidad, bajo riesgo de contaminación y una mayor rapidez en la obtención de resultados. Esto ha colocado a la tecnología de la PCR en tiempo real como una alternativa atractiva de rápida identificación, caracterización y diagnóstico de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos de importancia (Costa, 2004; Espy et al., 2006; Araque, 2008; Bravo & Procop, 2009).

En los últimos años, genomovares pertenecientes al *CBC* han sido de gran importancia en estudios referentes a la agricultura, como agentes de control biológico con actividad antifúngica, mejora del rendimiento en los cultivos, producción de antibióticos, biorremediación de vertederos, suelos contaminados y aguas subterráneas, convirtiéndose en organismos con un alto potencial biotecnológico (Govan, Hughes, & Vandamme, 1996; Araque, 2008).

Por estas razones, en la presente investigación se trazó como objetivo principal, identificar molecularmente bacterias productoras de antibióticos del Complejo *Burkholderia cepacia* mediante PCR en tiempo real de muestras crioconservadas del proyecto de investigación previo, realizado por Egas y Tinajero (2016) titulado

“Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelo de las regiones naturales del Ecuador”. En el estudio antes mencionado se caracterizaron morfológica y bioquímicamente dos cepas bacterianas capaces de generar antibióticos, identificadas como *Burkholderia cepacia*, por lo que se requiere corroborar molecularmente dicha identificación bioquímica. Para cumplir con la investigación se deberá, re activar dos cepas crioconservadas del cepario de la Universidad Politécnica Salesiana, determinar la concentración inicial bacteriana en las muestras obtenidas por medio de la técnica McFarland para proseguir con la comparación de tres metodologías de extracción de ácidos nucleicos en bacterias gram negativas, utilizando el kit “High Pure Template Preparation Kit” de la casa comercial Roche, la técnica de ebullición y la técnica por solventes orgánicos Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (PCI); para el análisis de concentración y pureza de ADN se utilizarán las técnicas de fluorimetría con el equipo Qubit 2.0 Fluorometer®, y espectrofotometría con el equipo NanoDrop respectivamente, además, identificar las cepas bacterianas mediante el análisis de las curvas de amplificación, producto de la técnica de PCR en tiempo real.

Para ello se estableció como hipótesis alternativa, que la técnica de PCR en tiempo real mediante el análisis de la región *recA*-específica en *Burkholderia cepacia*, permite la identificación molecular de las cepas bacterianas.

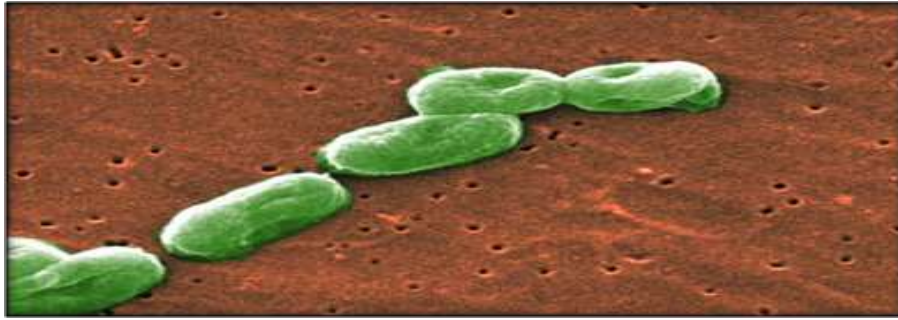


# Capítulo 1

## Marco Conceptual

### 1.1. Género *Burkholderia*

*Burkholderia cepacia*



**Figura 1.** Microscopía electrónica de barrido (SEM) de *Burkholderia cepacia*.

Tomado de Carr (2016).

Los miembros pertenecientes al género *Burkholderia*, son organismos aeróbicos, gram negativos, no formadores de esporas, típicamente bacilos rectos o ligeramente curvados, cuya longitud varía de 1 a 5  $\mu\text{m}$  y 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de ancho; son organismos móviles debido a la presencia de uno o más flagelos polares, dentro del gran grupo de bacterias gram negativas, es uno de los géneros más importantes, ya que al poseer un genoma complejo formado por varios replicones, sus miembros presentan una extraordinaria versatilidad metabólica y una gran capacidad para adaptarse a diversos y nuevos ambientes, se los localiza generalmente en ambientes acuáticos, suelos y formando relaciones simbióticas con otros microorganismos y plantas (Canale, 2004; Araque, 2008; Araque et al., 2008).

### **1.1.1. Características generales**

*Burkholderia cepacia*, aerobio estricto perteneciente al grupo de bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF), organismo oxidasa y catalasa positivo, quimioorganotrófico capaz de obtener su energía de la oxidación de compuestos orgánicos como: carbohidratos, alcoholes y aminoácidos; puede encontrarse en diferentes hábitats, tales como: agua, suelo, plantas, rizósfera, en diversas regiones geográficas y en fuentes como animales (Araque et al., 2008).

*B. cepacia* puede sobrevivir en ambientes hostiles por largos periodos de tiempo (desinfectantes, sobre y dentro de equipos hospitalarios y farmacéuticos), presenta una capacidad intrínseca que les confiere resistencia a los agentes antimicrobianos (aminoglucósidos, polipéptidos, betalactámicos), además, necesita requerimientos mínimos para su crecimiento; en el laboratorio es capaz de crecer en medios de cultivo comunes (agar nutritivo, TSA, TSB) y en medios de cultivo selectivos para su aislamiento (agar MacConkey, medios con colorantes bacteriostáticos y antibióticos con pH bajo, BCSA-*B. cepacia* selective agar), su temperatura óptima de crecimiento bordea los 30 a 37 °C, aunque son capaces de sobrevivir y probablemente crecer a temperatura bajas (4°C) (Canale, 2004; Araque et al., 2008; Sawana, Adeolu, Gupta, & Gupta , 2014).

### **1.1.2. Taxonomía del Complejo *Burkholderia cepacia***

#### **1.1.2.1. Taxonomía**

*B. cepacia*, originalmente asignado al género *Pseudomonas* como *P. cepacia* y recibiendo algunas otras denominaciones a lo largo del tiempo como *P. multivorans*

y *P. kingii*, fue descrito por primera vez en 1950 por el fitopatólogo Walter Burkholder como bacteria responsable de la descomposición de los bulbos en la cebolla (piel amarga) (Canale, 2004). En 1992 diversos estudios basados en el análisis de la similitud ADN-ADN, secuencias del gen 16S ARNr, y características fenotípicas, plantearon que *P. cepacia* y otros géneros pertenecientes al grupo II ARNr del género *Pseudomonas* fueran transferidas al nuevo género *Burkholderia*, pertenecientes a la subdivisión beta ( $\beta$ ) del phylum *Proteobacteria*, incluyendo en este a la especie *Burkholderia cepacia* (anteriormente *Pseudomona cepacia*) (Canale, 2004; Araque, 2008).

La taxonomía del género *Burkholderia* ha sufrido varios cambios desde su descripción, en la actualidad el número de especies identificadas y validadas se ha incrementado a por lo menos cien (Eberl & Vandamme, 2016).

#### **1.1.2.2. Complejo *B. cepacia***

A partir de 1990 en adelante, estudios observaron una marcada heterogeneidad entre varias cepas bacterianas aisladas de diferentes nichos ecológicos, a las cuales, utilizando diversas técnicas de identificación bacteriana de la época, las clasificaron tentativamente como *B. cepacia*; dicha heterogeneidad entre cepas, trajo consigo una problemática aún mayor, en cuanto a la evaluación de las técnicas empleadas para la identificación bacteriana, mostrando que las mismas no eran lo suficientemente sensibles y/o específicas (Canale, 2004).

La carencia de esquemas confiables para la correcta identificación de *B. cepacia*, condujo a que en 1996 se llevara a cabo la realización de un amplio estudio

taxonómico polifásico (genotípico y fenotípico), analizando cepas aisladas de diversas fuentes clínicas y ambientales mediante la aplicación de pruebas bioquímicas, perfil de ácidos grasos celulares, electroforesis de proteínas celulares, hibridación ADN-ADN e hibridación ADN-ARNr, el estudio determinó que las cepas identificadas como *B. cepacia*, constituían por lo menos cinco especies genómicas distintas o genomovares (genomovar, término introducido para denotar especies fenotípicamente similares pero genéticamente distintas); en 1997 durante la conferencia *Third International Burkholderia cepacia working group* en British Columbia, Canadá, a dichos genomovares (I-V, incluida la especie *B. vietnamiensis*), se decidió denominar Complejo *Burkholderia cepacia* (CBC) (Araque et al., 2008; Mirabell, 2015).

Hasta el 2004 se descubrieron 4 nuevos genomovares (VI-IX), y otros fueron descritos y formalmente nombrados dentro del CBC: “*Burkholderia cepacia* (genomovar I), *Burkholderia multivorans* (genomovar II), *Burkholderia cenocepacia* (genomovar III), *Burkholderia stabilis* (genomovar IV), *Burkholderia vietnamiensis* (genomovar V), *Burkholderia dolosa* (genomovar VI), *Burkholderia ambifaria* (genomovar VII), *Burkholderia anthina* (genomovar VIII) y *Burkholderia pyrrocinia* (genomovar IX)” (Traverso, 2013).

Estudios realizados en los años 2008, 2009, 2013 y 2015 basados en el análisis y comparación del gen *recA* y técnicas de *multilocus sequence analysis*, permitieron la descripción de once especies más dentro del CBC, describiéndose hasta la actualidad un total de 20 especies sin descartar que en un futuro puedan describirse nuevas especies para el CBC (Mirabell, 2015), Véase Tabla 1.

**Tabla 1.**Especies del Complejo *Burkholderia cepacia*.

<b>Especies</b>	<b>Antigua designación</b>	<b>Año de identificación</b>
	<b>Genomo variedad</b>	<b>y/o denominación</b>
<i>B. cepacia</i>	I	1950, 1997
<i>B. multivorans</i>	II	1997
<i>B. cenocepacia</i>	III	1997, 2003
<i>B. stabilis</i>	IV	1997, 2000
<i>B. vietnamiensis</i>	V	1995, 1997
<i>B. dolosa</i>	VI	2001, 2004
<i>B. ambifaria</i>	VII	2001
<i>B. anthina</i>	VIII	2002
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	2002
<i>B. ubonensis</i>		2000, 2008
<i>B. latens</i>		2008
<i>B. diffusa</i>		2008
<i>B. seminalis</i>		2008
<i>B. metallica</i>		2008
<i>B. contaminans</i>		2009
<i>B. lata</i>		2009
<i>B. pseudomultivorans</i>		2013
<i>B. stagnalis</i>		2015
<i>B. territorii</i>		2015

Nota: Adaptado de Mirabell (2015). Aspectos microbiológicos de *Burkholderia cepacia complex* en pacientes con fibrosis quística, elaborado por el autor, 2017.

### **1.1.3. Identificación de miembros del Complejo *B. cepacia***

Desde hace años atrás, la identificación de los miembros del *CBc* se ha mostrado dificultosa, ya que los genomovares que comprenden dicho complejo y géneros bacterianos como *Pseudomonas* o *Stenotrophomonas* y principalmente bacterias pertenecientes al grupo BGNNF, pueden presentar características fenotípicas similares y encontrarse estrechamente relacionados con muy pocas reacciones bioquímicas capaces de diferenciarlos, requiriendo de múltiples pruebas para una identificación precisa (Coenye, Vandamme, Govan, & Lipuma, 2001; Canale, 2004).

#### **1.1.3.1. Métodos de identificación**

La correcta identificación de las especies que conforman el *CBc* es de suma importancia dada las características biológicas, epidemiológicas, patogénicas y de resistencia que presenta este complejo; al ser un grupo fenotípicamente similar, la identificación de los genomovares del *CBc* se realiza mediante el análisis y combinación de métodos microbiológicos convencionales que incluyen análisis bacteriológicos basados en las características intrínsecas del género y/o especies, estudios fenotípicos con análisis morfológicos y pruebas metabólicas bioquímicas (coloración al Gram, crecimiento en medio selectivo, movilidad y morfología, reacciones de oxidación y descarboxilación, etc.), pruebas de susceptibilidad bacteriana, análisis de ácidos grasos, aplicación de métodos semiautomáticos empleando galerías bioquímicas (API 20 NE, Vitek NFC, Vitek GNI, Microsan, BIOLOG), que pueden identificar a las especies bioquímicamente más activas con un grado de aceptable precisión; sin embargo, los métodos convencionales resultan insuficientes para el diagnóstico microbiológico certero de los genomovares y su

relación con otros miembros del grupo BGNNF, por lo que se pueden producir errores en la identificación (Araque et al., 2008; Mirabell, 2015).

Al ser las pruebas metabólicas poco específicas, la identificación de los genomovares debe ser confirmada mediante métodos moleculares, siendo complementos altamente discriminatorios en la diferenciación de los miembros del *CBC*, los métodos moleculares tales como: análisis de proteínas por electroforesis en SDS-PAGE, hibridación de ADN-ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), polimorfismo de fragmentos específicos amplificados (*amplified fragment length polymorphism* [AFLP]), amplificación y secuenciación del gen 16s ARNr, el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN (*PCR-restriction fragment length polymorphism* [RFLP]) sobre el gen 16s ARNr, técnicas como la amplificación, secuenciación y RFLP del gen *recA*, *multilocus sequence typing* (MSLT) y *matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), son consideradas como las más apropiadas que ofrecen eficacia y rapidez en la identificación, diferenciación y caracterización de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* (Araque et al., 2008; Mirabell, 2015).

### **1.1.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Al ser la identificación de los miembros del complejo *B. cepacia* difícil, las pruebas rutinarias de laboratorio conducen con frecuencia a la caracterización errónea de estos, siendo necesario emplear métodos de tipificación molecular de fácil aplicación y confiables; las pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su variante moderna la PCR en tiempo real, son altamente discriminatorias y pueden

correlacionarse con técnicas de genotipificación, permitiendo que la metodología altamente específica, sensible y eficiente de la PCR en tiempo real sea ampliamente utilizada para la delimitación de las variedades genómicas del *CBc* (Araque et al., 2008).

### **1.1.3.3. Identificación de genomovares del *CBc* basado en el gen *recA***

La base del estudio filogenético y taxonómico del género *Burkholderia* desde su descripción ha sido el análisis de la macromolécula 16S ARNr, que ha formado parte integral del estudio taxonómico de muchos géneros bacterianos (Sawana et al., 2014).

En sus inicios, las metodologías aplicadas a la técnica PCR y el uso de secuencias polimórficas para los genes 16S y 23S ARNr del *CBc*, permitieron identificar los genomovares II y V, pero no lograron distinguir los genomovares I, III y IV del complejo, identificándolos como un solo grupo; el desarrollo de la técnica PCR especie-específica permitió dicha distinción, sin tener éxito aun al distinguir el genomovar I, donde se dedujo que la variación de secuencia nucleotídicas dentro del gen 16S ARNr es limitada para distinguir con precisión todos los genomovares del complejo *B. cepacia* (Mahenthiralingam et al., 2000; Payne et al., 2005).

Las inferencias obtenidas en el análisis de gen 16S ARNr han sido reforzadas con técnicas filogenéticas basadas en el análisis del gen *recA*, gen que ha sido ampliamente aplicado en la sistemática bacteriana y ha demostrado ser muy útil en la identificación de especies complejas; el gen *recA* codifica para la proteína *RecA*, proteína esencial para la recombinación y reparación del ADN en el *CBc* siendo



ampliamente estudiado, el gen se encontró en el cromosoma más grande del genoma de las cepas del complejo con una sola copia presente, además, se demostró la existencia de suficiente variación en la secuencia nucleotídica del mismo, por lo que, la aplicación exitosa de la técnica de PCR para la amplificación del gen *recA* con iniciadores especie-específicos conjuntamente con RFLP, han permitido visualizar y demostrar la diversidad taxonómica del complejo, así mismo, proporciona un enfoque más robusto, rápido y de alta especificidad en la identificación y clasificación de los genomovares en el grupo taxonómicamente complejo (Mahenthiralingam et al., 2000; Canale, 2004; Sawana et al., 2014).

#### **1.1.4. Importancia Biotecnológica**

En los últimos años, miembros del *CBC* y cepas del género *Burkholderia* han presentado gran importancia biotecnológica, convirtiéndose en organismos con un alto potencial medioambiental gracias a la producción de una amplia gama de metabolitos activos y a su versatilidad metabólica; estudios han demostrado que la expresión de productos extracelulares en estas bacterias está influenciado por el ambiente en el que se encuentran y su forma de regulación global, permitiendo que las bacterias alteren su expresión genética de acuerdo a la densidad poblacional del medio para coordinar su comportamiento (*Quorum sensing*), mecanismos que les han otorgado características intrínsecas como: su capacidad para biorremediar y degradar suelos contaminados con compuestos aromáticos clorados (compuestos tóxicos presentes en complejos herbicidas y pesticidas, algunos con un alto potencial cancerígeno) y utilizarlos como fuente de carbono y energía, propiedades antifúngicas, antibióticas y capacidad antagonista frente a patógenos como:

*Alternaria aphanomyces* y *Rhizoctonia solan*, que atacan a plantas de interés agrícola (oleaginosas, hortalizas y guisantes) y como organismos de control biológico en la mejora de los rendimientos de los cultivos (Araque et al., 2008; Bergey, 2015; Depoorter et al., 2016).

*Burkholderia cepacia* ha demostrado ser una bacteria muy versátil y útil con diferentes mecanismo que son aprovechables en el ámbito biotecnológico. *B. cepacia* presenta: propiedades antifúngicas y hemolíticas inhibiendo el crecimiento de *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium frequentans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium echinulatum*, *Candida tropicalis* y *Candida famata*, capacidad de producir compuestos como: pirrolnitrina, cepalycinas y ocho péptidos cíclicos del grupo de las xilocandinas en donde dos de estos (A1 y A2) presentan actividad anticandidal y antidermatofítica (Araque, 2008; Depoorter et al., 2016).

La actividad antagónica de *B. cepacia* no está limitada a su poder antifúngico, sino que además, genera una amplia producción de compuestos extracelulares: proteasas, lectinasas, elastasas, quitinasa, 3-glucanasa, entre otras; también se caracteriza por su asociación a la rizósfera de varios cultivos, destacándose entre sus mecanismo de acción el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la producción de reguladores de crecimiento vegetal (Ácido Indol Acético [AIA], promueve el crecimiento, desarrollo y rendimiento de la planta) y el control biológico de patógenos en plantas con la producción de sideróforos (pioquelin, cepabactin y ornibactin), igualmente, su poder antibiótico frente a diversos géneros como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, BGNNF y *Pseudomonas aeuroginosa* (cepas patógenas de importancia en ambientes hospitalarios) y frente a

super-bacterias resistentes a antibióticos actuales (*S. aureus* resistente a la meticilina), con la producción de compuestos como: enacyloxin IIa, gladiolin, vietnamycin, fenazina y 2,4-Diacetilfloroglucinol; características que convierten a las bacterias del género *Burkholderia* en una fuente inexplorada, prometedora de antibióticos nuevos y novedosos para combatir bacterias multirresistentes (Araque et al., 2007; Indra et al., 2012; Bergey, 2015; Depoorter et al., 2016; Research Councils UK, 2017).

## **1.2. Métodos moleculares**

La gran complejidad de los procesos intrínsecos (biológicos) de los seres vivos, ha llevado a científicos e investigadores a centrar su atención en descifrar los mecanismos que se esconden detrás de esos procesos tan complejos; a partir de los estudios de Gregorio Mendel en genética, se sabe que la explicación a los diferentes fenómenos biológicos se encuentra escondida en lo más recóndito del genoma celular, los genes (Tamay de Dios et al., 2013).

Desde que en 1953, Watson y Crick descifraron la estructura del ADN (ácido desoxirribonucleico) proponiendo el modelo de doble hélice tridimensional basándose en los estudios de equimolecularidad de Erwin Chargaff, varios grupos mostraron interés por desarrollar métodos sensibles y reproducibles que les permitieran estandarizar protocolos experimentales para estudiar la estructura y el funcionamiento de los genes a nivel molecular; las técnicas moleculares basan su estudio en la detección de una secuencia específica de ADN o ARN, siendo métodos como: PCR, PCR en tiempo real, Southern Blot, Northern Blot, FISH,

Secuenciación de nueva generación (NGS) y Microarray los más utilizados (Tamay de Dios et al., 2013; Chiluisa-Utreras & Echeverría, 2017).

La técnica de PCR en tiempo real, es una de las técnicas que ha revolucionado la biología molecular, volviéndose una herramienta básica y fundamental para una gran variedad de disciplinas científicas, sobre todo impulsando enormemente la investigación de la Biotecnología moderna, dicha técnica está siendo utilizada para el diagnóstico de diversos fitopatógenos (fitopatología), el estudio de la evolución y el desarrollo de las especies (filogenia), el diagnóstico cualitativo y cuantitativo de una secuencia determinada de ADN o de uno o varios genes (expresión génica), entre otros usos (Sánchez, 2012; Chiluisa-Utreras & Echeverría, 2017).

Una de las grandes ventajas que presenta esta técnica es la estabilidad que presentan los marcadores genéticos utilizados y la posibilidad de aplicarlos a varios géneros y especies de microorganismos; en los métodos moleculares resulta esencial la selección de una secuencia de ADN específica y de alta calidad, así como adecuadas condiciones de amplificación, por lo que, la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende en gran medida de la extracción de ADN íntegro y puro (Sánchez, 2012; Chiluisa-Utreras & Echeverría, 2017).

### **1.2.1. Extracción y purificación del ADN**

La extracción y purificación del ADN, es el primer paso en la mayoría de los métodos utilizados en los estudio de Biología Molecular, para manipular y amplificar el ADN, debe aislarse del resto de componentes celulares que puedan interferir con los experimentos como ARN, proteínas y lípidos, además de sustancias inhibidoras

de la PCR propias de las técnicas de extracción o como subproductos de la propia muestra biológica (Bravo et al., 2012).

En los años 50, se desarrollaron metodologías tradicionales con el uso de solventes orgánicos para separar las proteínas del ADN, métodos que requieren preparar una serie de soluciones que pueden tomar desde horas hasta días en llevarse a cabo (Cornejo et al., 2014).

Los protocolos tradicionales consisten de cuatro etapas principales: la homogenización del tejido el cual debe ser lo suficientemente fuerte para romper la pared y membranas celulares, seguido la lisis celular e inactivación de nucleasas que consiste en la ruptura de las estructuras que confinan el citoplasma y la inactivación de proteínas que podrían digerir el ADN, a continuación la separación de proteínas y lípidos (purificación), con la ayuda de solventes orgánicos (fenol, cloroformo, isopropanol, etanol, etc.), altas concentraciones de sal o cambios en el pH del medio, pretende retirar de la solución final la mayor parte de elementos que pudiesen interferir con la PCR, por último se realiza la precipitación y redisolución del ADN con el uso de buffers que permiten mantenerlo y conservarlo (Bravo et al., 2012; Cornejo et al., 2014).

A partir de los años 90, aparecieron en el mercado kits comerciales de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente, capaces de atrapar y retener las biomoléculas de ADN separándolas de las impurezas y permitiendo así, obtener un residuo libre de inhibidores. Los kits comerciales de extracción de ADN disminuyen el procedimiento a unas cuantas horas, reduciendo el tiempo y el número de pasos a seguir, además de incorporar sustancias no tóxicas garantizando una extracción de alta pureza (Cornejo et al., 2014), Véase Tabla 2.

**Tabla 2.**

Ventajas y desventajas de los métodos tradicionales y comerciales de extracción y purificación de ADN.

<b>Condición</b>	<b>Métodos tradicionales</b>	<b>Métodos comerciales</b>
<b>Material inicial</b>	Miligramos o gramos	De 50 a 250 mg como máximo
<b>Uso de sustancias</b>	En la mayoría de los protocolos	Se evita utilizarlas
<b>Tiempo de proceso</b>	Hasta varios días debido a los numerosos pasos a desarrollar	Menor a 3 horas
<b>Integridad (considerando tejido en buen estado de conservación)</b>	Se requiere experiencia para evitar que el ADN se fragmente	Generalmente se obtiene moléculas de ADN de alto peso molecular
<b>Rendimiento</b>	Varios microgramos, aunque pueden incluir moléculas de ADN fragmentadas	Varios nanogramos pero en su mayoría con moléculas de ADN integra
<b>Inhibición enzimática</b>	Los reactivos utilizados para la extracción fácilmente se acarrean con la muestra e interfieren con aplicaciones posteriores	Poco frecuente si se siguen los pasos y cantidades recomendadas por el fabricante
<b>Automatización</b>	Poco factible por los múltiples pasos y el uso de solventes corrosivos	Altamente recomendable
<b>Costos</b>	bajo	alto

Nota: Adaptado de Cornejo, Serrato, Rendón, & Rocha (2014). Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos, elaborado por el autor, 2017.

### 1.2.2. Cuantificación y Pureza del ADN

En la mayoría de protocolos tradicionales de extracción y en algunos kits comerciales que tienden a ser generales en su aplicación, pero diseñados con un propósito específico (kit para extraer ADN de sangre total, Kit para extraer ADN de células procariotas, Kit para extraer ADN de celular eucariotas, etc.), pueden llegar a presentar una metodología y/o reactivos altamente invasivos y/o agresivos para la biomolécula, pudiendo sobresaturar el sistema si no se utilizan los reactivos en cantidades adecuadas, llegando a afectar el rendimiento, aumentando las impurezas del extracto y en el peor de los casos llegar a degradar el ADN (Cornejo et al., 2014).

Una vez obtenido el ADN, es importante determinar el rendimiento del mismo que se calcula multiplicando la concentración del ADN por el volumen de la muestra. Según la ley de Beer-Lambert, la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas, el ADN absorbe luz ultravioleta (UV) a 260 nm permitiendo estimar su concentración mediante espectrofotometría. Los espectrofotómetros emiten un haz de luz UV que atraviesa la solución de ácidos nucleicos, cuando el haz de luz ha pasado por la muestra un fotodetector mide la intensidad de luz absorbida (absorbancia), mientras mayor sea la absorbancia mayor será la concentración de ácidos nucleicos; la densidad óptica (OD) es la unidad de absorbancia y tiene valores particulares y específicos para cada molécula; sin embargo, el ADN no es la única molécula que absorbe luz UV, el ARN también presenta una absorbancia a 260 nm y las proteínas a 280 nm, lo que quiere decir, que si se toma el valor de  $A_{260}$  para estimar la concentración de ADN, la cantidad se sobreestimaré (Bravo et al., 2012; Montes et al., 2013; Cornejo et al., 2014).

Con el fin de evaluar la pureza del ADN obtenido, se procede a dividir la OD obtenida de la lectura del ADN a 260 nm y la OD obtenida de la lectura a 280 nm (impurezas), los valores de pureza considerando la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm se muestran en la Tabla 6 (Cornejo et al., 2014; Chacon, 2017).

Hoy en día, espectrofotómetros como el NanoDrop™ permiten la lectura de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos con gran exactitud y reproducibilidad, usando volúmenes micrométricos (1 a 2 µL) y sin necesidad de diluir la muestra en diferentes soluciones; otra técnica muy utilizada en equipos como el Qubit® es la fluorimetría, esta técnica se basa en la unión específica de colorantes fluorescentes al ácido nucleico (ADN y ARN) o proteínas, esta unión específica absorbe y emite luz de una longitud de onda superior, por lo que la relación entre la concentración del ácido nucleico y la intensidad de emisión de luz fluorescente es directamente proporcional, la fluorimetría se ha convertido en una técnica de máxima sensibilidad que permite utilizar tan sólo 1 µL de muestra y aun así lograr altos niveles de precisión incluso con muestras muy diluidas (Invitrogen, 2010; Montes et al., 2013).

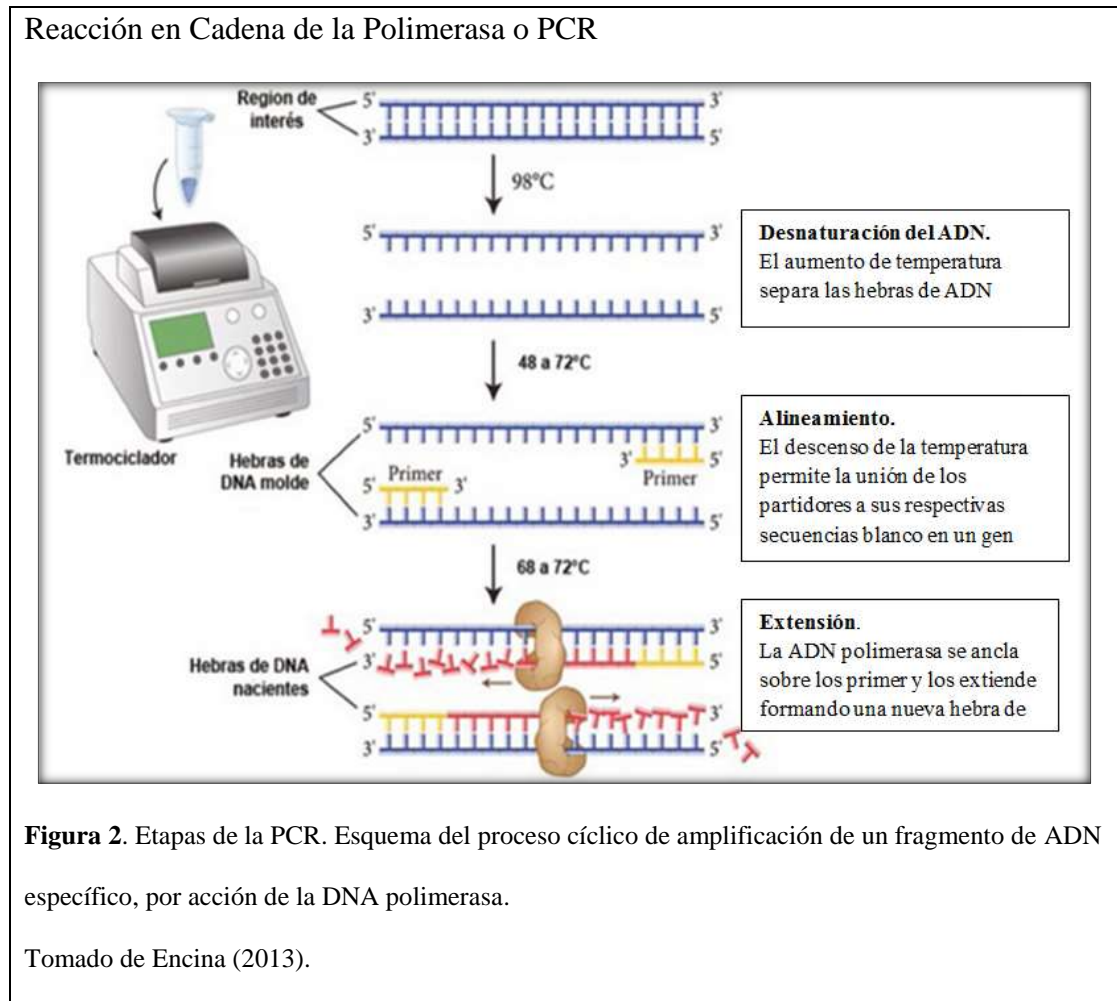
### **1.2.3. Técnica de análisis de ADN**

#### **1.2.3.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Las técnicas utilizadas en la identificación de especies, incluyen en su mayoría la técnica que marco un punto de referencia revolucionando el campo de la biología molecular, la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”) desarrollada por Kary Mullis y colaboradores en 1983, consigue

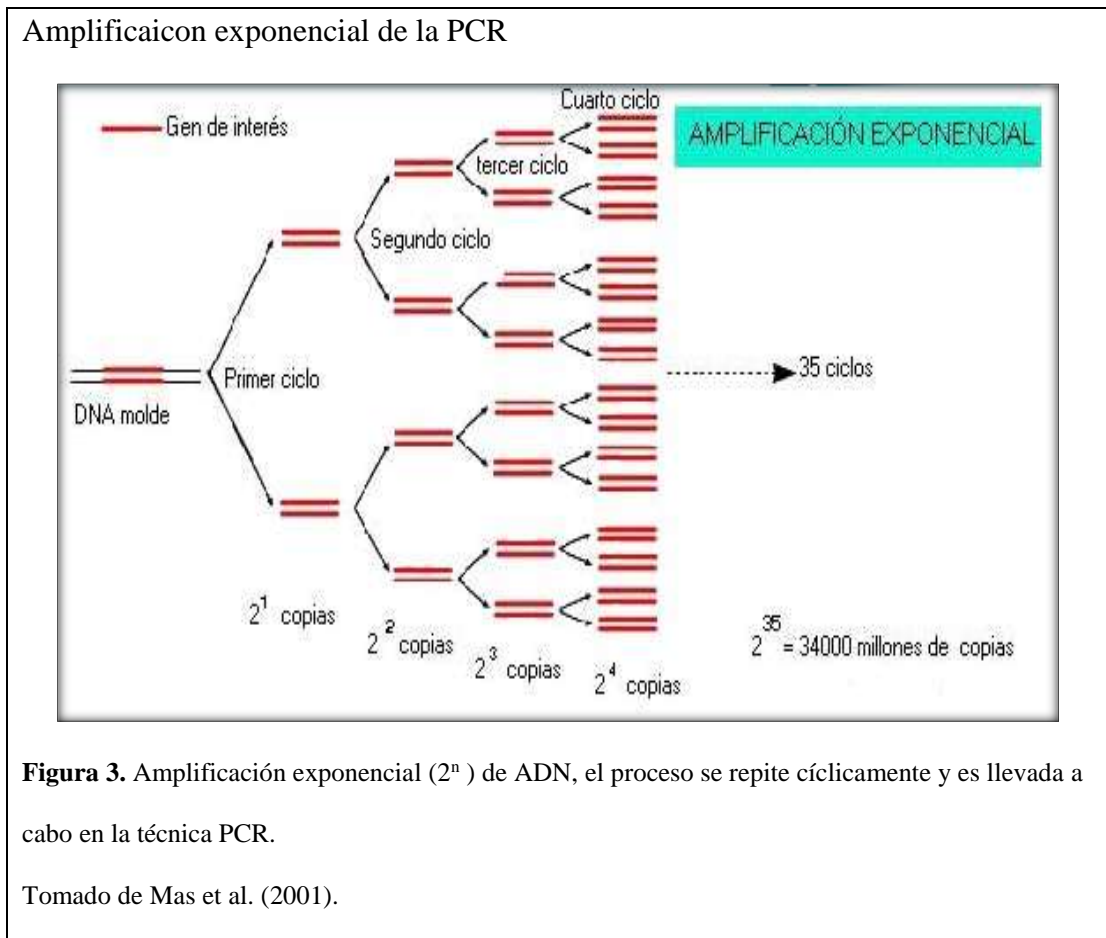


amplificar un gran número de copias de un fragmento de ADN “*in vitro*” (Sánchez, 2012; Chiluisa-Utreras & Echeverría, 2017).



Para que se lleve a cabo la reacción de la PCR, es necesario una secuencia de ADN blanco, precedida por una enzima conocida como ADN polimerasa (termoestable), además de otros elementos importantes para la reacción como los dNTP'S (desoxirribonucleotidos trifosfatados: dATPs, dTTPs, dCTPs y dGTPs), los oligonucleótidos o primers que flanqueen la secuencia de ADN a amplificar, el ion magnesio ( $Mg^{+}$ ), y un solución amortiguadora o buffer; la reacción se lleva a cabo en una secuencia de temperaturas que se repiten de forma cíclica tantas veces como sea necesario, obteniendo al final miles de millones de copias del amplicón (producto de la amplificación), la PCR realiza una amplificación en forma de progresión

geométrica (exponencial [ $2^n$ ]) (Tamay de Dios et al., 2013; Chiluisa-Utreras & Echeverría, 2017), Véase figura 3.



**Figura 3.** Amplificación exponencial ( $2^n$ ) de ADN, el proceso se repite cíclicamente y es llevada a cabo en la técnica PCR.

Tomado de Mas et al. (2001).

El proceso se fundamenta de tres etapas: la primera etapa o desnaturalización consiste en la separación de la doble hélice de ADN en dos hebras únicas, este desdoblamiento de la molécula ocurre cuando se produce un aumento en la temperatura que oscila entre los 80 °C y 97 °C, en la segunda etapa o hibridación se da una disminución en la temperatura que oscila entre los 40 °C a 65 °C permitiendo la hibridación o unión de las hebras sencillas de ADN con los oligos cebadores, delimitando la región de interés que se desea amplificar y procediendo así a la tercera etapa o extensión, en la cual la Taq polimerasa comienza la síntesis de la nueva hebra (debido a su función catalítica) con los dNTPs añadidos y tomando como molécula

iniciadora el cebador, en esta fase se lleva a la muestra a una temperatura que oscila entre los 72 °C a 75 °C, temperatura en la que la Taq polimerasa termoestable va a actuar, la replicación transcurre en dirección 5´-3´, a partir del extremo 3´OH de cada cebador (Sánchez, 2012; Tamay de Dios et al., 2013; Cabrera & Valladares, 2016; Chiluisa-Utreras & Echeverría, 2017), Véase Figura 2.

Además de las tres etapas de la PCR, se añade una etapa previa en la que se utilizan temperaturas altas para inactivar proteasas y nucleasas en la muestra y así asegurarnos que exista una desnaturalización completa del ADN de partida, en la etapa final se realiza una prolongación de la última extensión, permitiendo que se completen los fragmentos; la especificidad de la técnica puede verse afectada por la contaminación de la muestra y por la contaminación con inhibidores de la PCR (polifenoles, carbohidratos, etanol, ácidos húmicos, etc.), provocando falsos negativos, esto se soluciona incorporando controles negativos en las corridas de amplificación para un mayor control, al igual siendo necesario la incorporación siempre de controles positivos (Cabrera & Valladares, 2016).

#### **1.2.3.2. PCR en tiempo Real**

La PCR en tiempo real fue desarrollada por Higuchi y colaboradores en 1992, convirtiéndose en la variante moderna de la PCR convencional; los reactivos que se utilizan en esta técnica son los mismos que se utilizan en la PCR convencional, pero adicional la PCR en tiempo real utiliza un sistema reportero de fluorescencia que mediante su detección permite identificar durante la amplificación cantidades ínfimas de ADN sintetizado en cada momento de la reacción (la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado), esto no

ocurre en la PCR convencional, ya que la detección se realiza al final de la reacción mediante procesos post-PCR, utilizando generalmente geles de agarosa para observar los resultados (Costa, 2004; Sánchez, 2012; Cabrera & Valladares, 2016).

En los comienzos de la PCR a tiempo real, la señal de fluorescencia emitida por los amplicones se debía al bromuro de etidio (EtBr), agente que se intercalaba en el ADN de doble cadena según se iban formando los productos, para la lectura de resultados, se utilizaban termocicladores modificados que pudieran incidir luz ultravioleta en las muestras y a continuación detectar la fluorescencia con cámaras CCD (charged coupled device), en la actualidad, el EtBr ha sido sustituido por otros compuestos de mayor sensibilidad y especificidad para la detección del ADN (Sánchez, 2012).

El sistema de detección más empleado en la técnica PCR a tiempo real es el SYBR Green, este sistema es un agente intercalante con fluorocromos que emiten y aumentan notablemente la fluorescencia cuando se unen a ADN hélice. La ventaja con el SYBR Green es la optimización de las condiciones de reacción, además, que se trata de un reactivo relativamente económico frente a las sondas específicas y es capaz de utilizarse independientemente de la secuencia sin precisar de un diseño previo, uno de los inconvenientes de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que presentan la misma afinidad por cualquier molécula de ADN de doble hélice independientemente de que sea el producto de PCR que nos interesa detectar, también de que se trate de un producto de amplificación inespecífico o dímeros de primers, dando lugar a resultados erróneos (Costa, 2004; Sánchez, 2012).

Para mejorar la especificidad del agente intercalante, se deben manejar condiciones de reacción óptimas junto con una selección cuidadosa de primers con el objetivo de

disminuir el riesgo de formación de dímeros, otra forma de resolver este problema es realizar una curva de temperaturas de fusión, de este modo, se podrán distinguir los productos específicos de los productos no específicos al determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados ( $T_m$  = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado), cada fragmento amplificado tiene una  $T_m$  característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases, esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR (Costa, 2004; Sánchez, 2012).

## Capítulo 2

### Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito con cepas bacterianas crioconservadas obtenidas del cepario del grupo de investigación Biotecnología Aplicada a los Recursos Naturales “BIOARN”, Véase Tabla 3.

#### Tabla 3.

Codificación de las cepas bacterianas.

Muestra	Codificación BIOARN	Codificación investigación
1	PAG C007	BC1
2	PAQ C024	BC2

Nota: Elaborado por el autor, 2017.

#### 2.1. Selección de la muestra

Se seleccionaron 2 cepas bacterianas, que en la investigación “Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelo de las regiones naturales del Ecuador” realizado por Egas y Tinajero (2016), presentaron la capacidad de producir sustancias antibióticas, generando un halo de inhibición superior a los 15 mm<sup>2</sup> frente a *Bacillus spizizenii*, se identificaron bioquímicamente las cepas con el kit de identificación Microgen™ GnA+B-ID System determinando que las dos cepas corresponden a la especie *Burkholderia cepacia*, esto de un total de

27 cepas aisladas, a partir de suelos de la región Insular-Galápagos y la región Sierra-Norte, Véase Tabla 4.

**Tabla 4.**

Cepas aisladas de suelos de las regiones naturales del Ecuador que presentan capacidad antibiótica.

Cepas		Descripción	
Código	Lugar de obtención de la muestra	Halo de inhibición frente a <i>B. spizizenii</i>	Probabilidad de corresponder a <i>B. cepacia</i>
PAG C007	Puerto Ayora-Galápagos	44,12 mm <sup>2</sup>	88,79%
PAQ C024	Quito-Pichincha	18,49 mm <sup>2</sup>	99,51%

Nota: Adaptado de Egas y Tinajero (2016). Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelo de las regiones naturales del Ecuador, elaborado por el autor, 2017.

**2.2. Reactivación de cepas bacterianas**

El material biológico se obtuvo de los viales crioconservados PAG C007 y PAQ C024 como se observa en el anexo 1a, codificadas como BC1 y BC2 respectivamente para la investigación. Con un punzón estéril se tomó una perla del cryobank y se procedió a realizar un frotis sobre el medio sólido Muller Hinton Agar a pH 7±0,2 contenido en una placa de Petri de 25 mL, se incubó la muestra por 24 horas a temperatura de 30±2 °C; técnica descrita Egas y Tinajero (2016).

### 2.3. Resiembra de cepas

De las placas Petri con crecimiento bacteriano se tomó una asada (asa de 0.05 mm  $\phi$ ) y se procedió a inocular las muestras en 7mL de medio líquido Tryptic Soy Broth (TSB) a pH  $7\pm 0,2$  contenidos en tubos de vidrio de 25 mL, un total de 60 muestras (10 repeticiones por cada cepa y por cada metodología), se incubaron las muestras por 24 horas a temperatura de  $30\pm 2$  °C; técnica descrita Egas y Tinajero (2016), Véase anexo 1b.

### 2.4. Concentración bacteriana

Se realizó un análisis turbidimétrico para determinar la concentración inicial bacteriana (UFC/mL), utilizando los patrones de turbidez McFarland, Véase tabla 5. Con una luz adecuada se sostienen los patrones contra un fondo blanco con líneas horizontales negras de contraste y se compararon dichos patrones de turbidez frente a tubos de vidrio de 25 ml con las cepas BC1 y BC2 inoculados en 7 mL de medio TSB con un crecimiento bacteriano de 24 horas (PRO-LAB, 2012), Véase anexo 1b.

**Tabla 5.**

Patrones de turbidez McFarland y su equivalencia en UFC/mL.

Estándar No.	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
Densidad celular aproximada ( $\times 10^8$ /mL)	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0	21,0	24,0	27,0	30,0

Nota: Adaptado de PRO-LAB (2012). McFarland Standars, elaborado por el autor, 2017.



## **2.5. Extracción de ácidos nucleicos**

Se realizó la extracción de ADN de las 60 muestras obtenidas a partir de las resiembras en medio TSB incubadas durante 24 horas a temperatura de  $30\pm 2$  °C.

Se seleccionaron tres técnicas que permitieran la extracción de ADN genómico en bacterias gram negativas: técnica de extracción y purificación de ADN mediante el kit de Muestras de Alta Pureza para PCR “High Pure Template Preparation Kit” (Roche Diagnostics, 2012), técnica de extracción de ADN por ebullición – Modificado (Mena, 2010) y la técnica de extracción de ADN con solventes orgánicos Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico – Modificado (Ausubel et al., 2003).

Los reactivos y materiales utilizados en la preparación de las diferentes soluciones para las tres metodologías de extracción de ADN fueron previamente esterilizados, además preparados en cámara de flujo laminar la cual fue desinfectada con luz UV durante 30 minutos y DNA decontaminant.

### **2.5.1. Técnica de extracción y purificación de ADN con kit “High Pure Template Preparation Kit” (ROCHE)**

Se tomó 200 µL de cada muestra y se depositó en tubos de micro centrifuga de 1,5 mL agregando 5 µL de Lisozima, se mezcló e incubó a 37°C por 5 minutos. Posterior a esto, se agregó 200 µL de Buffer de unión (Binding Buffer) y 40 µL de Proteinasa K, se mezcló e incubó a 70°C por 10 minutos.

Seguido se añadió 100 µL de Etanol absoluto, se mezcló y pipeteo la muestra a un tubo de purificación (High Pure Tube) insertando un tubo de filtración (High Pure

Filter Tube) en un tubo de colecta (incluidos en el kit); se introdujo el conjunto del tubo de filtración en una centrifuga por 1 minuto a 8000 x g.

Después de la centrifugación se procedió a retirar y descartar del tubo de filtración el tubo de colecta y el líquido presente. Se agregó 500 µL de Buffer removedor de inhibidores (Inhibitor Removal Buffer) y se repitió la centrifugación por 1 minuto a 8000 x g, posterior a esto se ensambló un nuevo tubo de colecta.

Luego de la centrifugación, se descartó nuevamente del tubo de filtración el tubo de colecta y el líquido presente, para el lavado de la muestra se agregó 500 µL de Buffer de lavado (Wash Buffer), se repitió la centrifugación y el proceso de lavado. Se desechó el tubo de colecta y se insertó el tubo de filtración en un tubo de micro centrifuga de 1,5 mL.

Para la Elución del ácido nucleico, se agregó 200 µL de buffer de elución (Elution Buffer) precalentado a 70 °C al tubo de filtrado. Se centrifugó en conjunto por 1 minuto a 8000 x g. El sobrenadante en los tubos de micro centrifuga contiene ya el ADN de las muestras.

### **2.5.2. Técnica de extracción de ADN por Ebullición – Modificado**

Se tomó 200 µL de cada muestra y se depositó en tubos de micro centrifuga de 1,5 mL, se centrifugó la muestra a 10000 x g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Seguido, se suspendió el sedimento en 200 µL de solución estéril de Cloruro de sodio 0,85%, la mezcla se centrifugó a 10000 x g durante 5 minutos y se descartó nuevamente el sobrenadante.

Posteriormente, se suspendió el sedimento en 200  $\mu$ L de Buffer TE 1X y se procedió a incubar a 95°C durante 25 minutos. Luego se centrifugó a 10000 x g durante 3 minutos y se trasvasó 200  $\mu$ L del sobrenadante que contiene ya el ADN en un tubo de micro centrifuga de 1,5 mL limpio y estéril.

### **2.5.3. Técnica de extracción de ADN con solventes orgánicos**

#### **Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico – Modificado**

Se tomó 200  $\mu$ L de cada muestra y se depositó en tubos de micro centrifuga de 1,5 mL, se centrifugó la muestra durante 2 minutos a 10000 x g. Se descartó el sobrenadante, al pellet obtenido se le añadió 576  $\mu$ L de buffer TE 1X, 30  $\mu$ L de SDS 10% y 3  $\mu$ L de Proteinasa K (20 mg/mL).

Luego se añadió 100  $\mu$ L de Cloruro de sodio 5M y 80  $\mu$ L de CTAB/NaCl, se mezcló y se incubó por 10 minutos a 65°C. Posteriormente se añadió 710  $\mu$ L de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 x g. La fase acuosa se trasvasó a un nuevo tubo de micro centrifuga y se colocó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó por 5 minutos a 10000 x g.

Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de micro centrifuga y se añadió 0.6 volúmenes de Etanol absoluto, el tubo de micro centrifuga se sometió a un ligero vórtex y se eliminó el sobrenadante, seguido se colocó 400  $\mu$ L de Etanol al 70%, después de un ligero vórtex se centrifugó durante 5 minutos a 10000 x g, se desechó cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar brevemente el pellet a 65°C, el contenido seco del tubo se disolvió en 200  $\mu$ L de Buffer TE 1X.

## 2.6. Cuantificación de ADN

Las muestras de ADN obtenidas fueron cuantificadas en el equipo Qubit 2.0 Fluorometer®, se utilizó dos kits de cuantificación para lecturas de muestras con concentraciones de elevadas: Qubit dsDNA HS Assay Kit (0,2-100 ng) y Qubit dsDNA BR Assay Kit (2-1000 ng), todos los kits para ensayos en Qubit®, se realizan utilizando el mismo protocolo (ThermoFisher, 2015).

Se preparó la Working Solution diluyendo 1  $\mu\text{L}$  de Qubit® Reagent y 199  $\mu\text{L}$  de Qubit® Buffer por cada muestra y estándar (estándar 1 y 2). Se colocó 190  $\mu\text{L}$  de la Working solution en tubos Qubit® y se agregó 10  $\mu\text{L}$  por cada muestra y estándar (volumen final de 200  $\mu\text{L}$  en cada tubo).

Antes de proceder a la lectura, los tubos se sometieron a vórtex por 2 a 3 segundos, se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente y se protegieron de la luz con la finalidad de evitar degradación en los reactivos.

Seguido, se dio lectura al estándar 1 y estándar 2 (estándares de referencia para establecer los límites de lectura inferior y superior), a continuación, se leyó cada muestra configurando el equipo al volumen de muestra tomado y determinando la concentración de ADN en ng/mL, la cuantificación de cada muestra se realizó por duplicado.

Los valores exponenciales de concentración de ADN (ng/mL) obtenidos en el equipo Qubit 2.0 Fluorometer®, fueron sometidos a una transformación logarítmica (de base 10), como menciona Sánchez-Otero (2013), si las medidas o datos están comprendidos entre 0 y 1, es probable que los datos se interpreten más a un modelo matemático; por consiguiente, optando por una escala de medida apropiada podemos

solucionar los problemas que podrían presentarse por: falta de normalidad de la distribución de los errores, desigualdad de las varianzas de los tratamientos, falta de actividad de los diferentes componentes o efectos considerados en el modelo ANOVA, menciona además que en el análisis de variables relacionadas con el crecimiento de organismos, las transformaciones logarítmicas suelen ser necesarias.

## 2.7. Pureza de ADN

El análisis de pureza del ADN se realizó de una muestra representativa por cada técnica de extracción en un equipo NanoDrop, en el cual se consideró la proporción de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ) (Cornejo et al., 2014; Chacon , 2017). El grado de pureza se evaluó de la siguiente manera, Véase tabla 6.

### Tabla 6.

Estimación de la pureza de ADN considerando la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm.

Cociente de pureza	Proporción	Resultado
$A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$	Menor a 1.7	Contaminación con proteínas
$A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$	Entre 1.7 y 2	Buena calidad (ADN puro)
$A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$	Mayor a 2	Contaminación con fenoles, cloroformo

Nota: Adaptado de Chacón (2017). Extracción, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos, elaborado por el autor, 2017.

## 2.8. Amplificación mediante PCR tiempo real

Se utilizó el protocolo descrito por Chiluisa-Utreras y Echeverría (2017), empleando los cebadores descritos en la Tabla 7. Dichos cebadores fueron analizados en la base de datos NCBI (National Center of Botechnology Information), programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), en el cual se evaluó el porcentaje de similitud y de cobertura de los oligonucleótidos con sus secuencias flanqueantes, Véase anexo 2.

Las condiciones de reacción para capilares con capacidad de 20  $\mu\text{L}$  fueron: 5  $\mu\text{L}$  por muestra y controles, 10,2  $\mu\text{L}$  de Agua grado Biología Molecular, 0,4  $\mu\text{L}$  del Primer FW, 0,4  $\mu\text{L}$  del Primer RW y 4  $\mu\text{L}$  del Master Mix. Para la elaboración de la Master Mix se utilizó el Kit LightCycle® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I.

Se utilizó dos controles en la corrida de amplificación: un control negativo, agua grado PCR y un control positivo *Burkholderia cepacia* ATCC®25608.

Se consideraron los siguientes parámetros para el equipo PCR LightCycler® 2.0. Carousel Based según el protocolo de LC FS DNA Master<sup>PLUS</sup> HY-Pb, 96 react. *LightCycler*, que consiste en 35 ciclos compuestos por cuatro pasos: Desnaturalización: 95°C, 10 minutos; Alineamiento: 62°C, 10 segundos; Extensión: 72°C, 7 segundos; Enfriado: 40°C, 30 segundos, Véase anexo 3.

**Tabla 7.**

Cebadores de PCR específicos utilizados en la investigación.

Secuencias de oligonucleótidos usadas en la investigación			
Región a amplificar y nomenclatura de los primers	Secuencia (5'-3')	Temperatura de annealing (°C)	Tamaño del amplicón
<b>16S rARN <i>Cbc</i> primer<sup>a</sup></b>			
P16SF	GACTCCTACGGGAGGCAGCAG	60	1,020 pb
P16SR	CTGATCCGCGATTACTAGCGATTC		
<i>Burkholderia</i> sp. ( <i>recA</i> ) primer <sup>b</sup>			
PSPBF	GTCGGGTAAAACCACGCTG	64	945 pb
PSPBR	TCCGCAGCCGCACCTTCA		
<i>B. cepacia</i> - genomovar I ( <i>recA</i> ) primer <sup>a</sup>			
PBC1F	CAGGTCGTCTCCACGGGT	62	492 pb
PBC1R	CACGCCGATCTTCATACGA		

Nota: a) Adaptado de Mahenthiralingam et al., (2000). b) Adaptado de Henry, Mahenthiralingam, Vandamme, Coenye, & Speert, (2001). Elaborado por el autor, 2017.

## **2.9. Análisis estadístico**

### **2.9.1. Análisis estadístico de la concentración (ng/mL) de ADN**

Se determinó la concentración (ng/mL) del ADN obtenido de las diez repeticiones por cada muestra BC1 y BC2 para cada uno de los métodos de extracción analizados. Los resultados fueron procesados con ayuda del paquete (InfoStat/L versión libre para Windows, InfoStat, Cordoba, 2010) (Di Renzo et al., 2010). Se utilizó la prueba paramétrica DCA – ANOVA conjuntamente con un análisis de Tukey.

Según Yepes (2013), se consideraron significativos los valores de p menores a 0,01, permitiendo aceptar o rechazar la hipótesis alternativa planteada para la variable concentración: Al menos una metodología de extracción difiere en valores de concentración (ng/mL) de ADN.

Una vez realizada la prueba DCA-ANOVA para la variable concentración (ng/mL), se procedió a realizar una prueba de rango *post-hoc*, según Wong (2010), estas pruebas permiten identificar subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí, la prueba de Tukey es una prueba estadística general y conjuntamente utilizada con ANOVA.



## Capítulo 3.

### Resultados y Discusión

#### 3.1. Concentración bacteriana

Los viales crioconservados BC1 y BC2 fueron re activados en medio AMH a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  y pH  $7\pm 0,2$  por 24 horas, posteriormente se inocularon en medio TSB durante 24 horas, como menciona Egas y Tinajero (2016), dichas cepas muestran un crecimiento óptimo en un medio líquido a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  y pH  $7\pm 0,2$ , además señala que las cepas presentan una fase de adaptación corta y una fase exponencial rápida en su crecimiento, por lo que, estas condiciones evitarían que las cepas entren a una fase estacionaria en donde el crecimiento bacteriano cesa por falta de nutrientes en el medio o por la acumulación de sustancias inhibitorias o tóxicas, lo que pudiese afectar la obtención de un ADN íntegro y puro. En este estudio se analizaron 10 repeticiones por cada muestra (BC1 y BC2), Véase anexo 4.

Se determinó la concentración bacteriana mediante la comparación con patrones de turbidez de la escala McFarland, véase Tabla 8. Al comparar la turbidez de una suspensión bacteriana con la turbidez del patrón, se puede correlacionar la concentración de células por mL (Becton & Company, 2005). Sin embargo, Remel (2009), menciona que una de las principales limitaciones de este método es el uso de medios de cultivo de colores muy oscuros, resultando en una estimación incorrecta de la concentración bacteriana si no se utiliza una luz adecuada en la lectura de los patrones y las muestras.

**Tabla 8.**

Concentración bacteriana analizada mediante la escala McFarland.

<b>Cepa</b>	<b>Número de repeticiones</b>	<b>Estándar McFarland</b>	<b>Concentración bacteriana promedio (UFC/mL)</b>
<b>BC1</b>	10	3	$9 \times 10^8$
<b>BC2</b>	10	3	$9 \times 10^8$

Nota: Elaborado por el autor, 2017.

La concentración bacteriana obtenida para las dos cepas en todas las repeticiones fue  $9 \times 10^8$  UFC/mL (estándar 3 en la escala McFarland), concentración homogénea atribuida a la utilización de asas calibradas (asa de 0,05 mm  $\phi$ ); como explica Herrera et al., (2010), las asas calibradas están diseñadas para que permitan transferir un volumen de muestra conocido y homogéneo; al ser uno de nuestros objetivos específicos comparar tres metodologías de extracción de ADN para el análisis de pureza y concentración (ng/mL), el tener una concentración bacteriana homogénea en todas las muestras es un paso clave para lograr una correcta comparación entre dichas metodologías, permitiendo obtener datos reales y precisos con el fin de discernir e identificar datos verdaderamente significativos.

Microbial Systems (2009), hace referencia a que de todas las muestras de las que se puede extraer ADN, las suspensiones bacterianas ofrecen menos problemas en cuanto a la homogeneidad y riqueza del material.

## 3.2. Extracción de ADN

### 3.2.1. Cuantificación de ADN

En la tabla 9, se aprecia el promedio de ADN total extraído en cada técnica por cada cepa de estudio.

**Tabla 9.**

Concentración promedio de ADN obtenida en las cepas BC1 y BC2.

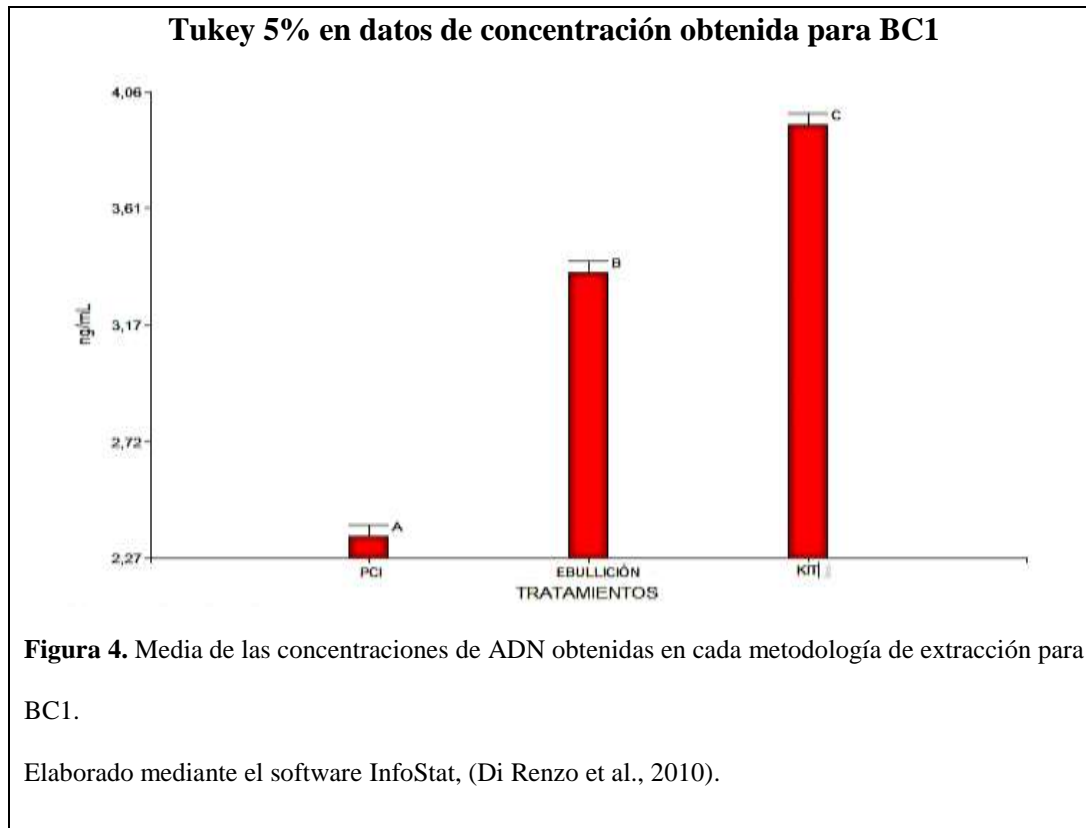
TRATAMIENTOS	TIEMPO/ MUESTRA	REPETICIONES	Concentración de ADN (ng/mL)	
			BC1	BC2
Extracción Kit	30 min.	10	8,80E+03	3,61E+03
Extracción Ebullición	45 min.	10	2,40E+03	2,41E+03
Extracción PCI	90 min.	10	2,45E+02	3,04E+02

Nota: Elaborado por el autor, 2017.

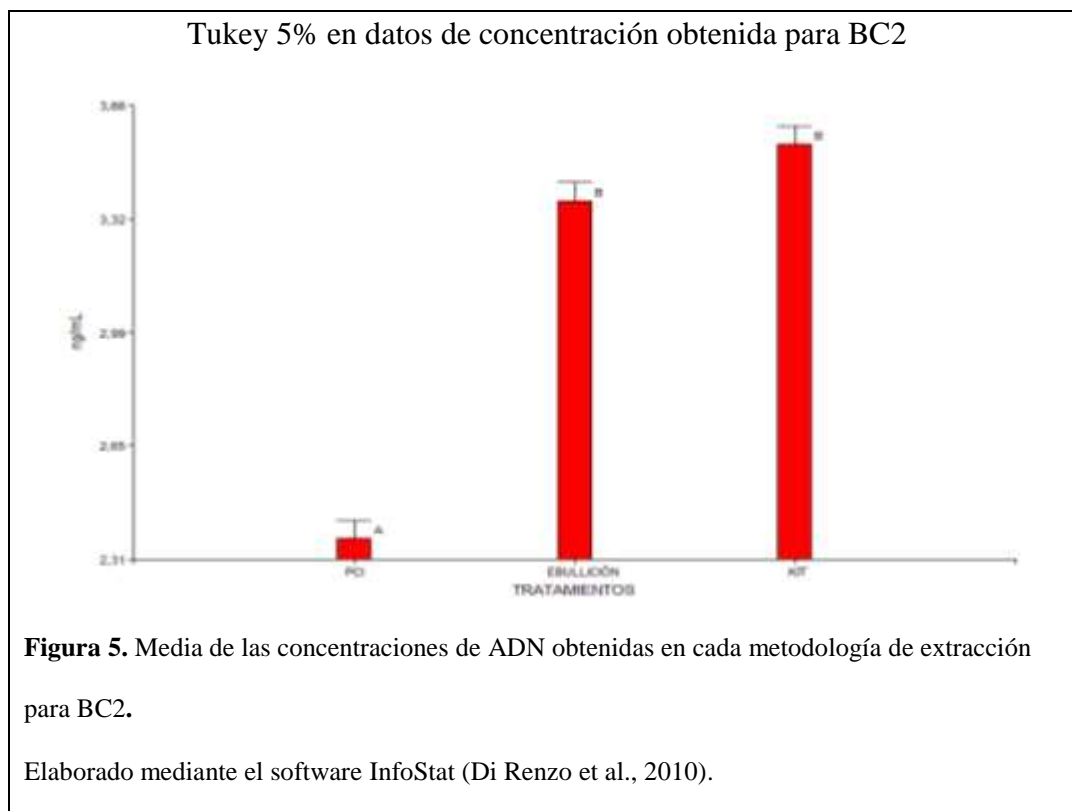
El criterio para evaluar la mejor técnica de extracción de ADN fue la concentración (ng/mL) obtenida por cada muestra. Por tal razón, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) conjuntamente con una prueba Tukey, pruebas que permitieron comparar la concentración de ADN obtenido en cada repetición.

Los resultados obtenidos mediante la prueba de análisis global-ANOVA para la concentración de ADN tanto en la cepa BC1 como en la cepa BC2, arrojaron un valor de  $p < 0,0001$ , lo que indica una diferencia estadística altamente significativa entre las concentraciones, de esta forma, se acepta la hipótesis alternativa que

menciona que al menos una metodología de extracción difiere en valores de concentración (ng/mL) de ADN.



En las figuras 4 y 5, se muestran los resultados para la prueba de Tukey con un alfa de 0,05; en la figura 4 se observa una significancia existente entre las medias de las concentraciones de ADN obtenidas en cada método para la cepa BC1, indicando que la técnica con mayor concentración de ADN es la técnica por Kit-Roche que presenta una concentración de 3,93 (ng/mL); la figura 5 muestra que no hay diferencia significativa para un valor de  $p > 0,05$  entre las medias de las concentraciones de ADN obtenidas mediante la técnica Kit-Roche y la técnica de Ebullición para la cepa BC2, pero las dos son diferentes a la técnica de PCI, mostrando que la técnica con mayor concentración de ADN es la técnica por Kit-Roche que presenta una concentración de 2,37 (ng/mL).



Como indican los resultados, el método de extracción comercial mediante Kit-Roche probado en las cepas BC1 y BC2 mostró una diferencia significativa frente a las medias de los métodos por Ebullición y PCI. Dhaliwal (2013), hace referencia a que la concentración de ADN final, dependerá de la metodología de extracción utilizada, y a su vez, la cantidad de muestra dependerá del número de células bacterianas cultivadas (concentración bacteriana); además, Martínez (2016), menciona que la concentración de ADN blanco o ADN molde frecuentemente empleado en una PCR varía según la muestra con la que se trabaja, en el caso de ADN bacteriano se trabaja con una muestra de hasta 1 a 10 ng, tomando en cuenta que el exceso en la concentración de ADN molde en la PCR puede conducir a amplificaciones inespecíficas o en su defecto ausencia de amplificación; por lo mencionado, la concentración de ADN obtenida en cada técnica de extracción aplicada, se

encontraría dentro del rango de concentración óptimo para su uso en la PCR en tiempo real.

### 3.2.2. Pureza del ADN

En la tabla 10, se aprecian los valores de pureza del ADN extraído por las tres técnicas descritas, dichos valores fueron evaluados a partir de los promedios de las relaciones  $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$  como se indican en la tabla 6. Los resultados muestran que para la cepa BC1, las tres técnicas de extracción permitieron obtener un ADN de buena calidad; para la cepa BC2 las técnicas de extracción por Kit y PCI permitieron obtener ADN de buena calidad, sin embargo, se observa que en la técnica de Ebullición existe una ligera contaminación con proteínas.

**Tabla 10.**

Pureza de ADN en las cepas BC1 y BC2.

TRATAMIENTOS	Pureza BC1		Pureza BC2	
	Ratio ( $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$ )	Calidad	Ratio ( $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$ )	Calidad
Kit Roche	1,7	Buena calidad	1,71	Buena calidad
Ebullición	1,72	Buena calidad	1,68	Contaminado con proteínas
PCI	1,81	Buena calidad	1,81	Buena calidad

Nota: Resultados obtenidos en el equipo NanoDrop. Escuela Superior Politécnica de Ejercito (2017), elaborado por el autor, 2017.

Para llevar a cabo nuevas técnicas moleculares como la PCR en tiempo real, la obtención y utilización de una secuencia molde de ADN de alta calidad (íntegro y puro) es fundamental, convirtiéndose en un paso clave la correcta elección y

aplicación de una metodología apropiada para la extracción de ADN (Fraga, Rodríguez, Fuentes, Castex, & Fernández, 2004; Balmes, Serrano, & Arís, 2009).

La diversidad de técnicas ha permitido a los investigadores seleccionar un método de extracción que se ajuste a sus necesidades, esta selección dependerá de varios puntos: el organismo bajo estudio, el tejido y su estado de conservación, la técnica a utilizarse posteriormente, la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y el tiempo para la obtención de resultados; el uso de métodos tradicionales presenta ventajas en cuanto a sus bajos costos en reactivos y materiales a utilizarse, así como la obtención de un ADN con un alto rendimiento, sin embargo, en ocasiones el material obtenido se encuentra fragmentado debido a que estos métodos se encuentran susceptibles de contaminación, variación y errores debido a los múltiples pasos de manipulación (Cornejo et al., 2014).

En los últimos años el incremento en el uso de los métodos comerciales ha sido notable, la utilización de matrices inorgánicas para atrapar el ADN, el uso de sustancias no tóxicas y menos agresivas para la muestra, hacen posible obtener un extracto de alta pureza con moléculas íntegras, al tiempo que el número de pasos en la extracción, así como la posibilidad de contaminación con ARN o ADN exógeno disminuye, siendo métodos con estas características, las que aumentan la sensibilidad y reproducibilidad de las técnicas moleculares, garantizando resultados confiables; las técnicas actuales de biología molecular no demandan grandes cantidades de material genético (Cornejo et al., 2014).

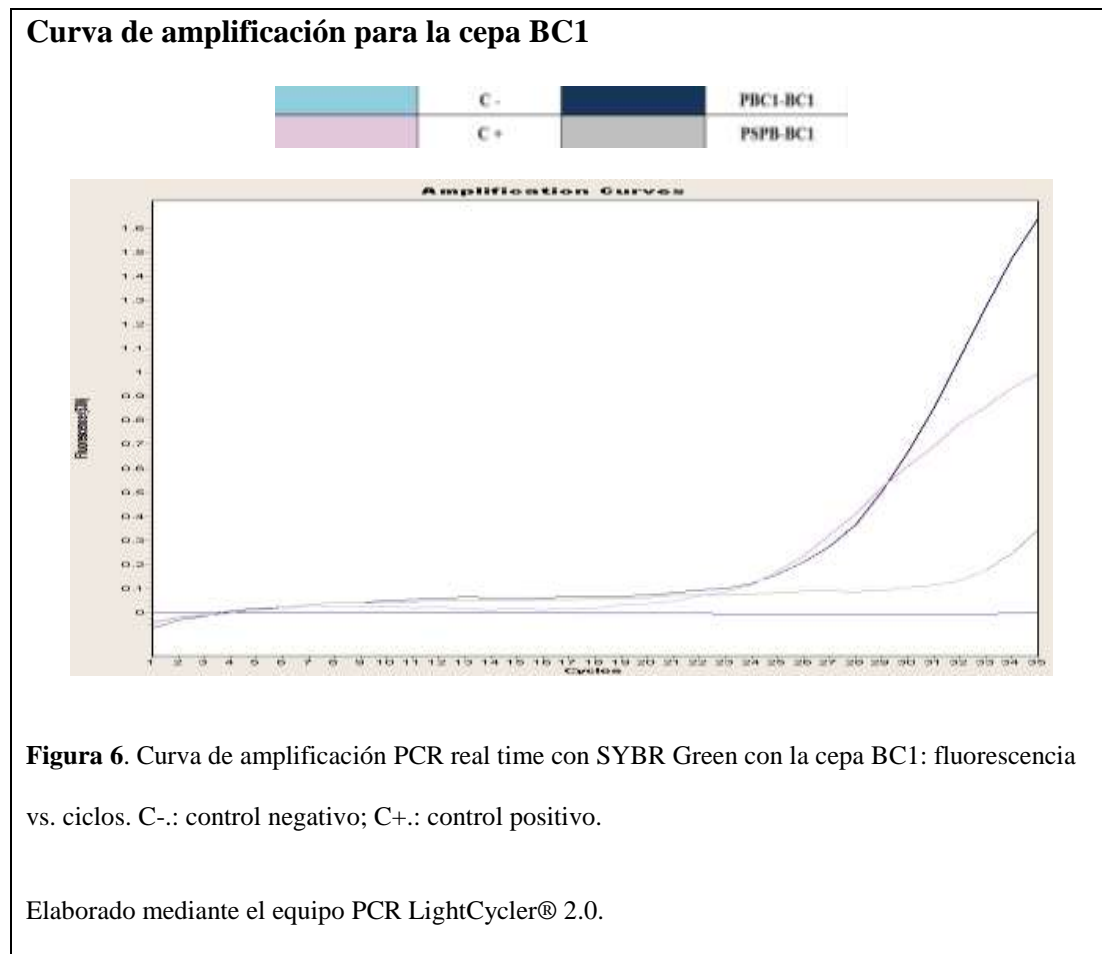
El estudio realizado por Merk, Neubauer, Meyer, & Greiser-Wilke (2001), en la comparación de seis métodos comerciales y cuatro métodos estándar para el aislamiento de *B. cepacia*, mediante un límite de detección de  $10^2$  UFC/mL en

cultivos puros y aguas residuales artificialmente contaminadas, mostraron que los metodos evaluados High Pure Template Kit (HPK), descomposición celular mediante tratamiento térmico y Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (PCI), arrojaron valores de detección poco reproducibles con alta variabilidad, mayores a los  $10^3$  UFC/mL, variabilidad atribuida a la existencia de contaminación cruzada debida a la alta manipulación de las muestra en los protocolos; misma variabilidad se observa en la investigación (Anexo 5), cuyos resultados de extracción de ADN son poco reproducibles en cada ensayo realizado; sin embargo, el Kit comercial HPK y la metodología por tratamiento termico fueron las que mas se acercaron al limite de detección con valores maximos de  $10^3$  UFC/mL, el metodo PCI arrojó valores de detección mayores a las  $10^6$  UFC/mL mostrando su baja eficiencia y sensibilidad; resultados similares fueron obtenidos en la investigación, el metodo comercial por Kit y Ebullicion presentaron mejores resultados de concentración de ADN frente a la tecnica PCI.

Merk et al., (2001), concluyen que el aislamiento del ADN debe ser simple y rápido, técnicas que requieran solo unos pocos pasos en la manipulación de las soluciones y de la muestra, sin pasos de centrifugación y corto tiempo en su realización, evitando que exista contaminación cruzada lo que podría conducir a resultados de PCR falsos positivos.

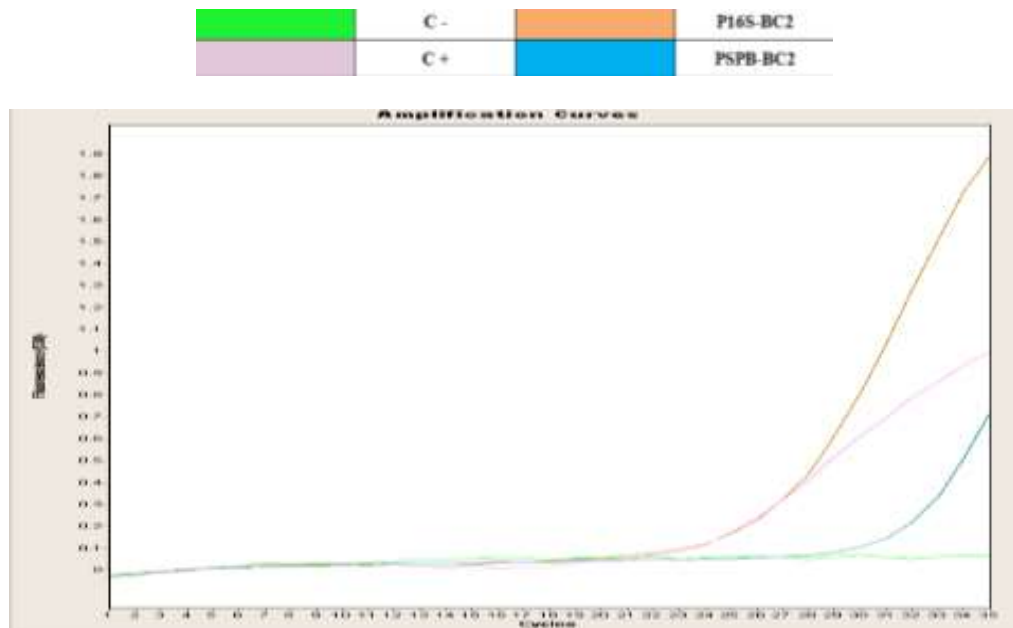


### 3.3. Identificación molecular de *Burkholderia cepacia* mediante PCR en tiempo real.



Las dos cepas aisladas e identificadas bioquímicamente, fueron sometidas a estudio mediante la técnica de PCR en tiempo real bajo condiciones descritas en la sección de materiales y métodos. Se emplearon capilares de 20  $\mu$ L para la amplificación y los iniciadores descritos en la tabla 7. En las figuras 6 y 7 se presentan los resultados de los productos obtenidos a través de la prueba de la PCR en tiempo real con las dos cepas en estudio.

### Curva de amplificación para la cepa BC2



**Figura 7.** Curva de amplificación PCR real time con SYBR Green con la cepa BC2: fluorescencia vs. ciclos. C-: control negativo; C+: control positivo

Elaborado mediante el equipo PCR LightCycler® 2.0.

En la figura 6 se observan los productos de amplificación a medida que transcurren los ciclos de la PCR. La cepa BC1 muestra una hibridación con los primers PSPBF y PSPBR específicos para *Burkholderia* sp., que corroboran el género de la especie, y con los primers PBC1F y PBC2R específicos para *Burkholderia cepacia* (genomovar I); primers diseñados y utilizados por Mahenthiralingam et al., (2000) y Canale (2004) para que permitieran la amplificación del gen *recA*, región que ha demostrado tener suficiente variación nucleotídica en la secuencia, capaz de identificar taxonómicamente este grupo tan complejo, Por lo que se confirma mediante la técnica molecular de la PCR en tiempo real que la cepa BC1 pertenece a la especie *Burkholderia cepacia* (genomovar I), genomovar que conforma el

Complejo *Burkholderia cepacia*, cepa identificada bioquímicamente por Egas y Tinajero (2016), con un 88,79% de probabilidad.

En la figura 7 se observan los resultados obtenidos de la amplificación para BC2, en la cual no se puede apreciar hibridación del ADN molde con los primers PBC1F y PBC1R específicos para *Burkholderia cepacia* (genomovar I), sin embargo, la amplificación con los primers PSPBF, PSPBR y P16SF, P16SR permitieron confirmar el género de la cepa BC2, *Burkholderia* sp. Los cebadores 16S-*CBc* se sometieron a un alineamiento exclusivamente con secuencias pertenecientes al *CBc* utilizando la base de datos NCBI, programa BLAST, los análisis arrojaron resultados de Ident 100% y Query cover 100% (anexo 2a) para varios genomovares del *CB*, como menciona Paredes y Yugsi (2016), un valor adecuado para la identificación de un determinado microorganismo en un orden o género debe presentar valores de Ident 98-100% y QC 99-100%, si estos valores se encuentran en los parámetros establecidos se puede llegar a la identificación de la especie.

En base a estos resultados, se corroboró mediante la técnica de PCR en tiempo real que la cepa BC2 pertenece al género *Burkholderia*, sin embargo, no se identifica como la sub-especie *Burkholderia cepacia* (genomovar I), por lo que se cree que esta cepa podría ubicarse como un genomovar distinto perteneciente al grupo heterogéneo del Complejo *Burkholderia cepacia*, dicha cepa fue identificada bioquímicamente por Egas y Tinajero (2016), con un 99,51% de probabilidad.

Para este estudio se acepta la hipótesis alternativa: la técnica de PCR en tiempo real mediante el análisis de la región *recA*-específica en *Burkholderia cepacia*, permite la identificación molecular de las cepas bacterianas.

Como menciona Araque (2008) y Mirabell (2015), la identificación de *B. cepacia* es una tarea compleja, dicha complejidad se debe a la estrecha relación filogenética de *B. cepacia* con otros géneros de BGNNF, y a que no se trata de una sola especie, sino de un grupo heterogéneo conformado por 20 genomovares identificados hasta la actualidad. En el estudio realizado por Canale (2004), argumenta que los sistemas comerciales de identificación fenotípica poseen significantes variaciones en su capacidad de identificar con precisión aislados del *CBC*, ya que no logran diferenciar los distintos genomovares, por lo que diversos estudios han realizado identificaciones erróneas de *B. cepacia*; en su estudio solo 1 de 23 muestras analizadas fenotípicamente dieron positivo para *B. cepacia* (4%), mediante análisis moleculares (PCR-RFLP) 11 de las 23 muestras dieron resultados positivos para *B. cepacia* (48%).

El estudio realizado por Araque et al., (2008), concluye que el empleo de métodos bioquímicos convencionales, pruebas bioquímicas complementarias y sistemas no comerciales no permiten una correcta y clara discriminación a nivel de especie dentro del complejo *B. cepacia*, a pesar de que el análisis de los métodos mostraron moderados rangos de sensibilidad y especificidad frente a otros estudios reportados previamente, sin embargo, el empleo de estos métodos permiten una buena identificación de *B. cepacia* entre aislados de BGNNF, además menciona que para lograr una correcta identificación de las cepas es necesario acompañar la metodología fenotípica con técnicas moleculares como la PCR en tiempo real (PCR-RFLP), técnica que con la utilización de cebadores específicos permite un alto rango discriminatorio; concluyendo que la relación entre los métodos bioquímicos (pruebas convencionales y galerías) con los resultados de la PCR, pone en evidencia el alto nivel de resolución de esta metodología.

El estudio realizado por Dalmastri et al. (2005), concluye que la técnica de PCR especie-específica *recA* para la identificación de aislados ambientales del *CBc*, como *B. cenocepacia*, pueden llevar a una subestimación de los organismos pertenecientes al complejo; la utilización de aislados de diferentes poblaciones microbianas, de diferentes lugares geográficos, y hasta el tiempo de muestreo puede llegar a presentar diferencias en la sensibilidad del método, causando un sesgo en el análisis de las poblaciones, sin embargo, explica que esta disminución de sensibilidad no es suficiente para establecer una deficiencia del método, ya que puede depender también de la variabilidad de la secuencia *recA*, además menciona que la aplicación de la técnica PCR especie-específica *recA* asociada a diferentes patrones de la técnica RFLP, aumenta la sensibilidad del método, considerando el análisis *recA*-RFLP útil, rápido y preciso en la identificación del complejo en aislados clínicos. Por lo tanto, la evaluación y optimización de nuevas pruebas de identificación para las especies del *CBc*, deben realizarse no sólo en aislados clínicos, sino también en aislados ambientales con el fin de mejorar la detección de estas cepas en hábitats naturales.

## Conclusiones

La activación e inoculación con asas calibradas de las cepas BC1 y BC2 en medio líquido TSB en condiciones específicas, permitió obtener una concentración celular homogénea de  $9 \times 10^8$  (UFC/mL) en 20 suspensiones bacterianas; muestras utilizadas como punto clave para lograr una correcta comparación de datos en la extracción y amplificación de ADN.

La comparación de tres métodos de extracción de ADN genómico bacteriano, destacó con mejores resultados a los métodos Kit y Ebullición, sin embargo, el método por Ebullición se presenta como alternativa viable frente a métodos comerciales de alto costo, ya que, además de presentar ADN de buena calidad (ADN puro) y valores de concentración de  $2,40E+03$  y  $2,41E+03$  (ng/mL) para BC1 y BC2 respectivamente, el tiempo de extracción es relativamente corto; las técnicas actuales de biología molecular como la PCR en tiempo real no demandan grandes cantidades de ADN al ser un metodología sensible, pero sí demanda integridad y pureza.

La técnica molecular de la PCR en tiempo real mediante el análisis de las curvas de amplificación, confirmó que la cepa BC1 pertenece a la especie *Burkholderia cepacia* (genomovar I), especie que conforma el Complejo *Burkholderia cepacia*; a su vez, se confirmó que la cepa BC2 pertenece al: género *Burkholderia*, pero no se corroboró el genomovar del organismo, sin embargo, se aseveró que la cepa pertenece al grupo del Complejo *Burkholderia cepacia* basándonos en la amplificación de la región 16S para *CBC* y en su identificación bioquímica.

Con la presente investigación se determinó que la técnica de PCR en tiempo real mediante el análisis de la región *recA*-específica en *Burkholderia cepacia*, permite la identificación molecular de las cepas bacterianas, confirmando con datos precisos las pruebas bioquímicas que no permiten una clara discriminación.

## Recomendaciones

Utilizar en el análisis de turbidez mediante la técnica McFarland, fuentes de luz adecuadas para una correcta lectura de los patrones con las muestras; el uso de medios de cultivo con colores muy oscuros puede resultar en una estimación incorrecta de la concentración celular.

Evaluar y estandarizar la técnica de extracción de ADN mediante el método de Ebullición en bacterias gram negativas, resultados obtenidos de calidad de ADN en bacterias del género *Burkholderia* se mostraron óptimos y adecuados para análisis moleculares posteriores como PCR en tiempo real, además, se presenta como una alternativa viable frente a métodos comerciales de alto costo.

Evaluar las cepas identificadas como *Burkholderia cepacia* (genomovar I) y *Burkholderia* sp., pertenecientes al *CBC*, mediante el uso de la técnica de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen *recA*, técnica rápida y precisa, que aumenta la sensibilidad de la PCR especie-específica *recA*, con el fin de identificar y corroborar con los resultados obtenidos, y a su vez, mejorar la detección de cepas aisladas en hábitats naturales.

Continuar la investigación, en el análisis e identificación química de los antibióticos producidos por las cepas PAG C007 y PAQ C024 pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia*, ya que estas bacterias han demostrado poseer un alto potencial biotecnológico.



## Referencias

- Araque , Y. (Febrero de 2008). Estudio fenotípico y molecular del Complejo *Burkholderia cepacia* y géneros relacionados. Mérida, Venezuela.
- Araque, Y., Albarado, L., Centeno, S., Rodríguez, L., & Vitelli, J. (2007). Actividad antibiótica y antifúngica de *B. cepacia* provenientes de ambientes nosocomiales. Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio Alcalá". Cumaná, Venezuela. *Scielo*, 35(2).
- Araque, Y., Flores, J., Ramírez, A., Alonso, G., & Rodriguez, L. (2008). Identificación bioquímica y PCR especie-específica de cepas de *Burkholderia cepacia* de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 82-88.
- Ausubel , F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. Ringbou.
- Balmes, G., Serrano, A., & Arís, A. (2009). Evaluación de cuatro métodos de extracción de ADN bacteriano de muestras de contenido ruminal . *AIDA*, 778-780.
- Becton & Company. (2005). Patrón de turbidez BBL preparado-McFarland Turbidity Standard No. 0.5. Obtenido de [http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421%280205%29\\_es.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421%280205%29_es.pdf)
- Bergey, W. (2015). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.

- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 601-608. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Bravo , A., Gonzáles, C., & Borgne, S. (15 de Junio de 2012). Manual de Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular.
- Bravo, L., & Procop, G. (2009). Recent advances in diagnostic microbiology. *ELSEVIER*, 248-258.
- Cabrera, M., & Valladares, P. (abril de 2016). Determinación de *Listeria spp.* mediante PCR en tiempo real en muestras de leche cruda, recolectadas en la Provincia de Pichincha. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Canale, J. (Enero de 2004). Detección e identificación molecular de genomovares del Complejo *Burkholderia cepacia* en pacientes con fibrosis quística del noreste de México. México.
- Carr, J. (4 de noviembre de 2016). *Burkholderia cepacia* in Healthcare Settings. *Centers for Disease Control and Prevention*. Obtenido de <https://phil.cdc.gov/phil/details.asp>
- Chacón , R. (2017). Extracción, Purificación y Cuantificación de Ácidos Nucléicos. *Técnicas de Biología Molecular*, (pág. 19). Perú.
- Chiluisa-Utreras, V., & Echeverría, A. (2017). Identificación y cuantificación de *Salmonella sp.* y ADNr 16S bacteriano mediante PCR en tiempo real en muestras de alimentos. *BIONATURA*, 1-6. doi:10.21931/RB/2017.02.01.5

- Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J., & Lipuma, J. (2001). Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 327-3436.
- Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., & Rocha, M. (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos* (Primera ed.). México, D.F.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305.
- Dalmastri, C., Pirone, L., Tabacchioni, S., Bevivino, A., & Chiarini, L. (2005). Efficacy of species-specific *recA* PCR test in the identification of *Burkholderia cepacia* Complex environmental isolates. *ELSEVIER*, 39-45.
- Depoorter, E., Bull, M., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., & Mahenthiralingam, E. (2016). *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5215-5229.
- Dhaliwal, A. (Octubre de 2013). Extracción y purificación de ADN. Obtenido de: <http://www.labome.es/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>
- Di Renzo, J., Balzarini, M., Gonzalez, L., Casanoves, F., Tablada, M., & Robledo, C. (2010). *InfoStat Software Estadístico*. Obtenido de <http://www.infostat.com>.
- Eberl, L., & Vandamme, P. (2016). Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys [version 1; referees:3 approved]. *F1000Research*, 5.

- Egas, C., & Tinajero, M. (2016). Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales del Ecuador. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Encina, G. (2013). Biología Molecular en oncología: lo que un clínico debería saber. *ELSEVIER*, 24(4), 563-570.
- Espy, M., Uhl, J., Sloan, M., Buckwalter, S., Jones, M., Vetter, A., . . . Smith, T. (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 165-256.
- Fraga, J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., & Fernández, A. (2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Scielo*, 56(3), 208-213.
- Govan, J., Hughes, J., & Vandamme, P. (1996). *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J. Med. Microbiol*, 395-407.
- Henry, D., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Coenye, T., & Speert, D. (March de 2001). Phenotypic Methods for Determining Genomovar Status of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), 1073-1078.
- Herrera, D., López, P., Duque, J., Pérez, L., Golding, R., & Hernández, C. (2010). Asas metálicas calibradas para microbiólogos: Una alternativa de fabricación nacional. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 1315-2556.

- Indra, S., Somkuwar, B., Potshangbam, M., & Chandra, N. (2012). Genetic characterization of *Burkholderia cepacia* strain from Northeast India: A potential bio-control agent. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(8), 1179-1188.
- Invitrogen. (2010). Qubit 2.0 Fluorometer. 5-8, 22-29. Obtenido de [http://qpcr.cz/sites/default/files/kestazeni/quibit\\_manual.pdf](http://qpcr.cz/sites/default/files/kestazeni/quibit_manual.pdf)
- Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S., Radomski, C., Davies, J., Av-Gay, Y., & Vandamme, P. (2000). DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis* and *Burkholderia cepacia* Genomovars I and II. *Journal of Clinical Microbiology*(9), 3165-3173.
- Martínez, D. (2016). Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Lima, Perú.
- Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (noviembre de 2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Obtenido de: *AquaTIC*, <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm>
- Mena, C. (2010). Evaluación de la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y embutidos en tres mercados de la ciudad de Quito mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Quito. Obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/4061/T-PUCE-3247.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Merk, S., Neubauer, H., Meyer, H., & Greiser-Wilke, I. (2001). Comparison of different methods for the isolation of *Burkholderia cepacia* DNA from cultures and waste water. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 127-131.
- Microbial Systems. (2009). Extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. *Newsletter Microbial*(3), 1-2.
- Mirabell, A. (2015). Aspectos microbiológicos de *Burkholderia cepacia* Complex en pacientes con fibrosis quística. Barcelona, España.
- Montes, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2013). *Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México: McGraw-Hill S.A.
- Paredes, M., & Yugsi, I. (Marzo de 2016). Identificación molecular de cepas de levadura con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica aisladas de Pitahaya (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber). Quito, Ecuador.
- Payne, G., Vandamme, P., Morgan, S., LiPuma, J., Coenye, T., Weightman, A., . . . Mahenthiralingam, E. (2005). Development of a *recA* Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3917-3927.
- PRO-LAB. (Mayo de 2012). *Pro-Lab Diagnostic-McFarland Standards*. Obtenido de <http://www.pro-lab.com/inserts/McFarland.pdf>
- Remel. (Mayo de 2009). *McFarland Equivalence Turbidity Standards-Thermofisher*. Obtenido de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/IFU20410.pdf>

- Roche Diagnostics. (2012). High Pure Template Preparation Kit. *Rapidly purify genomic DNA for diverse applications*. Obtenido de [http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia\\_ch/documents/broschueren/life\\_science/qPCR-NAP/Manual-NAPI/05204933001\\_EN\\_EA\\_High-Pure-PCR-Template-Preparation-Kit.pdf](http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/life_science/qPCR-NAP/Manual-NAPI/05204933001_EN_EA_High-Pure-PCR-Template-Preparation-Kit.pdf)
- Sánchez, A. (2012). Identificación y Cuantificación de Especies del Género *Merluccius* mediante la Utilización de PCR a Tiempo Real. Vigo, Pontevedra, España.
- Sánchez-Otero, J. (2013). Introducción al Diseño Experimental. En J. Sánchez-Otero, *Introducción al Diseño Experimental* (págs. 65-66). Quito.
- Sawana, A., Adeolu, M., Grupta, R., & Grupta, S. (2014). Molecular signature and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organism and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in GENETICS*, 1-22.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- ThermoFisher. (2015). *Qubit Assays*. Recuperado el 29 de marzo de 2017, de <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays.html#ion>

Traverso, F. (Noviembre de 2013). Bacteremia fulminante asociada a *Burkholderia cepacia*. Buenos Aires, Argentina.

Wong, E. (2010). ¿Después de un Análisis de Variancia...Qué? Ejemplos en Ciencia de alimentos. *Agronomía Mesoamericana*, 349-356.

Yepes, V. (27 de Abril de 2013). Diseño completamente al azar y ANOVA. *Universidad Politécnica de València*.



## Anexos

### Anexo 1. Activación de cepas bacterianas

#### Anexo 1a.



Muestras criopreservadas en viales Criobank

Elaborado por el autor, 2017.

#### Anexo 1b.

a)



b)



Nota: Cepas BC1 y BC2 activadas en medio TSB, a) Ceba BC1-24h, patrón 3 en la escala McFarland, b) Ceba BC2-24h, patrón 3 en la escala McFarland.

Elaborado por el autor, 2017.

**Anexo 2.** Estudio de los cebadores para la identificación de *Burkholderia cepacia* en la base de datos NCBI

Anexo 2a. Análisis de los cebadores 16S rARN *Cbc* en cepas del complejo.

a)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Burkholderia contaminans strain TVKG2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	48.1	48.1	100%	1e-05	100%	<a href="#">KY886142.1</a>
<a href="#">Burkholderia contaminans strain TVKG1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	48.1	48.1	100%	1e-05	100%	<a href="#">KY886141.1</a>
<a href="#">Burkholderia stabilis DNA, chromosome: 3, complete genome, strain: FERMP-21014</a>	48.1	159	100%	1e-05	100%	<a href="#">AP018113.1</a>
<a href="#">Burkholderia stabilis DNA, chromosome: 2, complete genome, strain: FERMP-21014</a>	48.1	791	100%	1e-05	100%	<a href="#">AP018112.1</a>
<a href="#">Burkholderia stabilis DNA, chromosome: 1, complete genome, strain: FERMP-21014</a>	48.1	1343	100%	1e-05	100%	<a href="#">AP018111.1</a>
<a href="#">Burkholderia stabilis strain P-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	48.1	48.1	100%	1e-05	100%	<a href="#">KY249128.1</a>
<a href="#">Burkholderia cepacia partial 16S rRNA gene, strain PRS, clone 2</a>	48.1	48.1	100%	1e-05	100%	<a href="#">LT844653.1</a>

b)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
42.1 bits(21)	5e-04	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Plus
Query 1	GACTCCTACGGGAGGCAGCAG	21		
Sbjct 311	GACTCCTACGGGAGGCAGCAG	331		

c)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
48.1 bits(24)	1e-05	24/24(100%)	0/24(0%)	Plus/Minus
Query 1	CTGATCCGCGAATTACTAGCGAATC	24		
Sbjct 1330	CTGATCCGCGAATTACTAGCGAATC	1307		

Nota: a) Porcentaje de similitud y porcentaje de cobertura de los oligonucleótidos 100% del 16S rARN *Cbc* frente a Complejos *B. cepacia*. b) Query cover 100% del P16SF en una cepa perteneciente al *Cbc*. c) Query cover 100% del P16SR en una cepa perteneciente al *Cbc*.

Elaborado por el autor, 2017.

Anexo 2b. Análisis de los cebadores *Burkholderia* sp. (*recA*).

a)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Burkholderia sp. partial recA gene for Recombinase A, strain R-52607</a>	38.2	38.2	100%	0.96	100%	<a href="#">LN995642.1</a>
<a href="#">Burkholderia sp. partial recA gene for Recombinase A, strain R-52606</a>	38.2	38.2	100%	0.96	100%	<a href="#">LN995641.1</a>
<a href="#">Burkholderia sp. partial recA gene for Recombinase A, strain R-52603</a>	38.2	38.2	100%	0.96	100%	<a href="#">LN995639.1</a>
<a href="#">Burkholderia sp. partial recA gene for Recombinase A, strain R-52602</a>	38.2	38.2	100%	0.96	100%	<a href="#">LN995638.1</a>
<a href="#">Burkholderia sp. 973N7 RecA (recA) gene, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.96	100%	<a href="#">KT718935.1</a>
<a href="#">Burkholderia sp. 973N5 RecA (recA) gene, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.96	100%	<a href="#">KT718934.1</a>
<a href="#">Burkholderia sp. 973N3 RecA (recA) gene, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.96	100%	<a href="#">KT718932.1</a>

b)

Burkholderia sp. partial recA gene for Recombinase A, strain R-52607  
Sequence ID: [LN995642.1](#) Length: 663 Number of Matches: 1

Range 1: 225 to 243 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
38.2 bits(19)	0.96	19/19(100%)	0/19(0%)	Plus/Plus

```

Query 1   GTCGGGTAAAACCACGCTG 19
          |||
Sbjct 225 GTCGGGTAAAACCACGCTG 243
    
```

c)

Burkholderia sp. KBC-7 RecA (recA) gene, partial cds  
Sequence ID: [AY769901.1](#) Length: 1009 Number of Matches: 1

Range 1: 979 to 995 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
34.2 bits(17)	0.22	17/17(100%)	0/17(0%)	Plus/Minus

```

Query 2   CCGCAGCCGCACCTTCA 18
          |||
Sbjct 995 CCGCAGCCGCACCTTCA 979
    
```

Nota: a) Porcentaje de similitud y porcentaje de cobertura de los oligonucleótidos 100% de *Burkholderia* sp. (*recA*) primer frente a cepas de *Burkholderia* sp. b) Query cover 100% del PSPBF frente a cepas de *Burkholderia* sp. c) Query cover 100% del PSPBR frente a cepas de *Burkholderia* sp.

Elaborado por el autor, 2017.

Anexo 2c. Análisis de los cebadores *B. cepacia*-genomovar I (*recA*)

a)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Burkholderia cepacia strain MSMB2428 RecA (recA) gene, partial cds</a>	36.2	36.2	100%	0.020	100%	<a href="#">KT445906.1</a>
<a href="#">Burkholderia cepacia strain B7034 recombinase A (recA) gene, partial cds</a>	36.2	36.2	100%	0.020	100%	<a href="#">KR011911.1</a>
<a href="#">Burkholderia cepacia strain B7025 recombinase A (recA) gene, partial cds</a>	36.2	36.2	100%	0.020	100%	<a href="#">KR011905.1</a>
<a href="#">Burkholderia cepacia strain B7018 recombinase A (recA) gene, partial cds</a>	36.2	36.2	100%	0.020	100%	<a href="#">KR011901.1</a>
<a href="#">Burkholderia cepacia ATCC 25416 chromosome 1, complete sequence</a>	36.2	242	100%	0.020	100%	<a href="#">CP012981.1</a>

b)

Burkholderia cepacia strain U668 recombinase A (*recA*) gene, partial cds  
Sequence ID: [KU994751.1](#) Length: 361 Number of Matches: 1

Range 1: 52 to 69 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
36.2 bits(18)	0.020	18/18(100%)	0/18(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CAGGTCGTCTCCACGGGT 18
          |||
Sbjct 52  CAGGTCGTCTCCACGGGT 69
    
```

c)

Burkholderia cepacia strain ES0139 RecA (*recA*) gene, partial cds  
Sequence ID: [AY099313.1](#) Length: 1000 Number of Matches: 1

Range 1: 578 to 596 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
38.2 bits(19)	0.007	19/19(100%)	0/19(0%)	Plus/Minus

```

Query 1  CAGCCGAICTTCATACGA 19
          |||
Sbjct 596 CAGCCGAICTTCATACGA 578
    
```

Nota: a) Porcentaje de similitud y porcentaje de cobertura de los oligonucleótidos 100% de *Burkholderia cepacia* (*recA*) primer frente a cepas de *Burkholderia cepacia*. b) Query cover 100% del PBC1F frente a *Burkholderia cepacia*. c) Query cover 100% del PBC1R frente a *Burkholderia cepacia*.

Elaborado por el autor, 2017.

**Anexo 3.** Parámetros de programación el equipo LightCycler 2.0.

Modo de análisis	Número de ciclo	Segmento	Temperatura objetivo (°C)	Tiempo de mantenimiento	Modo de Adquisición
<b>Denaturación</b>	1		95	10 min.	Ninguno
<b>Ciclado</b>	35	Denaturación	95	10seg.	Ninguno
		Alineamiento (de cebadores)	62	0-10 seg.	Ninguno
		Extensión	72	7 seg.	Simple
<b>Curvas de melting</b>	1	Denaturación	95	0	Ninguno
		Alineamiento (de cebadores)	65	60	Ninguno
		Melting	95	0	Continuo
<b>Enfriamiento</b>	1		40	30	Ninguno

Nota: Adaptado de Chiluisa-Utreras y Echeverría, (2017), elaborado por el autor 2017

**Anexo 4.** Concentración bacteriana (UFC/mL) analizada mediante la técnica McFarland

**Anexo 4a.**

<b>Cepa BC1</b>		
<b>Número de repetición</b>	<b>Estándar McFarland</b>	<b>Concentración bacteriana (UFC/mL)</b>
1	3	$9 \times 10^8$
2	3	$9 \times 10^8$
3	3	$9 \times 10^8$
4	3	$9 \times 10^8$
5	3	$9 \times 10^8$
6	3	$9 \times 10^8$
7	3	$9 \times 10^8$
8	3	$9 \times 10^8$
9	3	$9 \times 10^8$
10	3	$9 \times 10^8$

Elaborado por el autor, 2017.

**Anexo 4b.**

<b>Cepa BC2</b>		
<b>Número de repetición</b>	<b>Estándar McFarland</b>	<b>Concentración bacteriana (UFC/mL)</b>
1	3	$9 \times 10^8$
2	3	$9 \times 10^8$
3	3	$9 \times 10^8$
4	3	$9 \times 10^8$
5	3	$9 \times 10^8$
6	3	$9 \times 10^8$
7	3	$9 \times 10^8$
8	3	$9 \times 10^8$
9	3	$9 \times 10^8$
10	3	$9 \times 10^8$

Elaborado por el autor, 2017.

**Anexo 5.** Concentración de ADN total analizada mediante Qubit 2.0 Fluorometer®.

Tratamiento	Repetición	Concentración de ADN (ng/mL)	
		Cepa BC1	Cepa BC2
Extracción de ADN – Kit- Roche	1	1,12E+04	2,89E+03
	2	5,67E+03	3,99E+03
	3	1,05E+04	2,21E+03
	4	9,23E+03	3,08E+03
	5	6,11E+03	4,03E+03
	6	7,52E+03	5,07E+03
	7	1,08E+04	3,04E+03
	8	6,36E+03	4,25E+03
	9	1,12E+04	4,27E+03
	10	9,45E+03	3,22E+03
	<b>PROMEDIO</b>	<b>8,80E+03</b>	<b>3,61E+03</b>
Extracción de ADN - Ebullición	1	3,01E+03	2,23E+03
	2	3,11E+03	2,25E+03
	3	1,56E+03	2,00E+03
	4	2,41E+03	2,71E+03
	5	1,62E+03	2,27E+03
	6	2,19E+03	2,75E+03
	7	2,62E+03	2,52E+03
	8	3,19E+03	1,77E+03
	9	1,79E+03	2,78E+03
	10	2,47E+03	2,85E+03
	<b>PROMEDIO</b>	<b>2,40E+03</b>	<b>2,41E+03</b>

Extracción de ADN - PCI	1	1,59E+02	1,83E+02
	2	1,25E+02	1,26E+02
	3	1,99E+02	2,42E+02
	4	2,44E+02	1,73E+02
	5	1,65E+02	1,80E+02
	6	1,82E+02	2,21E+02
	7	2,39E+02	2,74E+02
	8	3,88E+02	2,55E+02
	9	4,21E+02	1,72E+02
	10	3,25E+02	1,21E+03
	<b>PROMEDIO</b>	<b>2,45E+02</b>	<b>3,04E+02</b>

Nota: El resultado de la concentración de ADN obtenido para las cepas BC1 y BC2, es el promedio resultante de las dos lecturas tomadas, elaborado por el autor, 2017.