



**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

**Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Microbiología**



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

TESIS

Para obtener el Título de:

Lic. Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

Silvia Vega Aguilar

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. Vianey Marín Cevada

CO-ASESOR:

D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

ASESOR INTERNO:

D.C. Ana Marta de los Ángeles Lobo Sánchez

H. Puebla de Zaragoza. Mayo, 2015

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Antecedentes del dominio Bacteria	3
3.2 Diversidad bacteriana.....	5
4. MARCO DE REFERENCIA.....	6
4.1 Generalidades del género <i>Burkholderia</i>	6
4.2 Taxonomía	7
4.3 Especies Patógenas pertenecientes al género <i>Burkholderia</i>	11
4.3 Especies benéficas pertenecientes al género <i>Burkholderia</i>	13
4.4 Antecedentes del género <i>Burkholderia</i> en México	15
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
6. JUSTIFICACIÓN.....	17
7. OBJETIVO GENERAL	18
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
10. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	18
11. MATERIALES Y METODOLOGÍAS	19
11.1 Localización del estudio	19
11.2 Recolección de muestras	22
11.3 Aislamiento.....	23
11.4 Pruebas preliminares.....	25
11.6 Caracterización genotípica	26
12. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.....	32
14. CONCLUSIONES	55
15. BIBLIOGRAFÍA.....	56
16. ANEXO	62

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Sistema de clasificación universal basado en los tres dominios: bacteria, archae y eukarya (Medina, R. D. F. 2012).	4
Ilustración 2 Ciclo del nitrógeno (Enciclopedia de conocimientos fundamentales UNAM-Siglo XXI © Raúl Cruz).	¡Error! Marcador no definido.
Ilustración 3 Porcentajes de similitud entre los grupos de <i>Burkholderia</i> basados en el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA.....	9
Ilustración 4 Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16S rRNA de especies de <i>Burkholderia</i> (Estrada de los Santos <i>et al.</i> , 2015).	10
Ilustración 5 Distribución climática en las zonas de muestreo del Estado de Puebla (INEGI, 2015).....	22
Ilustración 6 Ejemplo de muestras recolectadas	23
Ilustración 7 Esquema del método de cultivo en medio PCAT.	24
Ilustración 8 Método para la detección de cepas Fluorescentes.	26
Ilustración 9 Diagrama general de trabajo.....	32
Ilustración 10 Ejemplo del crecimiento en medio PCAT por dilución	39
Ilustración 11 Vista en estereoscopio de medio PCAT	39
Ilustración 12 Ejemplo de morfología descartada.....	40
Ilustración 13 Ejemplo de cepas en medio Cetrimida y glicerol visto en transiluminador de luz UV	40
Ilustración 14 Cepas en medio cetrimida y glicerol a la izquierda, y mismas cepas en medio King A y glicerol a la derecha con control positivo placa inferior.....	41
Ilustración 15 Ejemplo de cepas en agar King, control positivo a la derecha	42
Ilustración 16 Ejemplo de cepas con pigmentación en medio King A visto en transiluminador de luz UV	42
Ilustración 17 Cepas correspondientes al primer muestreo.....	43
Ilustración 18 Cepas correspondientes al segundo muestreo	43
Ilustración 19 Cepas correspondientes al tercer muestreo.....	44
Ilustración 20 Amplificación con lo oligonucleótidos universales	45
Ilustración 21 Edición de la secuencia del gen 16S rRNA en el programa BioEdit ver. 7.2.5.	46
Ilustración 22 Comparación de secuencia con BLAST	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Oligonucleótidos semi-específicos del género <i>Burkholderia</i> (Tago <i>et al.</i> , 2014)..	27
Tabla 2 Reacción de PCR para oligonucleótidos semi-específicos.....	27
Tabla 3 Condiciones para la PCR con oligonucleótidos semi-específicos	28
Tabla 4 Oligonucleótidos universales (Weisburg <i>et al.</i> , 1991).	29
Tabla 5 Reacción de PCR para oligonucleótidos universales	29
Tabla 6 Condiciones para PCR con oligonucleótidos universales	30
Tabla 7 Muestras correspondientes al primer muestreo.....	34
Tabla 8 Muestras correspondientes al segundo muestreo.	36
Tabla 9 Muestras correspondientes al tercer muestreo.....	38
Tabla 10 Resumen de Aislamientos.....	45
Tabla 11 Resumen del análisis de secuencias parciales del gen 16S RNA ribosomal en BLAST	50
Tabla 12 Resumen de aislamientos identificados como pertenecientes al género <i>Burkholderia</i>	52

1. RESUMEN

El presente trabajo de tesis se orientó a la búsqueda de especies del género *Burkholderia* en tres regiones en el Estado de Puebla. Este género es relativamente nuevo y aunque en un principio fue reconocido como un patógeno, en las últimas décadas ha cobrado importancia ya que se ha demostrado que algunas especies tienen la capacidad de producir sustancias orgánicas de las cuales se han derivado numerosos estudios encaminados a diferentes aplicaciones, algunas de ellas en biorremediación, control biológico, entre otras. Al ser microorganismos ubicuos se recolectaron muestras de suelo considerando la riqueza de microorganismos en este tipo de muestra y considerando los antecedentes sobre su aislamiento a partir de rizósferas. Durante el experimento se aplicaron métodos microbiológicos primeramente para el cultivo de microorganismos con el medio semi-selectivo del género *Burkholderia*, PCAT, continuando con la utilización de un medio semi-selectivo del género *Pseudomonas* el cual es taxonómicamente cercano al género *Burkholderia*. Utilizando el medio de cultivo Cetrimida adicionado con glicerol pone en evidencia la producción de pigmentos fluorescentes, que como se conoce, no son producidos por ninguna especie del género *Burkholderia*, lo cual nos permite seleccionar y excluir a éstas cepas. Dadas las limitaciones para realizar la identificación con métodos microbiológicos fue necesaria la aplicación de métodos moleculares como el uso de oligonucleótidos con alto porcentaje de especificidad al género *Burkholderia* para estimar las probables candidatas, seguido de la obtención de la secuencia del gen ribosomal 16S y su análisis, lo que posibilitó la comparación de dichas secuencias usando el algoritmo BLAST con las secuencias contenidas en la base de datos del NCBI (National Center Biotechnology Information). Como resultado de éste estudio, se observó que en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán en la Región VII (1500 msnm), existió el menor número de aislamientos y además ninguno de ellos generó ningún producto cuando fueron sometidos al análisis de PCR. El segundo muestreo realizado Municipios de Tenampulco, Tlatlauquitepec y Cuetzálan en la Región II, Sierra

Nororiental (oscilando desde 160 msnm hasta 1600 msnm) arrojó un mayor número de aislamientos de los cuales se obtuvieron 10 cepas pertenecientes al género *Burkholderia*. Por último, el muestreo realizado en "Volcán Citlaltepeltl" o Pico de Orizaba (3840 msnm) en la Región III, se obtuvo el mayor número de aislamientos, sin embargo solo 3 cepas fueron identificadas como *Burkholderia* llevando a cabo la metodología establecida en este trabajo de tesis.

2. INTRODUCCIÓN

La vida en la Tierra comenzó siendo microbiana, desde su inicio hace millones de años hasta la fecha, los microorganismos son las formas de vida más abundantes en nuestro planeta. Éstos, modificaron de tal manera la biosfera que otras formas de vida pudieron surgir y evolucionar. Actualmente forman una parte fundamental de los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas acuáticos, aéreos y terrestres.

La diversidad microbiana del suelo es una de las causas de la fertilidad del mismo y es indispensable en los mecanismos que mantienen la estructura y la función de los ecosistemas. Resulta importante el análisis de la diversidad bacteriana en el ambiente, ya que ha conducido a la identificación de microorganismos importantes para el desarrollo de tecnologías en la agricultura, y en las industrias farmacéutica, alimenticia y medica entre otras.

Los microorganismos se encuentran en los más diversos ambientes cumpliendo diferentes funciones, existen algunos géneros bacterianos que se pueden hallar en ambientes acuáticos, terrestres y asociados a diversos hospederos. Tal ubicuidad es una característica de las especies del género *Burkholderia*, la cual puede facilitar en cierto modo, su accesibilidad y recalando, que en su mayoría son bacterias cultivables y por lo tanto sujetas al estudio de especies con relevancia clínica o bien, ambiental para la generación de conocimiento que conduzca al desarrollo de aplicaciones biotecnológicas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes del dominio Bacteria

La historia de la vida en la Tierra ha tenido cambios en la composición de la biota en el planeta, así como en la abundancia de cada una de las especies que la habitan (Piñeiro, 2014). La gran variedad de formas de vida que habitan el planeta tierra a generado históricamente inquietud por su clasificación, desde la primera organización en reinos por Aristóteles en el siglo IV a. C. que diferenció todas las entidades vivas en dos reinos: vegetal y animal; además, fundó el conocimiento sistemático, dividiendo al reino animal en dos géneros: *anaima* para los invertebrados y *enaima* los vertebrados; y estos a su vez, en géneros y especies. Años más tarde, Linneo introdujo el sistema actual de clasificación taxonómica y propuso que las especies podían organizarse en un sistema de categorías jerarquizadas. Las categorías de menor grado constituirían a las de mayor grado, mostrándose a continuación ésta jerarquía en orden descendente: Reino, Clase, Orden, Género y Especie, instaurando las bases de la nomenclatura binomial para referir a las especies (Bueno, 1998). Posteriormente, con la invención del microscopio se descubrió la existencia de pequeños organismos, siendo necesaria una nueva clasificación. Por lo que, Whittaker propuso el sistema de los cinco reinos, uno de ellos eran procariotas o monera y en los otros cuatro los organismos eucariotas (animales, plantas, hongos y protistas) (Whittaker, 1969). Luego de la descripción de la estructura del ADN, grandes avances en el análisis genético-molecular se comenzaron a suscitar; se produjo un gran avance en filogenia de procariotas gracias a los alcances del análisis genético, particularmente sobre la base de estudios del ARN. En 1977, Carl Woese y George E. Fox fundaron la sistemática molecular, con lo que cambio la forma en que la ciencia catalogaba la diversidad biológica, analizando y comparando la información genética de diversos organismos consideraron la categoría “superreino” (Reyes, 2013). En (1990) Woese, Kandler, &

Wheelis, proponen la clasificación de toda la diversidad biológica en tres dominios Archaea, Bacteria y Eucarya (Ilustración 1).

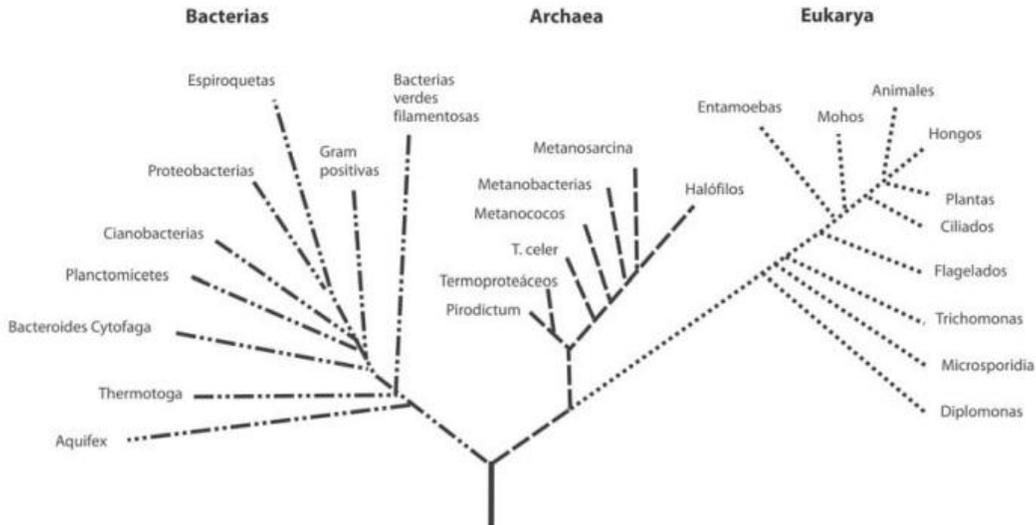


Ilustración 1 Sistema de clasificación universal basado en los tres dominios: bacteria, archae y eukarya (Medina, R. D. F. 2012).

Las bacterias son microorganismos procariontes, unicelulares, que pueden presentar diversos tamaños y formas como filamentos, cocos, bacilos, hélices etc., carecen de núcleo definido y orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen pared celular que se compone de peptidoglicano, muchas bacterias disponen de sistemas de desplazamiento como los flagelos, y son móviles (Tortora, Funke, & Case, 2007). Son ubicuas, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos; crecen hasta en los más extremos. En total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo (Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998). Se tiene registro de que fueron los primeros organismos unicelulares que se desarrollaron sobre la tierra desde hace aproximadamente 3,500 millones de años (Schopf, 1993). El dominio Bacteria se divide en varios Phyla, dando un total de 25, por mencionar algunos: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Caldiserica*, *Chlamydia*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Fibrobacteres*,

Firmicutes, Fusobacteria, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Tenericutes, Thermomicrobia, Thermotogae entre otros (Ciccarelli, et al., 2006).

3.2 Diversidad bacteriana

El mundo microbiano se caracteriza por su ubicuidad, abundancia, diversidad y su intensa actividad en los sistemas naturales donde ocupan una posición clave en relación con el flujo de materia y energía debido a sus capacidades metabólicas para transformar sustancias orgánicas e inorgánicas. Se considera a los ecosistemas, como a todos los organismos vivos y a las condiciones físicas y químicas de su entorno, y están presentes en muy diversos ambientes terrestres, entre ellos en los medios acuáticos (océanos, estanques, lagos, corrientes, hielo, fuentes termales) y en los medios continentales (suelo, profundidades bajo la superficie), así como en otros organismos (plantas y animales) (Begon, Townsend, & Harper, 2006).

Los ecosistemas microbianos se extienden o contraen en función de los recursos y las condiciones disponibles, de modo que las actividades metabólicas de los microorganismos modifican gradualmente los ecosistemas, tanto desde el punto de vista químico como físico (Escalante, 2007). El hábitat puede cambiar así de modo significativo, por ello, a medida que cambian los recursos y las condiciones en los hábitats microbianos, el número de las poblaciones aumentan o disminuyen, cambiando de nuevo el hábitat.

En general, los microorganismos que se han descrito han sido alrededor de 30,800 especies de protozoarios, 70,000 de hongos y 45,000 de bacterias; aunque se calculan hasta 2 millones de especies de hongos y de tres a diez millones de especies bacterianas (Arias, Pérez, Ricalde, & Yáñez, 2010).

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1 Generalidades del género *Burkholderia*

En 1950 el fitopatólogo estadounidense Walter H. Burkholder descubrió la primera especie bacteriana del género: *Pseudomonas cepacia* causante de la enfermedad de la “piel agria o cáscara ácida” de la cebolla, la cual adquirió varios nombres a través de los años, como *Pseudomonas kingii*, y *Pseudomonas multivorans*, fue considerado como un importante patógeno, agente causal de la fibrosis quística. Adicionalmente, por largo tiempo, estas bacterias fueron reconocidas como un grupo de *Pseudomonas* no fluorescentes (Suárez-Moreno, et al., 2012). En 1973 Palleroni, Kunisawa, Contopoulou, & Doudoroff reconocieron la heterogeneidad taxonómica entre las *Pseudomonas* y realizaron experimentos de hibridación de ADN-rRNA, lo cual condujo a la subdivisión del género *Pseudomonas* en cinco grupos de homología rRNA, cada uno con una denominación genérica independiente. Con los avances en biología molecular se facilitó el uso de herramientas para la investigación del género, y a través de un estudio taxonómico polifásico que incluyó la secuenciación de ARN ribosomal, perfiles de proteínas, hibridación DNA-rRNA, hibridación DNA-DNA, análisis de ácidos grasos y análisis bioquímicos realizado en 1992 por Yabuuchi y colaboradores, se transfirieron siete especies del género *Pseudomonas* del grupo II de homología RNA ribosomal (*P. cepacia*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. pickettii* y *P. solanacearum*) al nuevo género *Burkholderia*, con lo que además, expusieron la estrecha relación genómica entre un grupo de especies que fue llamado *Complejo Burkholderia cepacia* (Yabuuchi et al., 1992, Stoyanova et al., 2007).

El orden *Burkholderiales* pertenece al grupo de las betaproteobacterias (además de los órdenes *Rhodocyclales*, *Hydrogenophilales*, *Nitrosomonadales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*) está conformado por cinco familias: *Alcaligenaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae* y *Ralstoniaceae* engloba una amplia variedad de bacterias que presentan características fenotípicas y metabólicas diferentes (Caumette, et al., 2015).

El género *Burkholderia* se compone de un diverso grupo de bacterias ampliamente distribuidas en la naturaleza. Los miembros de este género son bacilos Gram negativos, mesófilos, móviles, con una proporción de G+C que oscila entre el 59 y el 69,5 %. Se caracterizan por ser microorganismos ubicuos, por lo tanto, pueden encontrarse en diversos ambientes como suelo, rizósfera, especies vegetales y agua, desempeñando roles como saprofitos, interactuando con su hospedero de manera benéfica o incluso como patógenos en plantas, animales y humanos (Coenye & Vandamme, 2003, Compant *et al.*, 2008, Santini *et al.*, 2013). Actualmente suman 98 especies dentro del género, de acuerdo a la LPSN (List of Prokaryotic names with standing in nomenclature, 2016; <http://www.bacterio.net>). La LPSN es una base de datos que enlista los nombres de procariotas que se han publicado válidamente en la Revista científica: “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology” o mediante su inclusión en una lista de validación bajo las reglas del código Internacional de Nomenclatura de Bacterias.

4.2 Taxonomía

En los últimos años, varios estudios coinciden con la posibilidad de dividir el género *Burkholderia*, ya que con base a estudios filogenéticos a partir del gen 16S, se divide en dos grandes grupos bien definidos, distinguiéndose un grupo de especies patógenas de otro más numeroso no patógeno, el cual está comprendido por bacterias ambientales benéficas para las plantas (Gyaneshwar *et al.*, 2011; Suárez-Moreno *et al.*, 2012, Estrada de los Santos *et al.*, 2013; Sawana *et al.*, 2014; Zuleta *et al.*, 2014; Estrada de los Santos *et al.*, 2015). Gyaneshwar *et al.*, (2011) propusieron que un grupo de cepas, representa un nuevo género, sugiriendo el nombre de *Caballeronia* para el grupo que contiene bacterias no patógenas, nombre sugerido en honor del mexicano microbiólogo fallecido J. Caballero- Mellado, pionero en muchos de los estudios sobre cepas asociadas a plantas; Suárez-Moreno *et al.*, (2012), elaboraron un árbol filogenético con base en las secuencias del gen 16S RNA ribosomal, coincidiendo con que uno de los grupos se integraba de “bacterias ambientales benéficas para las plantas” o PBE

por sus siglas en inglés (plant-beneficial-environmental) y el segundo por bacterias patógenas. Estrada de los Santos *et al.*, (2013) con base a los datos de secuenciación del gen 16S rRNA y el análisis de secuencias Multilocus (MLSA) de un total de 77 especies de *Burkholderia*, obtuvieron un árbol filogenético conformado por dos grupos (A y B), el grupo A como el nuevo género *Caballeronia* por Gyaneshwar *et al.*, (2011) y el grupo PBE por Suárez-Moreno *et al.*, (2012) son cepas ambientales, mientras el grupo B se compone de patógenos de plantas, animales y humanos. Sawana *et al.* (2014) realizaron dos estudios, uno a partir de secuencias del gen 16S rRNA y el otro, un análisis de genómica comparativa de 45 secuencias de especies del género *Burkholderia*, y determinaron las relaciones filogenéticas considerando las secuencias concatenadas de 21 proteínas conservadas. Los resultados del trabajo fueron muy similares a los que describió Estrada-de los Santos *et al.* (2013), el Clado I, se compone de especies patógenas, conservaría el nombre del género, y éste se subdivide a su vez en tres, el segundo grupo Clado II integraría un nuevo género que denomina *Paraburkholderia* similar al Grupo A, PBE o *Caballeronia*. Otro análisis filogenético fue realizado por Zuleta *et al.* (2014) con 545 genes de mantenimiento de 15 especies de *Burkholderia*, sus resultados también respaldan la existencia de dos diferentes grupos.

Más recientemente, Estrada de los santos *et al.*, (2015), realizaron un análisis actualizado, tomando en cuenta una o más secuencias del gen 16S RNA ribosomal de cada especie de *Burkholderia*, y se expone que desde 2013 el Grupo A se ha expandido significativamente e incluye muchas nuevas especies, en contraste con el grupo B que ha variado poco en cuanto a especies descritas. A partir de este análisis, *B. andropogonis* no se integra en los grupos A ni B y además se diferencian dos nuevos grupos que se denominan “de transición (1 y 2)” (Ilustración 3). En este estudio además se determinó la intra-similitud para cada uno de estos grupos utilizando el programa MEGA v6 y se encontró 97,6% de similitud para el Grupo A y mayor de 98,0% para cada uno de los otros grupos, también se calculó la similitud general entre los grupos, que fue de 95.9% de similitud entre los grupos A y B que está por encima del valor de corte de 95% que

estipula Tindall *et al.*, (2010) para el establecimiento de la separación de los dos géneros (Estrada de los Santos *et al.*, 2015) (Ilustración 2).

Species	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	Inter-similarity
<i>Burkholderia</i> Group A (1)						97.6
<i>Burkholderia</i> Group B (2)	95.9					99.4
Transition Group 1 (3)	96.3	97.8				98.2
Transition Group 2 (4)	96.2	97.4	97.3			98.5
<i>B. andropogonis</i> (5)	95.0	97.4	96.6	97.0		99.7
Out group (6)	93.5	94.2	94.0	94.3	93.5	–

Ilustración 2 Porcentajes de similitud entre los grupos de *Burkholderia* basados en el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA (Estrada-de los Santos *et al.*, 2015)

Sin embargo en la publicación de Estrada de los santos *et al.*, (2015), también se expone el criterio de Yarza *et al.* (2014) “una identidad de secuencia de $\leq 94.5\%$ entre dos secuencias de genes 16S rRNA proporciona una fuerte evidencia de géneros distintos, no obstante, el umbral del 94.5% representa un valor mínimo y no se opone a la formación de géneros que tienen identidades de secuencia de 96% si es respaldada por otros datos fenotípicos, genotípicos, o del medio ambiente”. Con lo cual no se desecha la posibilidad de que el género *Burkholderia* llegue a ser dividido más adelante, puesto que aunque el Grupo A, *Caballeronia*, PBE o *Paraburkholderia*, y el grupo B mantengan 95,9% de identidad entre las secuencias del gen 16S rRNA exponen características muy distintas como el hecho de ser patógenos o por el contrario ser saprofitos y establecer relaciones simbióticas.

En resumen, principalmente se propone explorar si existen suficientes características fenotípicas entre los distintos grupos para proponer que estos grupos de *Burkholderias spp.* (patógenas y ambientales no patógenas) deben ser considerados géneros independientes.

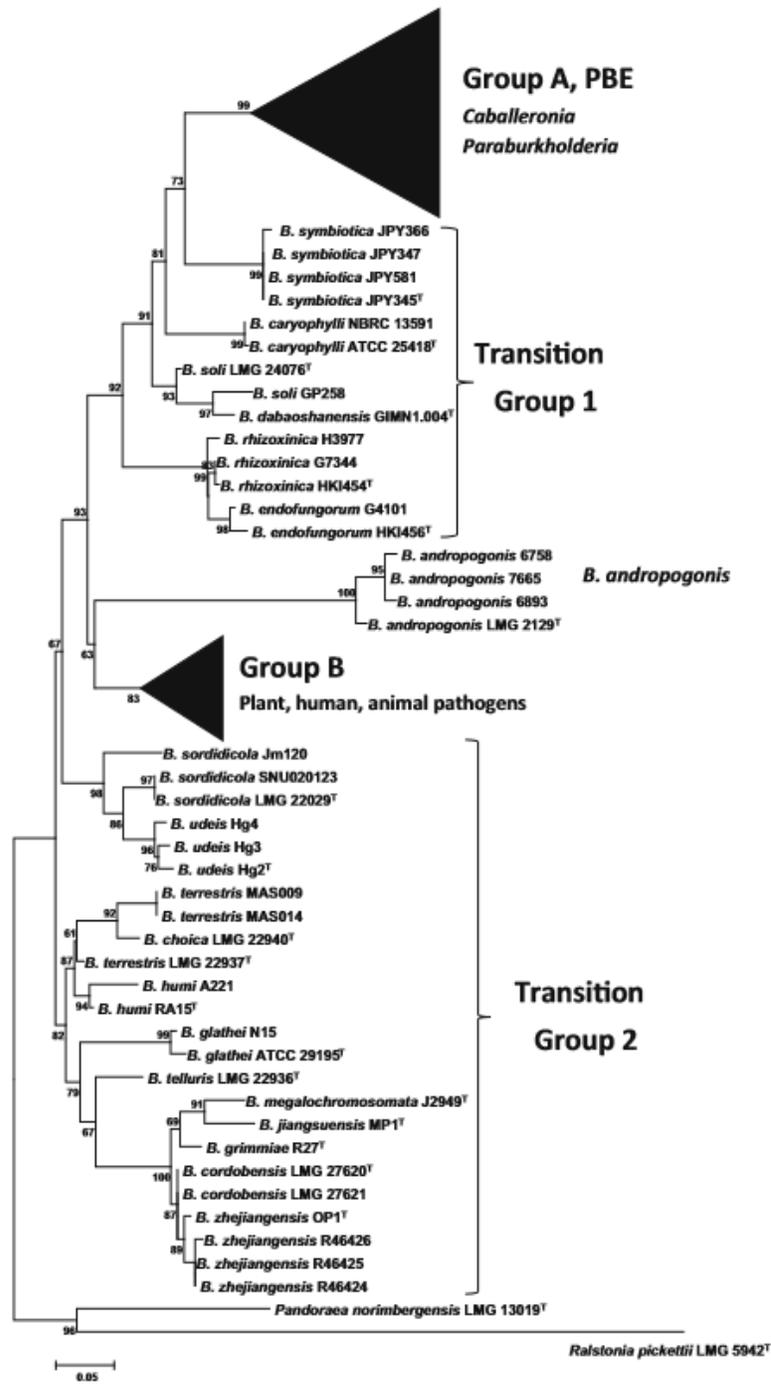


Ilustración 3 Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16S rRNA de especies de *Burkholderia* (Estrada de Santos et al., 2015).

4.3 Especies Patógenas pertenecientes al género *Burkholderia*.

B. cepacia fue considerada un patógeno desde su descubrimiento, inicialmente de plantas y posteriormente cobró importancia clínica más tarde se descubrió la estrecha relación de esta especie con otras del género que juntas dieron origen al *Complejo Burkholderia Cepacia* (BCC), el cual ha sido extensamente estudiado por su grado de patogenicidad. Este grupo es conocido por su presencia en ambientes clínicos sin embargo, se ha aislado también de suelo y rizósfera. Se ha asociado a numerosas infecciones en catéter tracto urinario, bacteriemia por vía intravenosa e infecciones en heridas, en 1970 se informó que era el causante de la "pudrición del pie" de tropas estadounidenses en ejercicios de entrenamiento de pantano en la Florida y tropas que servían en Vietnam (Stoyanova *et al.*, 2007).

A principios de la década de los 80's, *B. cepacia* se aisló frecuentemente de cultivos de muestras de vías respiratorias de enfermos de Fibrosis Quística; estudios revelaron que, aunque algunos pacientes pueden permanecer infectados con *B. cepacia* durante períodos prolongados sin síntomas obvios, otros sucumben a una neumonía rápidamente progresiva necrotizante y sepsis, que se denomina síndrome de cepacia (CS) (Suárez -Moreno *et al.*, 2012). *B. pseudomallei* es el otro grupo clínicamente importante, lo integran *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* y *B. oklahomensis*. *B. pseudomallei* es el agente causal de la Mieloidosis, enfermedad que afecta a animales y seres humanos; puede aparecer como una enfermedad aguda, subaguda o crónica cuyos síntomas a menudo se mezcla con la malaria, la peste, la neumonía o tuberculosis; infecta a través del contacto de las heridas con el suelo o el agua contaminada. La difusión es favorecida por la humedad, y algunos factores de predisposición son la diabetes, leucemia, linfomas, infección por el VIH, y de alteración renal o interrumpir la inmunidad celular. Aunque la bacteria se encontró en los individuos sanos, se considera patógeno oportunista. Por otra parte, *B. mallei* es causante de "Glanders", una zoonosis que afecta principalmente a los caballos, burros y mulas, pero casi todos los mamíferos son susceptibles; la infección en las personas es esporádica y generalmente subclínica, la enfermedad puede ocurrir a partir de la

inhalación o ingestión de la bacteria, el período de incubación es corto y los síntomas no específicos dificultan el diagnóstico, se presenta en dos formas pulmonar o cutánea; y puede ser aguda, crónica o, a veces latente; los resultados de la forma aguda en la neumonía, causan bacteremia, pústulas y la muerte en varios días; en la forma crónica aparecen síntomas débiles y se puede prolongar por años (Stoyanova *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, otras especies de *Burkholderia* son patógenos de plantas, la más antiguamente conocida de ellas *B. cepacia* que produce la enfermedad de la piel agria de la cebolla, que afecta a la superficie y partes de la planta bajo tierra, y puede aparecer en el campo o en el almacenamiento, los síntomas incluyen cambios en el tejidos, y en la coloración que va de amarillo pálido a marrón claro. Otros ejemplos son: *Burkholderia pv gladioli. allicola*, causa la enfermedad de la piel resbaladiza, los tejidos afectados se empapan de agua y en ocasiones todas las partes internas se desintegran, un ejemplo se observó en 1964, cuando se perdió alrededor del 50% de la cebolla en la región de Veliko Tárnovo, Bulgaria. *B. glumae* y *B. gladioli* provocan oscurecimiento de la vaina y la podredumbre del grano de arroz, estas enfermedades se observaron en las temporadas de otoño de 1995 y 1996 en Fukuoka, Japón. También son patógenos de gladiolas, cebolla y algunas orquídeas. *B. gladiolos pv. Agaricicola* inhibe el crecimiento del micelio y causa la pudrición blanda de un número de setas con importancia económica y comercial como *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Pholiota nameko*, *Hypsizygyus marmoreus* y *Grifola frondos* en Japón, y diferentes especies de *Agaricus* en Nueva Zelanda y Europa (Chowdhury *et al.*, 2006).

B. gladioli produce marchitez y pudrición de *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)*, una de las flores más populares comercializadas en Europa y Asia, los síntomas incluyen necrosis de las hojas, marchitamiento y podredumbre de las raíces, los tallos y pétalos, seguido por completo decaimiento de la planta; además, *B. gladioli* es el patógeno planta más extendido en las orquídeas en Hawaii, afecta otros géneros incluyendo *Dendrobium*, *Oncidium* y *Miltonia*, produciendo manchas

en las hojas y la pudrición blanda de orquídeas; y es motivo de graves pérdidas en la industria florística (Stoyanova *et al.*, 2007).

Especies BCC a menudo se recuperan como endófitos putativos de plantas de importancia agrícola, como el arroz y el maíz, pero su potencial patogenicidad ha detenido más aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, las cepas de *B. vietnamiensis* se han aislado de arroz, y han mostrado importantes aumentos en el rendimiento cuando se utiliza como inoculantes en este cultivo, pero debido a que está dentro del grupo de BCC, estas cepas promotoras del crecimiento de arroz no pueden ser utilizadas en la agricultura (Suárez-Moreno *et al.*, 2012).

4.3 Especies benéficas pertenecientes al género *Burkholderia*

Aunque el género *Burkholderia* fue por largo tiempo conocido como un patógeno, en las últimas décadas han surgido numerosos estudios en torno a su relación con especies vegetales ya que en gran parte se compone de saprofitos de suelo (Stoyanova *et al.*, 2007). Una de las más conocidas dentro del género por ser de las primeras evidencias de fijación de dinitrógeno (N₂) de un miembro del género *Burkholderia* es *B. vietnamiensis* la cual fue aislada de la rizósfera de la planta de arroz (*Oryza sativa*), antes de descubrir que el género agrupa varias especies diazotróficas. Otras especies de vida libre que han demostrado ser fijadores de N₂ son *B. caballeronis*, *B. caryophylli*, *B. contaminans*, *B. ferrariae*, *B. fungorum*, *B. heleia*, *B. kururiensis*, *B. lata*, *B. nodosa*, *B. phymatum*, *B. silvatlantica*, *B. terrae*, *B. tuberum*, *B. tropica*, *B. unamae*, *B. xenovorans*. Las *Burkholderia* spp. simbióticas fijadoras de nitrógeno descritas hasta la fecha son: *B. caballeronis*, *B. caribensis*, *B. diazotrophica*, *B. dilworthii*, *B. dipogonis*, *B. kirstenboschensis*, *B. mimosarum*, *B. nodosa*, *B. phenoliruptrix*, *B. phymatum*, *B. rhynchosiae*, *B. sabiae*, *B. spreintiae*, *B. symbiotica*, y *B. tuberum* (Estrada-de los Santos *et al.*, 2015).

Existen también bacterias noduladoras de leguminosas (LNB), colectivamente llamadas rizobios, viven como saprófitos en el suelo y en asociación simbiótica

con las leguminosas, estas inducen la formación de nódulos en las raíces, donde fijan el nitrógeno atmosférico a cambio de compuestos de carbón (Mwangi *et al.*, 2011). Dos ejemplos de las especies del género son *B. mimosarum* y *B. nodosa* (Chen *et al.*, 2005).

Por otra parte, *Burkholderia* es también importante en la rizoremediación, ya que algunas especies son capaces de metabolizar compuestos tóxicos, por ejemplo, algunas cepas de *B. unamae* usan fenol y benceno como sus únicas fuentes de carbono (Caballero-Mellado *et al.* 2007), *B. kururiensis* metaboliza tricloroetileno, degrada 2,4,6-triclorofenol y descompone fenol, benceno, y tolueno. *B. xenovorans* cepa LB400T se recuperó a partir de suelo contaminado por policlorobifenilo (PCB), es uno de los microorganismos degradadores más potentes de este compuesto (Seeger *et al.*,1999). Del mismo modo, *B. sartisoli*, fue aislada originalmente de suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), en Nueva Zelanda (Vanlaere *et al.*, 2008) y creció en naftaleno y fenantreno (Laurie & Lloyd-Jones, 1999).

Las bacterias endófitas son capaces de colonizar el interior de la planta sin causar efectos negativos sobre su hospedero, la presencia de endófitos en plantas es variable, algunas especies del genero son: *B. tropica*, *B. kururiensis*, *B. unamae*, *B. silvatlantica*, *B. phytofirmans*, y *B. acidipaludis* que se han aislado de la superficie estéril de plantas y se consideran endófitos putativos. Un objetivo del estudio de estas especies de *Burkholderia* endófitos es su potencial para estimular el crecimiento vegetal. *B. phytofirmans* PsJN es uno de los endófitos más estudiados, esta cepa fue aislada de las raíces de cebolla infectadas con la micorriza del hongo *Glomus veliferum.*, posteriores experimentos de colonización en tomate, vid, y variedades de papa con la cepa PsJN demostraron que es capaz de colonizar la rizósfera y el interior de la planta, influyendo en la mejora del sistema radicular, incluyendo raíces secundarias más adventicias, como así como una mayor área foliar y mejorando la eficiencia del uso del agua, *B. phytofirmans* PsJN también puede inducir resistencia en la vid de uva de *Botrytis cinerea*, el

agente causal del moho gris, y puede aumentar el crecimiento de la vid a bajas temperaturas (Barka *et al.*, 2000).

La producción de sideróforos por bacterias promotoras del crecimiento vegetal también conocidas como PGPR's por sus siglas en inglés (plant growth promoting rhizobacteria) se considera un mecanismo importante en la supresión de microorganismos nocivos para las plantas, por monopolizar el hierro disponible en el suelo y con esto limitar el crecimiento de fitopatógenos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). La presencia de sideróforos se informó en *B. bryophila* y *B. megapolitana* asociado a los musgos *Aulacomnium palustre*, *Sphagnum rubellum* y *Sphagnum pallustre* en Alemania. También se demostró la producción de sideróforos en *B. phytofirmans*, *B. unamae*, *B. kururiensis*, *B. xenovorans*, *B. tropica* y *B. silvatlantica*, lo que sugiere que estas especies también pueden tener propiedades de biocontrol (Suárez-Moreno *et al.*, 2012)

4.4 Antecedentes del género *Burkholderia* en México

En nuestro país también se han abordado investigaciones en torno al género *Burkholderia* y algunos lugares de los que se han obtenido aislamientos de este género son: los estados de Morelos, Oaxaca, Chiapas, Querétaro y Veracruz, de donde se obtuvo un grupo de especies de *Burkholderia* en su mayoría fijadoras de nitrógeno, se recuperaron del entorno de plantas de maíz y café, y se identificaron fenotípicamente como *B. cepacia*, algunos de estos aislamientos se recuperaron del interior de raíces y plantas de maíz y café y mostraron características similares o idénticas a los de *B. vietnamiensis* TVV75T (Estrada de los Santos *et al.*, 2001). En Totontepec, Oaxaca a partir de suelo de un campo de maíz se obtuvieron algunas *Burkholderia sp.* endófitas fijadoras de N₂ (Estrada *et al.*, 2002). También se recuperaron aislados diazotróficos de los que se identificó *B. tropica* de la rizosfera, rizoplano y tejidos internos de maíz y las plantas de teocintle recolectadas de los estados de Guerrero, Veracruz, Morelos, Chiapas, Puebla y Oaxaca (Reis *et al.*, 2004). Caballero-Mellado, *et al.*, en 2004 describió por primera vez la especie *Burkholderia unamae sp. nov* que fue seleccionada de un estudio taxonómico polifásico que incluía varias cepas, la cepa tipo es MTI-641 y

fue aislada de la rizosfera del maíz cultivado en campos de Tlayacapan, Morelos (Caballero-Mellado *et al.*, 2004). En Oaxaca se logró aislar bacterias pertenecientes a éste género, asociadas a la caña de azúcar identificadas como *B. unamae* y además, se obtuvieron aislamientos identificados como *B. tropica* a partir de plantas de maíz en Tlayacapan, Morelos y Coatepec, Veracruz (Perin *et al.*, 2006). También se han obtenidos aislamientos a partir de cuerpos de agua, como es el caso de la cepa *Burkholderia sp.* IMP5GC, aislada a partir de aguas termales de Los Azufres, Michoacán, y tiene la capacidad de crecer usando carbazol como fuente de carbono y nitrógeno (Castorena *et al.*, 2006).

Especies diazotróficas como *B. unamae*, *B. xenovorans*, *B. tropica*, y otras dos estrechamente relacionadas filogenéticamente con *B. kururiensis* se aislaron de rizosfera y rizoplano de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivadas en Morelos y Estado de México; estas especies de *Burkholderia* fijadoras de N₂ exhibieron actividades relacionadas a biorremediación, promoción del crecimiento vegetal, y control biológico in vitro (Caballero-Mellado *et al.*, 2007). En el Estado de Tamaulipas se aisló *B. gladioli* y especies del BCC en asociación con plantas de agave y maíz, además de otras del género *Cupriavidus* siendo mayor el número de aislamientos de este último (Aceves, V. & Belinda, N., 2012). La cepa *Burkholderia tuberum*. CCGE1002 fue aislada de un nódulo de *Mimosa occidentalis* recolectado en Tepic, Nayarit y se analizó su genoma en relación con las interacciones planta-microorganismo y la degradación de xenobióticos (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012).

Como antecedente directo, en nuestro grupo, Antonio-Flores (2015) realizó su trabajo de tesis, realizando el aislamiento e identificación parcial de especies del género *Burkholderia* en el Estado de Puebla, en las localidades de La Paz Tlaxcolpan, San José del Rincón, San Miguel Atlapulco y en la región de Chignahuapan, incluyendo dos cuerpos de agua, la Laguna de Chignahuapan y Presa La Paz, a raíz de éste estudio, se logró identificar a un numeroso grupo de especies del género *Burkholderia* mediante el uso de agar/medios semi-específicos y el uso herramientas moleculares, como la PCR utilizando

oligonucleótidos semi-específicos y un ensayo ARDRA (Amplified rDNA -Ribosomal DNA- Restriction Analysis) representado en un árbol filogenético.

Las investigaciones mencionadas son algunos de los ejemplos que se han suscitado alrededor del género *Burkholderia* y que arrojan evidencia del potencial biotecnológico o bien de su importancia clínica.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las especies que integran el género *Burkholderia* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, involucra algunas especies de interés clínico (patógenos de humanos, plantas y animales) lo que ha limitado su uso en su libre aplicación en el ambiente. No obstante, desde hace dos décadas se reportó que éste género se compone también de especies relacionadas a procesos de control biológico, producción de sustancias de interés o bien con la capacidad para degradar algunos compuestos contaminantes, es decir, con potencial en aplicaciones biotecnológicas. Ciertas cepas del género *Burkholderia* podrían ser fuente de sustancias orgánicas utilizadas como bio-herbicidas, bio-plaguicidas y promotores de crecimiento, y otras que podrían implementarse en la biorremediación de compuestos xenobióticos. Por lo anterior el presente proyecto propone contribuir en el conocimiento de su presencia e identificación de las especies que se encuentran en tres regiones el Estado de Puebla.

6. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el potencial biotecnológico y clínico del género *Burkholderia* ha impulsado investigaciones alrededor del mundo generando un gran crecimiento en el número de especies que lo integran. Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre su presencia, diversidad y distribución en el Estado de Puebla.

El presente proyecto propone aprovechar la ubicuidad del género para su búsqueda en tres regiones del Estado.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia del género *Burkholderia* en tres regiones del Estado de Puebla.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Aislar microorganismos cultivables a partir de tres regiones del Estado de Puebla.
- 2) Identificar aislados pertenecientes al género *Burkholderia* mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S.

9. HIPOTESIS

En el Estado de Puebla existen especies pertenecientes al género *Burkholderia* asociadas a plantas en diferentes ambientes.

10. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO: Descriptivo

UNIVERSO DEL ESTUDIO: Muestras de suelo de rizósfera y de especies vegetales de las tres regiones seleccionadas en el estado de Puebla

TAMAÑO DE MUESTRA: No limitado

SEDE Y LUGAR DEL ESTUDIO: Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

CRITERIOS DE SELECCIÓN: Se eligen muestras de suelo de rizósfera y especies vegetales aparentemente sanas y productivas.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: Se excluyen muestras de suelo de rizósfera y especies vegetales aparentemente contaminadas.

RECURSOS HUMANOS

Director de tesis: D.C Vianey Marín Cevada

Co-asesor de tesis: D.C Luis Ernesto Fuentes Ramírez

Asesor Interno de tesis: Dra. Ana Marta de los Ángeles Lobo Sánchez

Tesista: Silvia Vega Aguilar

RECURSOS FINANCIEROS

Esta investigación fue parcialmente financiada por medio del proyecto VIEP con clave MACV-NAT15-I.

11. MATERIALES Y METODOLOGÍAS

11.1 Localización del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en dos etapas: la primera fue la recolección de muestras en las áreas de estudio; y posteriormente el trabajo de laboratorio en Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (ICUAP).

Los muestreos se realizaron considerando que el Estado de Puebla tiene poco más de 34 mil kilómetros cuadrados ubicándose en la posición 21 por

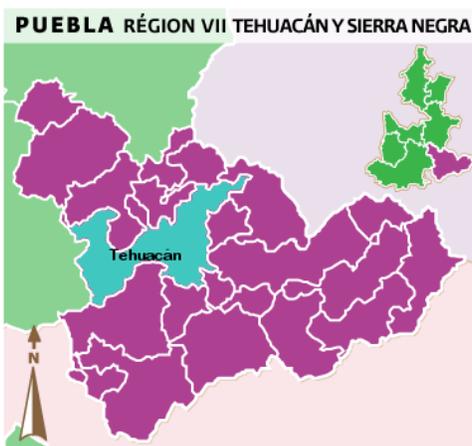
superficie entre las entidades federativas que conforman a México, además, es el segundo estado con el mayor número de municipios del país, pues está conformado por 217 municipios y se divide internamente en siete regiones socioeconómicas desde 1986 debido a las necesidades de planeación y de construir unidades de desarrollo más homogéneas, las cuales se establecieron de acuerdo a las características sociales, políticas y económicas de los municipios del estado (INAFED, Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, 2016). (INAFED, <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/>).

- Región I, Huauchinango
- Región II, Sierra Nororiental
- Región III, Ciudad Serdán
- Región IV, San Pedro Cholula
- Región V, Puebla
- Región VI, Mixteca
- Región VII, Valle de Tehuacán y Sierra Negra



Ilustración 4 Regiones del Estado de Puebla INAFED Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal SEGOB Secretaría de Gobernación 2010©

Los muestreos de campo se realizaron en el siguiente orden:



- 1) Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán pertenece a la **Región VII**, Valle de Tehuacán y Sierra Negra



2) Municipios de Tenampulco, Tlatlauquitepec y Cuetzalan (zona alta de 901 a 1,500 msnm) pertenecen a la **Región II**, Sierra Nororiental



3) San Miguel Zoapan, Municipio de Tlachichuca "Volcán Citlaltepétl", pertenece a la **Región III**, Ciudad Serdán.

En la ilustración 6 se señala la localización de los muestreos y es posible diferenciar el clima que predomina en cada uno, en el primer muestreo se presenta un clima seco y semiseco, en el segundo cálido húmedo y por último en el tercero templado subhúmedo.

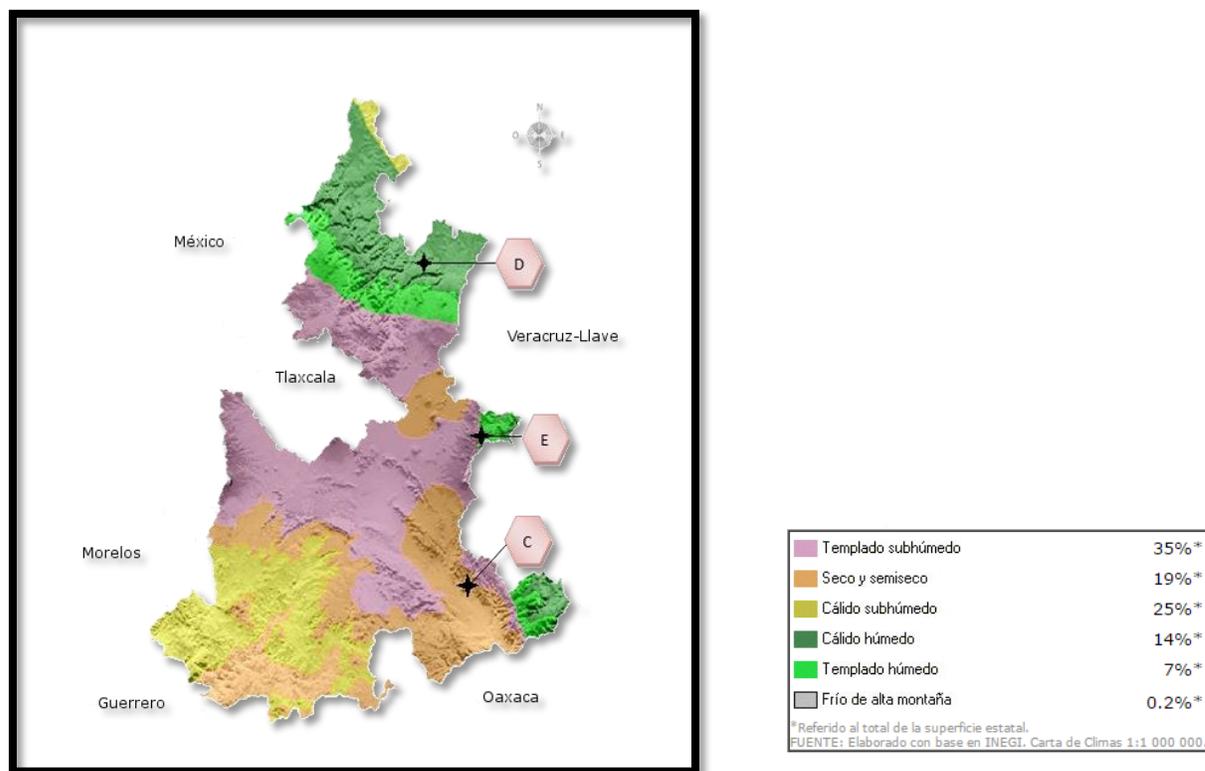


Ilustración 52 Distribución climática en las zonas de muestreo del Estado de Puebla (INEGI, 2015).

11.2 Recolección de muestras

Se realizaron tres salidas de campo, comenzando en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, en el mes de enero del 2015; la segunda contemplo tres municipios de localizados en la cadena montañosa de la Sierra Norte de Puebla en el mes de marzo del 2015 y por último en el Volcán Citlaltepetl en el mes de julio del 2015. Se llevó un registro de muestras por cada área de estudio y con la ayuda de GPS (Global Positioning System) se anotaron las coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator). Se colectaron muestras de suelo de rizósfera de plantas y cultivos aparentemente libres de contaminación. Se requirió de una pala previamente desinfectada con alcohol al 70% y luego de cada toma para evitar contaminación entre las muestras. Se almacenaron en bolsas de polietileno, etiquetadas con la localidad y coordenadas posteriormente fueron trasladadas al laboratorio para ser procesadas.



Ilustración 6 Ejemplo de muestras recolectadas

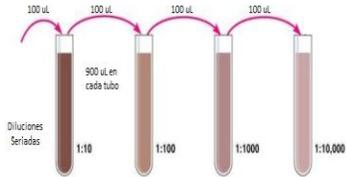
11.3 Aislamiento

En el laboratorio usando una balanza analítica se pesó un gramo de cada muestra recolectada para posteriormente realizar suspensiones individuales en 9 ml de solución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM las cuales se incubaron en agitación a 30°C por 30 minutos. A partir de esta primera suspensión, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} de las que se sembraron por extensión en superficie 100 μL de cada dilución en el medio semi-selectivo PCAT y se incubaron de 24 a 48 horas a 30°C . Después del tiempo de incubación en el medio PCAT se realizó la observación de la diversidad morfológica en el medio de cultivo y se seleccionaron colonias visiblemente aisladas y morfológicamente diferentes entre sí para resembrar de forma individual e incubar nuevamente de 24 a 48 horas a 30°C . Los cultivos obtenidos fueron temporalmente almacenados en refrigeración a 4°C . También se realizó una suspensión de un gramo de cada muestra en 9 ml de agua estéril tridestilada para la medición del pH en el potenciómetro y se registró el pH obtenido de cada muestra.

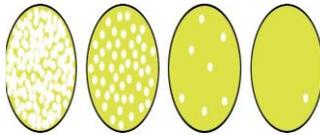
AISLAMIENTO



Suspensión de 1 gr de muestra de suelo en 9 ml de sln MgSO₄ 10 mM



Diluciones Seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} de cada muestra



Siembra de cada dilución realizada en medio Semi-selectivo PCAT



Observación de morfologías coloniales



Purificar colonias con morfologías diferentes



Conservación a -70°C en caldo LB y glicerol al 30%

Ilustración 7 Esquema del método de cultivo en medio PCAT.

11.4 Pruebas preliminares

Producción de Pigmentos

Luego de la obtención de los cultivos y haber verificado su pureza se realizaron inóculos de cada uno en 3 ml de caldo Luria Bertani modificado (adicionando 0.5 g/L ácido succínico) y se incubaron en agitación por 24 h a 30°C. Posteriormente se sembró 5 uL de cada inóculo en el medio semi-selectivo Cetrimida, y se incubaron por 48 h a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la observación de las placas en el transiluminador UV para detectar colonias con emisión de fluorescencia. Para el caso de las cepas que no presentaron crecimiento en el medio Cetrimida se tomó nuevamente 5 uL de los inóculos previamente realizados para sembrarlos en el medio diferencial para el género *Pseudomonas* King A y se incubaron por 48 h a 30 °C. Posteriormente se procedió a la observación para detectar colonias con pigmentación azul-verdosa. Tanto las colonias que presentaron emisión de fluorescencia como las que produjeron pigmentación azul-verdosa fueron descartadas.

11.5 Preservación

Después de descartar las cepas que presentaban producción de pigmentos, se verificó la pureza de los cultivos restantes para su conservación, se realizaron inóculos en 700 uL de caldo Luria Bertani e incubaron por 24 h a 30 °C, después se adicionó 300 uL de glicerol en cada inóculo y se almacenaron en un ultracongelador a -70 °C de temperatura.

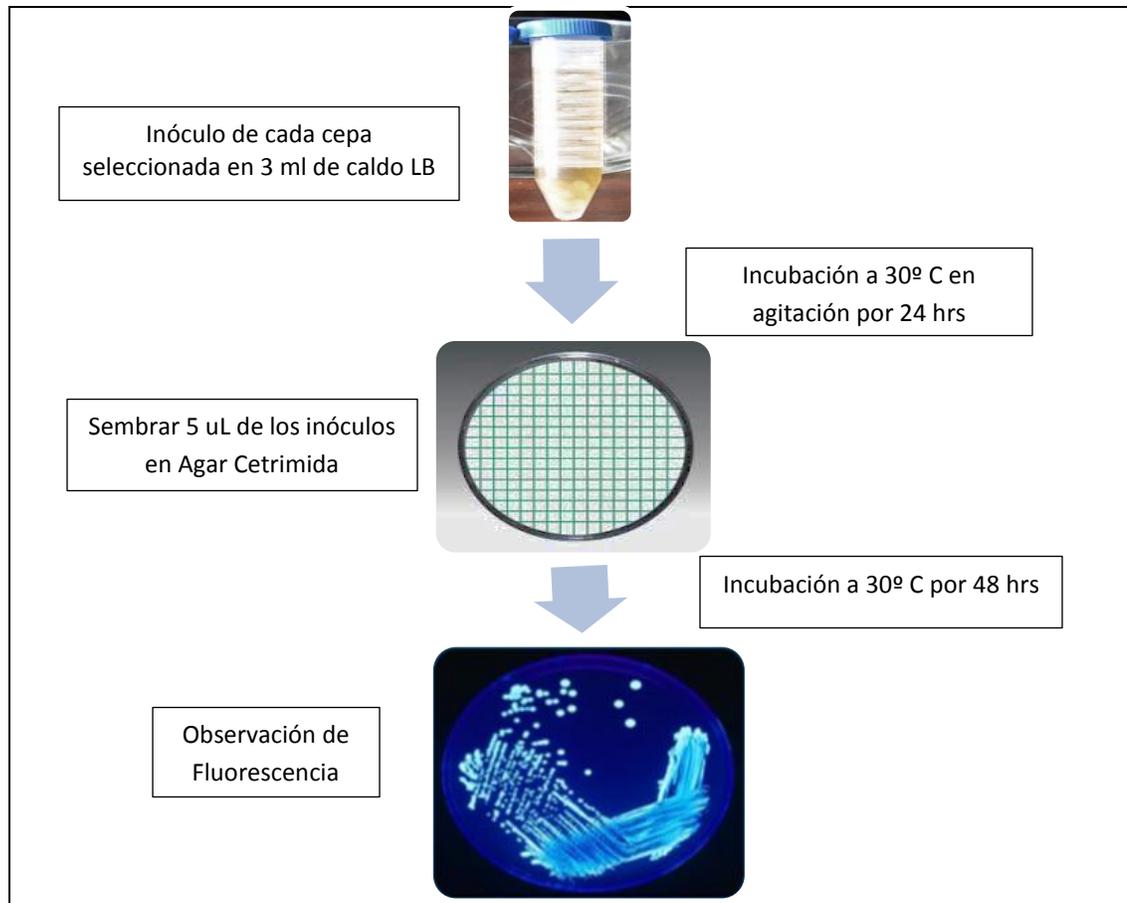


Ilustración 8 Método para la detección de cepas Fluorescentes.

11.6 Caracterización genotípica

11.6.1 Oligonucleótidos semi-específicos

La caracterización genotípica implicó primeramente el uso de oligonucleótidos semi-específicos del género *Burkholderia*; se prepararon suspensiones celulares de cada una de las cepas obtenidas, una cepa de *Burkholderia unamae* como control positivo y una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* como control negativo, en 400 uL de agua inyectable estéril y se mantuvieron en agitación por 24 h para su homogeneización. Se realizó también una reacción control con agua inyectable estéril en sustitución de suspensión celular. Cabe mencionar que previamente se realizaron pruebas de especificidad utilizando cepas no pertenecientes al género

Burkholderia, como por ejemplo *P. putida* KT244 por medio de la técnica de PCR. Los oligonucleótidos empleados y sus características se muestran a continuación:

OLIGONUCLEÓTIDOS SEMI-ESPECÍFICOS			
Clave	Secuencia (5'-3')	Posición del nucleótido	Tamaño del producto esperado
Bf	5'-TAGCCCTGCGAAAGCCG-3'	127-143	497 pb
Br	5'-GCCAGTCACCAATGCAG-3'	608-624	

Tabla 1 Oligonucleótidos semi-específicos del género Burkholderia (Tago et al., 2014).

Se prepararon reacciones de PCR de 8 uL de volumen final cada una con las siguientes concentraciones finales de cada reactivo:

REACCIÓN DE PCR	
H₂O estéril	3.99 uL
Dream Taq polimerasa	0.09 uL
10X Dream Taq Buffer 20 mM	0.8 uL
dNTP Mix	0.12 uL
Oligonucleotido Bf 20 pmol	1 uL
Oligonucleotido Br 20 pmol	1 uL
Suspensión celular	1 uL
Volumen final	8 uL

Tabla 2 Reacción de PCR para oligonucleótidos semi-específicos

La Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizó en un termociclador marca Veriti® de Applied Biosystems®, siguiendo las condiciones que se muestran a continuación:

Condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa			
Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	1 minuto	30
Alineamiento	58 °C	1 minuto	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	4 minutos	1

Tabla 3 Condiciones para la PCR con oligonucleotidos semi-especificos

Para la separación de fragmentos de ADN producidos por la amplificación en la PCR se realizó el corrimiento electroforético, en una cámara de electroforesis horizontal con gel de agarosa al 1% y buffer TAE al 1X, se cargó cada reacción en un pozo en el gel, adicionando 1 uL de buffer de carga azul de bromofenol, considerando también el marcador de peso molecular PstI. Se sometió a electroforesis por 45 min a 90 V. Finalizada la electroforesis, se procedió a teñir el gel en solución de Bromuro de Etidio para su posterior observación en el transiluminador UV y la selección de las muestras que presentaron bandas de un peso molecular equivalente a 497 pb. Se descartaron las muestras que no mostraron un producto de amplificación o cuyo producto es de un peso molecular diferente al esperado.

11.6.2 Amplificación del gen ribosomal 16S

Se retomaron las suspensiones celulares de las muestras que produjeron una banda de 497 pb de peso molecular para la amplificación del gen ribosomal 16S, además se utilizó la suspensión de la cepa de *Burkholderia unamae* como control

positivo y agua inyectable estéril como control negativo. Se emplearon oligonucleótidos universales con las siguientes características:

OLIGONUCLEÓTIDOS UNIVERSALES			
Clave	Secuencia (5'-3')	Posición del nucleótido	Tamaño del producto esperado
27F	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'		1465 pb
1492R	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'		

Tabla 4 Oligonucleótidos universales (Weisburg et al., 1991).

Las reacciones de PCR se prepararon con un volumen final de 8 uL, cada una con las siguientes concentraciones finales de cada reactivo:

REACCIÓN DE PCR	
H₂O estéril	3.99 uL
Dream Taq polimerasa	0.09 uL
10X Dream Taq Buffer 20 mM	0.8 uL
dNTP Mix	0.12 uL
Oligonucleotido 27F 20 pmol	1 uL
Oligonucleotido 1492R 20 pmol	1 uL
Suspensión celular	1 uL
Volumen final	8 uL

Tabla 5 Reacción de PCR para oligonucleótidos universales

La Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizó en un termociclador marca Veriti® de Applied Biosystems®, siguiendo las condiciones que se muestran a continuación:

Condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa			
Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	1 minuto	30
Alineamiento	58 °C	1 minuto	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	4 minutos	1

Tabla 6 Condiciones para PCR con oligonucleótidos universales

11.6.3 Purificación del producto de PCR a partir de un gel de agarosa

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis para seleccionar las bandas con un peso de aproximado de 1,465 pb, las cuales se extrajeron a partir de un gel de agarosa al 1% para realizar la purificación de productos de PCR con partículas de sílica, paso previo para la obtención de su secuencia. Este método consiste en el corte de bandas de interés y la adición de tres partes de volumen de solución caotrópica yoduro de sodio 6 M, los cuales se incuban a 65 °C por 10 minutos. Después se agregan 10 uL de suspensión de sílica y se mantienen en ligera agitación por 5 minutos, a continuación se procede a centrifugar por 30 segundos a 12,000 rpm para precipitar las partículas de sílica unidas con el DNA, el sobrenadante se decanta y el precipitado de sílica se somete a tres lavados sucesivos con solución de lavado (washing buffer). Y finalmente se añaden 30 uL de TAE para eluir el ADN retenido en la sílica.

11.6.4 Secuenciación

Después de la purificación del producto de PCR, se procedió a la preparación de las muestras conforme al Reglamento del Servicio de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. Se corroboró la presencia de banda única en gel de agarosa al 1% y se verificó la calidad y concentración de ADN con el uso del NanoDrop[®]. Por último, se ajustó la concentración de ADN a 120 ng, mezclados con 10 pmol del oligonucleótido universal 27F en un volumen final de 16 uL, se etiquetaron y embalaron para su envío junto con sus respectivas solicitudes de secuencia. Las secuencias parciales fueron enviadas por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM por medio de correo electrónico y se continuó con su análisis y edición con el programa BioEdit ver. 7.2.5 una vez obtenida la secuencia en sentido Forward (5'-3'), se comparó con las secuencias disponibles en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, y se seleccionaron aquellas con relación al género *Burkholderia* para continuar con la secuenciación en sentido Reverse (3'-5'). Al disponer de ambas secuencias de cada cepa se obtuvo la secuencia consenso con el programa BioEdit ver. 7.2.5. Posteriormente se comparó la secuencia consenso con las contenidas en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

12. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

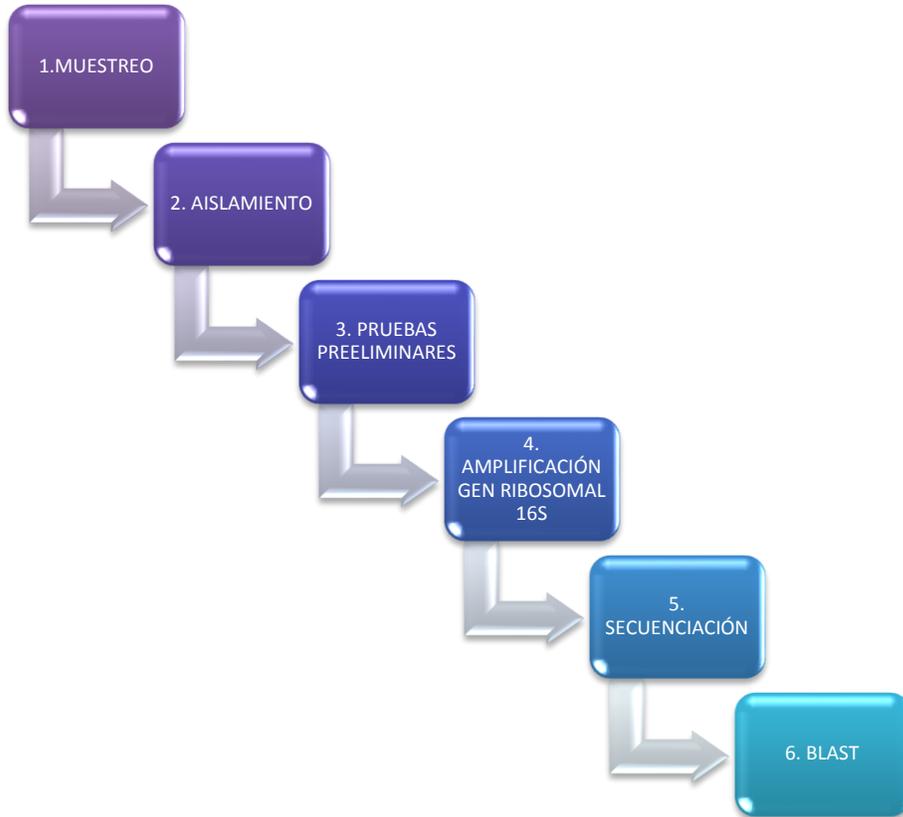


Ilustración 3 Diagrama general de trabajo

13. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se enumera la relación del tipo, número, ubicación y pH de las muestras recolectadas:

1° MUESTREO RESERVA DE LA BIOSFERA TEHUACAN-CUICATLAN				
No.	ORIGEN		UBICACION	pH
1	TIERRA DE CULTIVO DE MAÍZ		Latitud 18°20'49.2"N Longitud -97°26'55.5"O Altitud 1515 msnm	7.94
2	RIZÓSFERA DE CACTUS		Latitud 18°20'49.2"N Longitud -97°26'55.5"O Altitud 1522 msnm	7.77
3	RIZÓSFERA DE BIZNAGA		Latitud 18°20'49.2"N Longitud -97°26'55.5"O Altitud 1530 msnm	7.94
4	RIZÓSFERA DE BIZNAGA GRANDE		Latitud 18°20'49.2"N Longitud -97°26'55.5"O Altitud 1544 msnm	7.66
5	RIZÓSFERA DE MAGUEY		Latitud 18°20'47.4"N Longitud -97°27'06.7"O Altitud 1517 msnm	7.75
6	RIZÓSFERA DE PAPELILLO		Latitud 18°20'47.5"N Longitud -97°27'06.9"O Altitud 1520 msnm	7.47

7	RIZÓSFERA DE MAMILLARIA		Latitud 18°19'32.0"N Longitud -97°29'40.1"O Altitud 1538 msnm	7.72
8	RIZÓSFERA DE NOPAL		Latitud 18°19'32.2"N Longitud -97°29'39.3"O Altitud 1536 msnm	7.8
9	RIZÓSFERA DE ARBUSTO 1		Latitud 18°19'30.2"N Longitud -97°29'39.5"O Altitud 1530 msnm	7.34
10	RIZÓSFERA DE ARBUSTO 2		Latitud 18°20'49.2"N Longitud -97°29'38.1"O Altitud 1532 msnm	8.09

Tabla 7 Muestras correspondientes al primer muestreo.

2° MUESTREO				
MUNICIPIOS TENAMPULCO-CUETZÁLAN-TLATLAUQUITEPEC				
No.	ORIGEN		UBICACIÓN	pH
MUNICIPIO DE TENAMPULCO				
1	RIZÓSFERA DE NARANJO		Latitud 20°9'04.2"N Longitud -97°23'43.6"O Altitud 159 m	6.73
2	RIZÓSFERA DE MAÍZ I		Latitud 20°9'03.1"N Longitud -97°23'40.9"O Altitud 170 m	7.04
3	RIZÓSFERA DE PASTO		Latitud 20°8'54.7"N Longitud -97°24'2.1"O Altitud 162 m	7.07

4	RIZÓSFERA DE PLATANO		Latitud 20°8'16.3"N Longitud -97° 23'57.1"O Altitud 167 m	6.98
MUNICIPIO DE CUETZÁLAN				
5	RIZÓSFERA DE BLUE BERRY		Latitud 19°58'33.3"N Longitud -97°32'57.7"O Altitud 1621 m	6.25
6	RIZÓSFERA DE CHILE		Latitud 19°58'33.6"N Longitud -97° 32'56.1"O Altitud 1619 m	5.54
7	RIZÓSFERA DE CAFÉ		Latitud 19°58'39.1"N Longitud -97°32'59.4"O Altitud 1597 m	4.7
8	RIZÓSFERA DE NOGAL		Latitud 19°58'23.5"N Longitud -97° 33'05.6"O Altitud 1524 m	5.59
9	RIZÓSFERA DE MAIZ II		Latitud 19°58'23.1"N Longitud -97° 33'06.3"O Altitud 1523 m	5.8
10	RIZÓSFERA DE PLANTA SILVESTRE		Latitud 19°58'23.1"N Longitud -97° 33'06.2"O Altitud 1523 m	4.82
11	RIZÓSFERA DE AJO		Latitud 19°58'23.0"N Longitud -97° 33'06.1"O Altitud 1522 m	5.20

12	RIZÓSFERA DE COLA DE MONO		Latitud 19°58'22.6"N Longitud -97° 33'06.6"O Altitud 1519 m	5.14
13	RIZÓSFERA DE ORQUIDEA		Latitud 19°58'22.4"N Longitud -97° 33'06.5"O Altitud 1520 m	4.97
14	RIZÓSFERA DE ALCATRAZ		Latitud 19°58'22.7"N Longitud -97° 33'06.8"O Altitud 1520 m	4.91
MUNICIPIO DE TLATLAUQUITEPEC				
15	TIERRA DE CULTIVO DE PAPA			5.96

Tabla 8 Muestras correspondientes al segundo muestreo.

3° MUESTREO VOLCÁN CITLALTEPETL				
No.	ORIGEN		UBICACIÓN	pH
1	TIERRA DE CULTIVO DE HABA		Latitud 19°4'04.2"N Longitud -97°19'40.9"O Altitud 3201 msnm	6.0
2	RIZÓSFERA DE OYAMEL		Latitud 19°7'03.5"N Longitud -97°31'05.4"O Altitud 3428 msnm	5.78
3	RIZÓSFERA DE ARBOL		Latitud 19°7'07.1"N Longitud -97°31'03.8"O Altitud 3541 msnm	5.57

4	SUELO		<p>Latitud 19°6'04.3"N Longitud -97°30'01.9"O Altitud 3840 msnm</p>	6.1
5	RIZÓSFERA DE LEGUMINOSA		<p>Latitud 19°4'11.6"N Longitud -97°18'33.6"O Altitud 3573 msnm</p>	5.15
6	RIZÓSFERA DE PASTO		<p>Latitud 19°6'04.4"N Longitud -97°30'02.1"O Altitud 3840 msnm</p>	6.54
7	RIZÓSFERA DE CARDO DE LOS VOLCANES		<p>Latitud 19°6'04.3"N Longitud -97°30'01.9"O Altitud 3840 msnm</p>	6.22
8	SUELO ARENOSO		<p>Latitud 19°6'04.4"N Longitud -97°30'02.7"O Altitud 3840 msnm</p>	6.11
9	RIZÓSFERA DE HONGO CHICO		<p>Latitud 19°5'03.2"N Longitud -97°29'04.3"O Altitud 3432 msnm</p>	5.77
10	RIZÓSFERA DE HONGO GRANDE		<p>Latitud 19°7'03.8"N Longitud -97°31'05.4"O Altitud 3423 msnm</p>	5.74

11	TIERRA DE CULTIVO DE NABO		Latitud 19°7'01.2"N Longitud -97°31'09.5"O Altitud 3350 msnm	5.61
12	MUSGO		Latitud 19°6'03.2"N Longitud -97°30'04.3"O Altitud 3430 msnm	5.8

Tabla 9 Muestras correspondientes al tercer muestreo.

Como se indica en la metodología se utilizó el medio semi-selectivo PCAT y diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} de cada muestra, de esta manera observamos que las placas correspondientes a la dilución 10^{-1} y 10^{-2} presentaban gran cantidad de UFC y en la mayoría de los casos no habían colonias aisladas, mientras que en las placas con las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} como era de esperarse había menor cantidad y era más factible tomar las colonias aisladas que cumplieran con la morfología colonial característica del género *Burkholderia* ya conocida caracterizada por ser colonias lisas, de coloración blanquecina hasta amarillenta y en algunos casos viscosas.

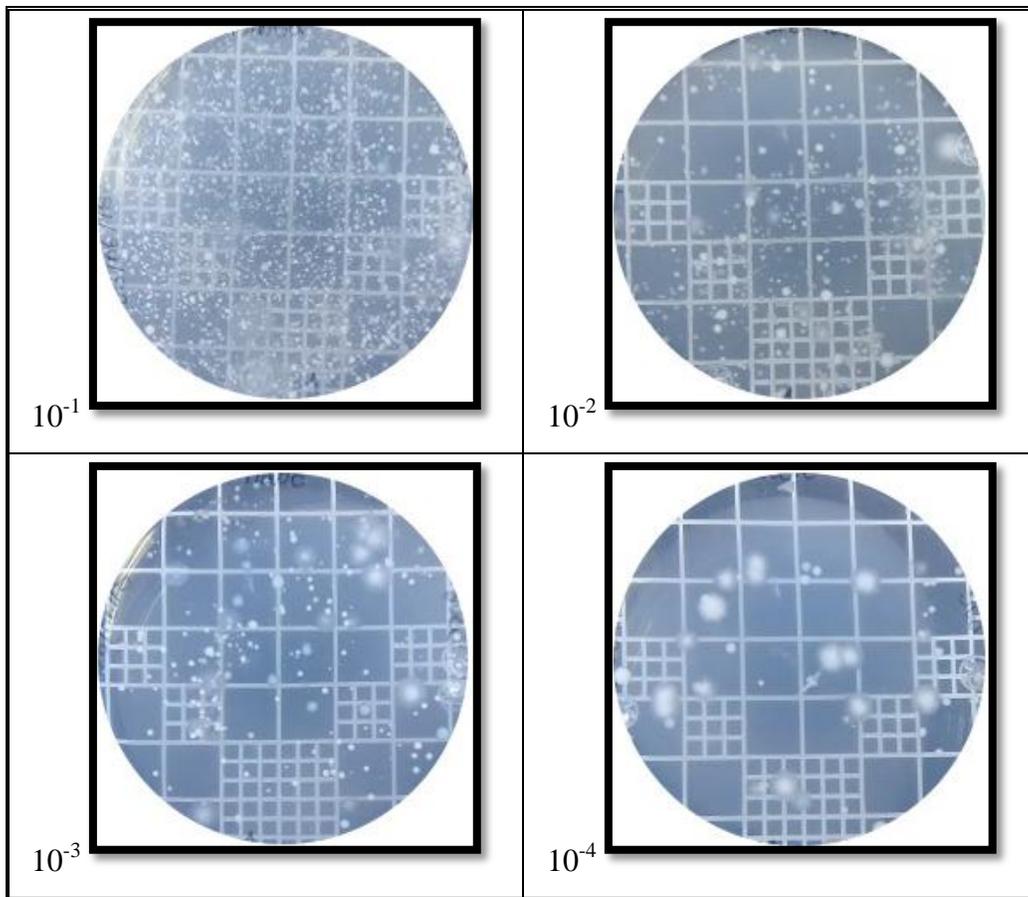


Ilustración 4 Ejemplo del crecimiento en medio PCAT por dilución

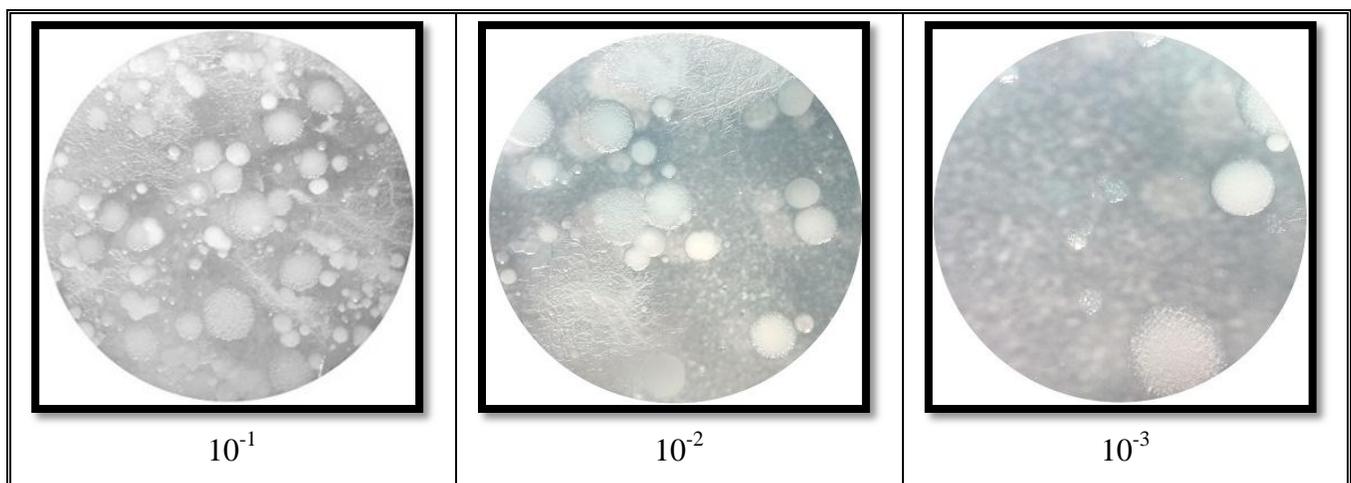


Ilustración 5 Vista en estereoscopio de medio PCAT

Las colonias que diferían de la morfología observada en el género *Burkholderia* fueron descartadas.



Ilustración 12 Ejemplo de morfología descartada

Del total de cepas obtenidas en los tres muestreos se descartaron en total 38 cepas en la prueba de producción de pigmentos por presentar fluorescencia al observarse en el transiluminador de luz UV en el medio de cultivo Cetrimida con glicerol o pigmentación en el medio King A. La imagen muestra cepas en el medio cetrimida, donde también se incluyen una cepa de *Pseudomonas* PAB1 como control positivo y una cepa *Burkholderia unamae* como control negativo.

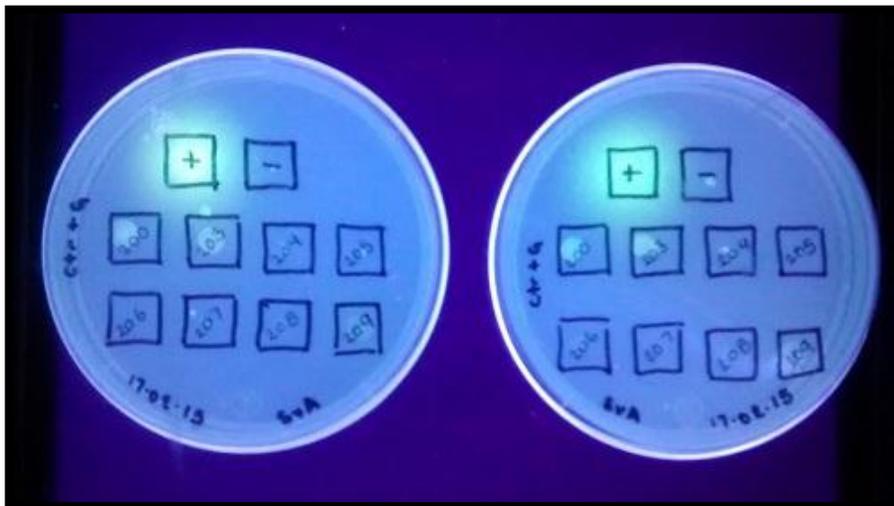


Ilustración 6 Ejemplo de cepas en medio Cetrimida y glicerol visto en transiluminador de luz UV

El crecimiento de algunas cepas se vio inhibido en el medio Cetrimida y glicerol por lo que se implementó el medio King A y glicerol para facilitar su crecimiento y observar la producción de otros pigmentos.

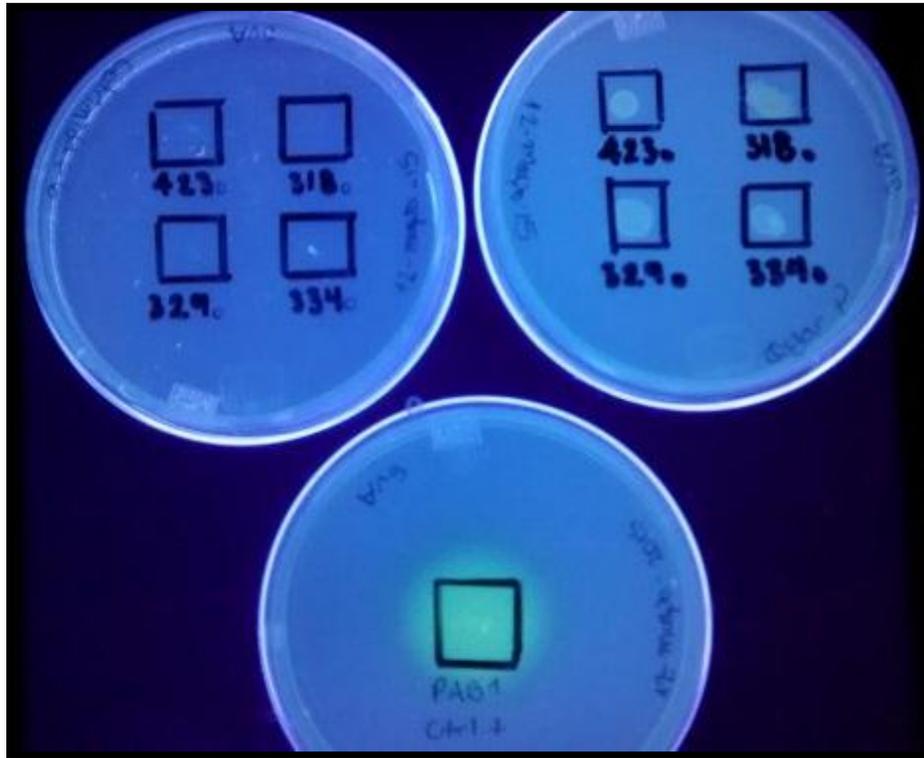


Ilustración 7 Cepas en medio cetrimida y glicerol a la izquierda, y mismas cepas en medio King A y glicerol a la derecha con control positivo placa inferior

La ilustración 15 muestra cepas que se vieron inhibidas en el medio de cultivo Cetrimida y se probaron en el medio King A adicionado con glicerol, donde también es posible observar producción de pigmentos y fluorescencia, también se contempla un control positivo (*Pseudomonas* PAB1) por separado al observar que el crecimiento es mucho más abundante que en el medio Cetrimida y prevenir que interfiriera con el resto de las cepas. Se observan las mismas cepas sembradas a la derecha en medio King A con crecimiento y a la izquierda en medio Cetrimida en el que no presentó crecimiento.



Ilustración 8 Ejemplo de cepas en agar King, control positivo a la derecha

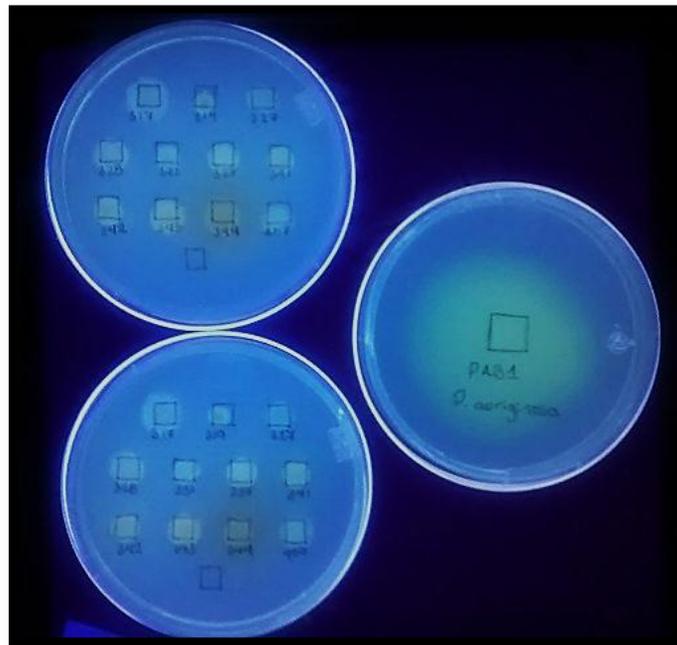


Ilustración 15 Ejemplo de cepas con pigmentación en medio King A visto en transiluminador de luz UV

Como se puede observar en la ilustración 17, en el medio King A también es posible observar pigmentación como para el caso de la cepa 344 del grupo D.

A continuación se probaron los oligonucleótidos semi-específicos para el género *Burkholderia* Bf y Br con las cepas restantes, en este punto se descartó la mayoría de las cepas cultivadas, únicamente 16 del total de cepas obtenidas después de las descartadas por producción de pigmentos, produjeron un producto de amplificación aproximado al peso esperado (497 pb).

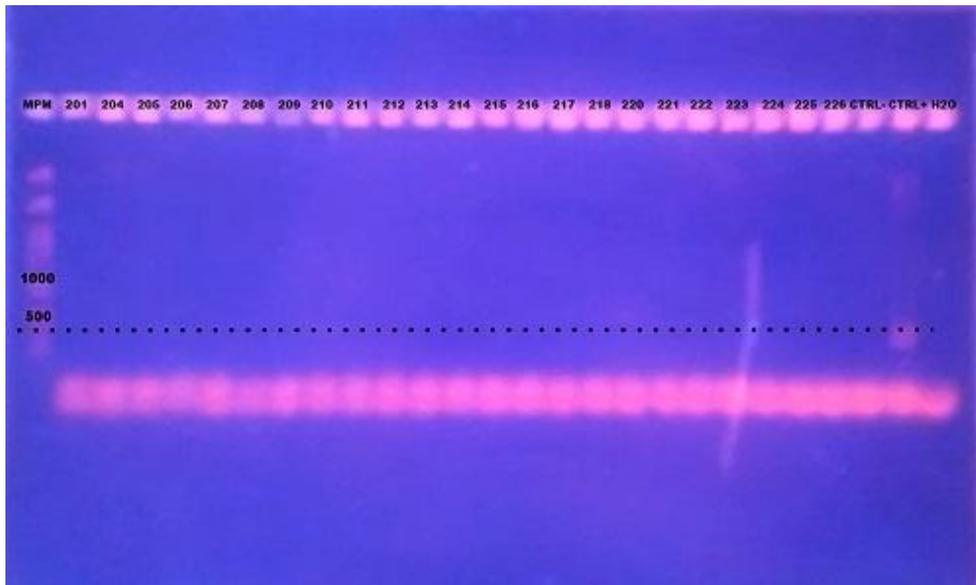


Ilustración 9 Cepas correspondientes al primer muestreo

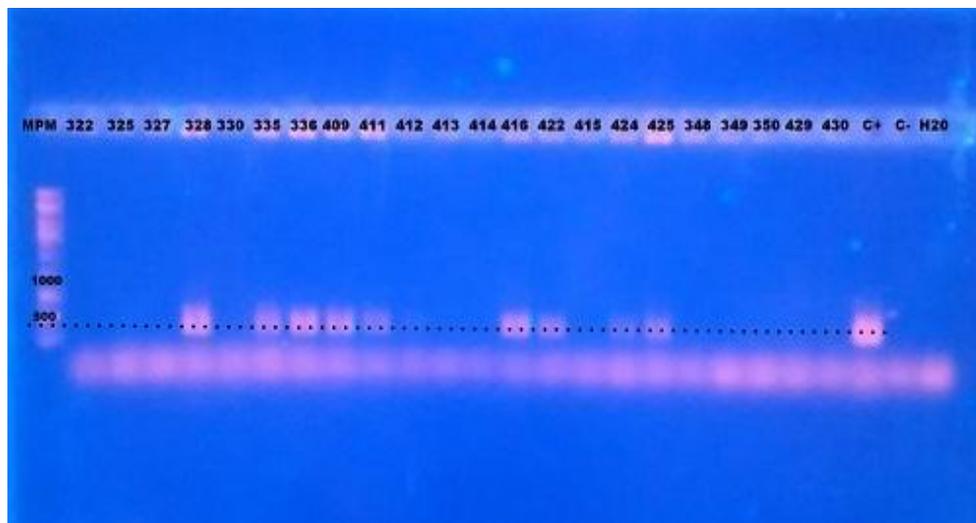


Ilustración 17 Cepas correspondientes al segundo muestreo

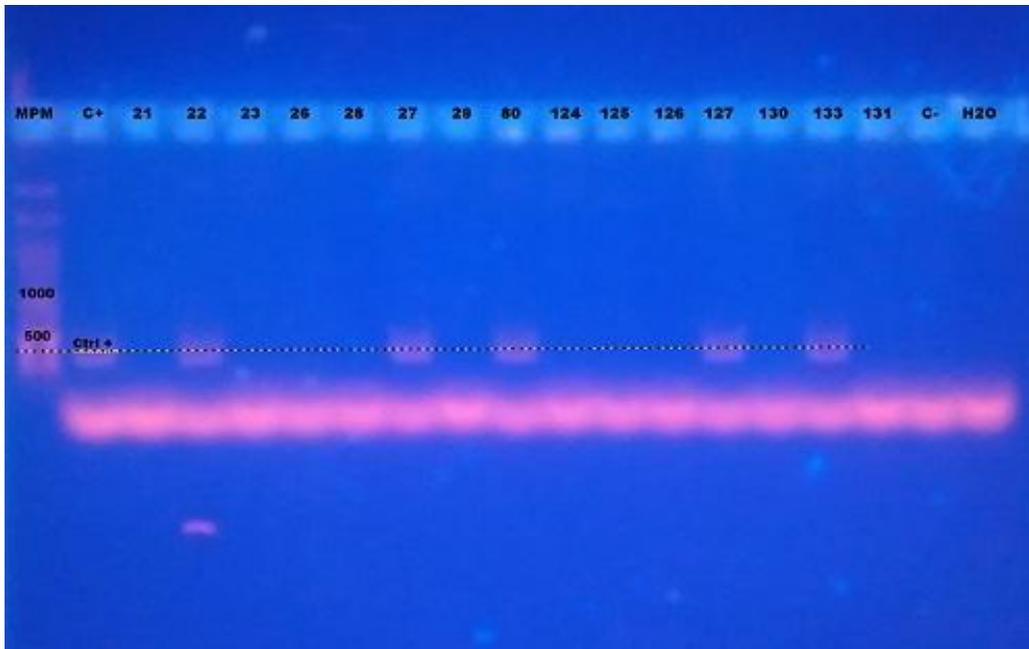


Ilustración 10 Cepas correspondientes al tercer muestreo

Recapitulando hasta este punto, se obtuvieron un total de 278 aislamientos a través del cultivo en medio PCAT de los tres muestreos realizados, de los cuales 38 fueron descartados por producción de pigmentos y 6 más por presentar diferente morfología. A partir de los 234 candidatos, 13 aislamientos produjeron un producto de amplificación de aproximadamente 497 pb, diez se obtuvieron de las localidades de Cuetzálán, Tenampulco y Tlatlauquitepec y tres del muestreo en el volcán Citlaltepec. El muestreo del que se consiguió el menor número de aislamientos fue el realizado en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, y ninguna de las cepas aisladas provenientes de este muestreo fue considerada como candidata a *Burkholderia*. La siguiente tabla detalla estos datos:

RESUMEN DE AISLAMIENTOS			
Región	VII	II	III
Aislamientos en PCAT	27	84	167
Cepas + Producción de Pigmentos	5	18	15
Descartadas por morfología	0	6	0
+ Oligos semi-especificos	0	10	3
Total de candidatas	13		

Tabla 10 Resumen de Aislamientos

Al identificar mediante el uso de los oligonucleótidos semi-específicos las probables candidatas a *Burkholderia* se procedió a la amplificación del gen 16S RNA ribosomal haciendo uso de los oligonucleótidos universales 27F y 1492R con los que se obtuvieron de productos de amplificación de aproximadamente 1300 pb la imagen ilustra la amplificación de las cepas 422, 424 y 425 además de una cepa de *B. unamae* como control positivo.

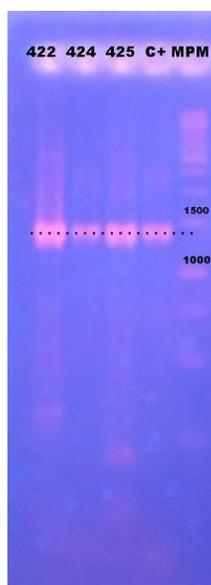


Ilustración 11 Amplificación con lo oligonucleótidos universales

Al obtener las secuencias de las cepas seleccionadas se editaron con el programa BioEdit ver. 7.2.5 como se muestra en la ilustración 22, donde es posible observar la secuencia con su respectivo electroferograma, la edición corresponde a la cepa 335 del grupo D, los picos se ven bien definidos y sin interferencia de otra secuencia.



Ilustración 20 Edición de la secuencia del gen 16S rRNA en el programa BioEdit ver. 7. 2.5.

Al alinear las secuencias en sentido “Forward” (5’-3’) y sentido “Reverse” (3’-5’) con el programa BioEdit ver. 7.2.5 se obtiene una secuencia consenso la cual fue ingresada en el programa BLAST que realiza la búsqueda y comparación de la secuencia consultada con otras contenidas en la base de datos del NCBI, esta

herramienta nos provee de una lista de las secuencias homologas a la secuencia que buscamos identificar.

NCBI/BLAST/blastn suite/Formatting Results - B4G1NUKD014

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [YouTube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#)

Nucleotide Sequence (1389 letters)

RID [B4G1NUKD014](#) (Expires on 02-05 01:00 am)

Query ID [Id|Query_110173](#) Database Name [nr](#)

Description [None](#) Description [Nucleotide collection \(nt\)](#)

Molecule type [nucleic acid](#) Program [BLASTN 2.3.1+](#) [Citation](#)

Query Length [1389](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

[+ Graphic Summary](#)

[- Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Burkholderia sp. HC1.1a1 partial 16S rRNA gene, isolate HC1.1a1	2470	2470	99%	0.0	99%	HF674709.1
Uncultured bacterium clone E42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2464	2464	100%	0.0	99%	FJ466275.1
Burkholderia sp. ASST gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2462	2462	100%	0.0	99%	AB303630.2
Burkholderia sp. Cc145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2457	2457	99%	0.0	99%	FJ528270.1
Burkholderia sp. DCY93 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	100%	0.0	98%	KJ653223.1
Burkholderia tuberum partial 16S rRNA gene, strain STM3649	2447	2447	100%	0.0	98%	FN908403.1
Burkholderia sp. SY26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2446	2446	100%	0.0	98%	KP687370.1
Burkholderia monticola strain JC2948 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2446	2446	100%	0.0	98%	KF155692.1
Burkholderia sp. ASS3 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2446	2446	100%	0.0	98%	AB303631.2
Burkholderia tuberum partial 16S rRNA gene, strain STM3638	2442	2442	100%	0.0	98%	FN908407.1
Burkholderia tuberum partial 16S rRNA gene, strain STM6035	2442	2442	100%	0.0	98%	FN908406.1

Ilustración 12 Comparación de secuencia con BLAST

Los datos obtenidos de la consulta de las secuencias en BLAST se resumen a continuación:

Resumen sobre el análisis de la secuencia parcial del gen ribosomal 16S en BLAST

Grupo	Clave	Ubicación	Origen	No. de nucleótidos	Hit NCBI (BLAST)	Max Score	Total Score	Query cover	E value	% ID
D	D328	Cuetzálan	Rizósfera de Mora azul	1393	Uncultured <i>Burkholderia</i> sp. clone:Pgu2-13	2545	2545	100%	0.0	99%
					<i>Burkholderia</i> sp. ANL2	2534	2534	100%	0.0	99%
					<i>B. terrae</i> QYGXJ3-2	2512	2512	100%	0.0	99%
	D335	Cuetzálan	Rizósfera de chile	1388	<i>B. cepacia</i> IHB B 1715	2531	2531	100%	0.0	99%
					<i>B. stabilis</i> G25	2519	2519	100%	0.0	99%
					<i>B. metallica</i> R- 16017	2519	2519	100%	0.0	99%
	D336	Cuetzálan	Rizósfera de chile	1390	<i>B. cepacia</i> IHB B 1715	2540	2540	100%	0.0	99%
					<i>B. metallica</i> R- 16017	2529	2529	100%	0.0	99%
					<i>B. lata</i> L24	2523	2523	100%	0.0	99%
	D409	Cuetzálan	Rizósfera de café	1389	<i>B. tuberum</i> STM3649	2466	2466	100%	0.0	99%
<i>B. monticola</i> JC2948					2464	2464	100%	0.0	99%	

				<i>B. susongensis</i> L226	2442	2442	100%	0.0	98%
D411	Cuetzálan	Rizósfera de café	1345	<i>B. arboris</i> R-24201	2473	2473	100%	0.0	99%
				<i>B. cepacia</i> NBRC 3739	2468	2468	100%	0.0	99%
				<i>B. contaminans</i> RA 07A1.3	2462	2462	100%	0.0	99%
D416	Cuetzálan	Rizósfera de ajo	1388	<i>B. contaminans</i>	2564	2564	100%	0.0	100%
				<i>B. cepacia</i>	2564	2564	100%	0.0	100%
				<i>B. arboris</i>	2564	2564	100%	0.0	100%
D422	Cuetzálan	Rizósfera de orquídea	1353	<i>Burkholderia</i> sp. Cs130	2494	2494	100%	0.0	99%
				<i>B. hospita</i> LMG 20598	2475	2475	100%	0.0	99%
				<i>B. terrae</i>	2449	2449	100%	0.0	99%
D424	Cuetzálan	Rizósfera de orquídea	1386	<i>Burkholderia</i> sp. 17	2455	2455	98%	0.0	99%
				<i>B. dipogonis</i> DI1 4	2446	2446	100%	0.0	99%
				<i>B. phytofirmans</i> PSB48	2422	2422	100%	0.0	98%
D425	Cuetzálan	Rizósfera de alcatraz	1359	<i>Burkholderia</i> sp. Cs130	2494	2494	100%	0.0	99%
				<i>B. hospita</i> LMG 20598	2486	2486	100%	0.0	99%
				<i>B. caribensis</i> XVI	2444	2444	100%	0.0	99%

	D433	Tlatlauquitepec	Tierra de cultivo de papa	1392	<i>Burkholderia sp.</i> KN-28	2569	2569	99%	0.0	100%
					<i>Burkholderia sp.</i> DS23	2566	2566	100%	0.0	99%
					<i>Burkholderia sp.</i> ASS8	2556	2556	100%	0.0	99%
E	E80	Volcán Citlaltepec	Leguminosa							
	E127	Volcán Citlaltepec	Hongo 1							
	E133	Volcán Citlaltepec	Hongo 2							

Tabla 11 Resumen del análisis de secuencias parciales del gen 16S RNA ribosomal en BLAST

A través del análisis de las secuencias con el programa BLAST podemos observar que la longitud de las secuencias es conveniente para dicho análisis, ya que es de 1300 pb aproximadamente, también vemos que los porcentajes de identidad van de 98 a 100%; con estos datos podemos concluir que la metodología aplicada funciona para obtener cepas con alto porcentaje de homología con secuencias del gen 16S RNA ribosomal de cepas del género *Burkholderia*.

Todas las cepas identificadas dentro del género *Burkholderia* en la presente tesis provienen de suelo, diez de las cepas provienen de la Región II en la Sierra Nororiental la cual presenta clima cálido húmedo, de estas, siete provienen de cultivos agrícolas rurales: mora azul, chile, café, ajo, y papa, y tres provienen de plantas ornamentales: orquídea y alcatraz, todas las muestras de especies vegetales se encontraban aparentemente sanas al momento del muestreo, libres de fertilizantes químicos o herbicidas según la información de los agricultores, con lo que tentativamente podríamos descartar el rol como patógenos en su hospedero. Por el contrario seis de estas cepas tienen alto porcentaje de identidad con secuencias parciales del gen 16S RNA ribosomal de cepas que integran el grupo de “bacterias ambientales benéficas para las plantas” o PBE, con esto no se descarta el posible potencial biotecnológico de las cepas que comparten esta homología con otras que se pueden ubicar en el *Complejo Burkholderia Cepacia* BCC ya que como se ha demostrado en numerosos estudios este grupo también tienen múltiples aplicaciones en biorremediación o biocontrol.

La siguiente tabla agrupa las cepas aisladas, el lugar, hospedero y el pH del suelo de rizósfera del que fueron aisladas:

<i>Burkholderia spp.</i>					
Clave	Cepa	Origen	Altitud	Hospedero	pH
328D	<i>B. sp.</i>	Cuetzálan	1621 msnm	Rizósfera de Mora azul	6.25
335D	<i>B. sp.</i>	Cuetzálan	1619 msnm	Rizósfera de chile	5.54

336D	<i>B. sp.</i>	Cuetzálan	1619 msnm	Rizósfera de chile	5.54
409D	<i>B. sp.</i>	Cuetzálan	1597 msnm	Rizósfera de café	4.7
411D	<i>B. arboris</i>	Cuetzálan	1597 msnm	Rizósfera de café	4.7
416D	<i>B. sp.</i>	Cuetzálan	1522 msnm	Rizósfera de ajo	5.2
422D	<i>B. sp.</i>	Cuetzálan	1520 msnm	Rizósfera de orquídea	4.97
424D	<i>B. sp.</i>	Cuetzálan	1520 msnm	Rizósfera de orquídea	4.97
425D	<i>B. sp.</i>	Cuetzálan	1520 msnm	Rizósfera de alcatraz	4.91
433D	<i>B. sp.</i>	Tlatlauquitepec	¿?	Tierra de cultivo de papa	5.96
80E		Volcán Citlaltepec			
127E		Volcán Citlaltepec			
133E		Volcán Citlaltepec			

Tabla 12 Resumen de aislamientos identificados como pertenecientes al género *Burkholderia*.

En resumen, con la metodología aplicada fue posible alcanzar el objetivo general del presente trabajo de tesis y contribuir a el conocimiento sobre la presencia del genero *Burkholderia* en el Estado de Puebla. Consideramos relevantes los resultados obtenidos, por una parte, los datos acerca de la distribución, el hecho de no obtener cepas del genero *Burkholderia* de las muestras recolectadas en la Reserva de la Biosfera Tehuacan-Cuicatlan, puede ser evidencia del medio que resulta hostil para el establecimiento del genero *Burkholderia*, ya sea por el clima seco de la región o bien el pH del suelo que se inclina a ser de neutro a alcalino (de 7.34 a 8.09), por el contrario de las otras dos regiones donde el pH tiende de neutro a acido (4.7 a 7.07 en el segundo muestreo y 5.15 a 6.54 en el tercero); por otra parte, existe la probabilidad de que las cepas que se obtuvieron e identificaron dentro del género *Burkholderia* tengan aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo la secuencia de la cepa 328D que se aisló de rizósfera de Mora azul tiene 99% de identidad con la cepa *Burkholderia sp.* ANL2 que se caracterizó de un grupo de bacterias que degradan anilina que fueron aisladas de suelo y aguas residuales (Shin *et al.*, 1998).

Las secuencias de las cepas 335D y 336D que se aislaron de la rizósfera de chile muestran que podría tratarse de la misma cepa, e incluso considerarse como una clona, ya que ambas provienen de la misma fuente de aislamiento y ambas comparten 99% de identidad con la secuencia de la cepa *B. cepacia IHB B 1715*. Es el mismo caso para las cepas 411D aislada de rizósfera de café y 416D de rizósfera de ajo, tienen 99% y 100% de identidad respectivamente con la cepa *Burkholderia arboris*, que aunque pertenece al *Complejo Burkholderia Cepacia*, no está exenta de tener aplicación biotecnológica. Sin embargo en este caso, seria importante resaltar que la misma cepa está asociada a diferentes hospederos, la planta de ajo y de café. Muestras obtenidas con diferente localización y a partir de un suelo ácido (pH5.0 promedio). Por mencionar un ejemplo de una posible aplicación biotecnológica, se ha reportado en la literatura que *Burkholderia arboris* SL1B1 puede establecer una relación simbiótica con una levadura,

para la degradación microbiana de aceites y grasas, la cual se ha desarrollado para su aplicación en tratamiento de aguas residuales. Dicha cepa secreta lipasa y por otro lado, la levadura *Candida cylindracea* SL1B2 es capaz de asimilar glicerol sobre la degradación de triglicéridos. La bacteria no utiliza el glicerol como fuente de carbono mientras que la levadura muestra sólo actividad lipasa débil; la asimilación de los compuestos fue notablemente reforzada por un cultivo mixto de las cepas *B. arboris* SL1B1 y *C. cylindracea* SL1B2 (Matsuoka *et al.*, 2009).

Otro caso de que podría tratarse de la misma cepa son la 422D y 425D aisladas de orquídea y alcatraz respectivamente tienen 99% de identidad con la de la cepa *Burkholderia sp.* Cs130, la cual se obtuvo de un grupo de bacterias aisladas de nódulos de ocho especies de leguminosas subtropicales, de las que se estudió la efectividad simbiótica como beta-rizobios en *P. vulgaris* (Lammel *et al.*, 2013).

La secuencia de la cepa 409, aislada a partir de rizósfera de planta de café, tiene 99% de identidad con la de la cepa *B. tuberum*, la cual es una especie simbiótica de la leguminosa *Aspalathus carnososa* y se ha demostrado que tiene la capacidad de fijación de nitrógeno (Vandamme *et al.*, 2002).

El aislamiento 433 que se obtuvo a partir de papa, su secuencia de tiene 99% de identidad con la cepa *Burkholderia sp.* ASS8, la cual fue aislada del bosque en el Instituto Nacional de Ciencias Agro-Ambientales, Ibaraki, Japón de la cual se ha comprobado su actividad para degradar 3-clorobenzoato (3-CB) el cual es un compuesto contaminante.

14. CONCLUSIONES

Se identificaron bacterias pertenecientes al género *Burkholderia*, con lo que se suma un segundo estudio que evidencia la presencia de éste género en el Estado de Puebla en diversos ambientes y asociados a diferentes hospederos.

Se identificaron cepas del género *Burkholderia* en asociación con especies vegetales de interés agrícola.

Suponemos de importancia la acidez del suelo para la presencia del género *Burkholderia*, considerando la ausencia total de señal con el uso de los oligonucleótidos semi-específicos Bf y Br en el primer muestreo cuyo pH de las muestras va de neutro a básico.

Las cepas identificadas como *Burkholderia spp.* requieren de un estudio más exhaustivo para la determinación de la especie a la que corresponden.

Realizar otros estudios para evaluar el potencial biotecnológico de las cepas identificadas considerando que gran parte de las especies del género están involucradas en procesos de Biorremediación y Control Biológico.

REFERENCIAS

- Arias, N. M., Pérez, A. L., Ricalde, S. L., & Yáñez, J. M. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos: Ciencia y Cultura*, 15-23.
- Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2006). *Ecology From Individuals to Ecosystems* (4 ed.). Blackwell Publishing.
- Bueno, A. G. (1998). *Los sistemas de clasificación de los seres vivos* (Vol. 26). Madrid, España: AKAL.
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., & Bork, P. (2006). Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life. *Science*, 1283-1287.
- Escalante, A. E. (2007). Ecología molecular en el estudio de las comunidades bacterianas. En L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología.

- Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., & Doudoroff, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 333-339.
- Piñeiro, D. (2014). *De las bacterias al hombre: la evolución*. México, D. F.: Fondo de Cultura Económica.
- Reyes, Y. S. (9 de Julio de 2013). *Repositorio Universitario de Divulgación de la Ciencia*. (D. G. Ciencia, Ed.) Obtenido de Cienciorama: <http://hdl.handle.net/123456789/647>
- Schopf, J. W. (1993). Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life. *Science*, 260(5108), 640-646.
- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2012). Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. *Microbial ecology*, 249-266.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Editorial Médica Panamericana.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 6578-6583.
- Whittaker, R. H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163, 150-160.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4576-4579.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Aceves, V., & Belinda, N. (2012). Aislamiento y diversidad de especies del genero *Burkholderia* en el Estado de Tamaulipas (Tesis Doctoral).
2. Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnica mexicana*, 35(1), 9-21.
3. Antonio, A. L. Aislamiento e Identificación de especies pertenecientes al género de *Burkholderia sp.*, en dos regiones del Estado de Puebla [Tesis]. Puebla:

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Químicas; 2015.

4.

5. Barka, E. A., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J., & Audran, J. C. (2000). Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 186(1), 91-95.

6. Begon, M., Harper, J. L., & Townsend, C. R. (1986). Ecology - Individuals, populations and communities. Blackwell Scientific Publications. Londres.

7. Bull, A.T. & Stach, J.E.M. (2004). An overview of biodiversity estimating the scale. Microbial diversity and bioprospecting (ed. Bull, A.T.), pp. 15-28. ASM Press, Washington, D.C.

8. Burkholder, W.H. (1950). Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*. 40: 115-117.

9. <http://catalogacionrua.unam.mx/enciclopedia/index.html>

10. Caumette, P., Brochier-Armanet, C., & Normand, P. (2015). Taxonomy and Phylogeny of Prokaryotes. In *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications* (pp. 145-190). Springer Netherlands.

11.

12. Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., & Estrada-de los Santos, P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1165-1172.

13. Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-De Los Santos, P., & Martínez-Aguilar, L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5308-5319.

14. Castorena, G., Mugica, V., Le Borgne, S., Acuña, M. E., Bustos-Jaimes, I., & Aburto, J. (2006). Carbazole biodegradation in gas oil/water biphasic media by a new isolated bacterium Burkholderia sp. strain IMP5GC. *Journal of applied microbiology*, 100(4), 739-745.

15. Chen, W. M., de Faria, S. M., Straliootto, R., Pitard, R. M., Simoes-Araujo, J. L., Chou, J. H., .. & Sprent, J. I. (2005). Proof that Burkholderia strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7461-7471.

16. Chowdhury, P. R., & Heinemann, J. A. (2006). The general secretory pathway of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* BG164R is necessary for cavity disease in white button mushrooms. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3558-3565.
17. Coenye, T. & Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5(9), 719-729.
18. Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C. & Barka, E. A. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia spp.* in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 607-626.
19. CONABIO. [homepage en Internet]. [consultado septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/>
20. CONANP, 2013. [homepage en Internet]. [consultado septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.conanp.gob.mx/>
21. Connell, J.H. (1978). Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science* 199:1302-1310.
22. Cordova-Kreylos, A. L., Fernandez, L. E., Koivunen, M., Yang, A., Flor-Weiler, L. & Marrone, P. G. (2013). Isolation and characterization of *Burkholderia rinojensis sp. nov.*, a non-*Burkholderia cepacia* complex soil bacterium with insecticidal and miticidal activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7669-7678.
- 23.
24. Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., & Caballero-Mellado, J. (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2790-2798.
25. Estrada-de los Santos P., Vinuesa P., Martínez-Aguilar L., Hirsch A. M., Caballero-Mellado J. (2013). Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Curr. Microbiol.* 67, 51–60
26. Estrada, P., Mavingui, P., Cournoyer, B., Fontaine, F., Balandreau, J., & Caballero-Mellado, J. (2002). A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian journal of microbiology*, 48(4), 285-294.

27. González, A. & Bueno, A. G. (1998). *Los sistemas de clasificación de los seres vivos* (Vol. 26). Pag.17 Ediciones AKAL.

28. INEGI. [homepage en Internet]. [consultado septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/>

Lammel, D. R., Cruz, L. M., Carrer, H., & Cardoso, E. J. (2013). Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(12), 2335-2342.

29. Le Dang, Q., Son, S. W., Cheon, H. M., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., & Kim, J. C. (2011). Pyochelin isolated from *Burkholderia arboris* KRICT1 carried by pine wood nematodes exhibits phytotoxicity in pine callus. *Nematology*, 13(5), 521-528.

30. Linneo, C. (1735). *Systema Naturae, sive regna tria naturae, systematics proposita per classes, ordines, genera & species*. Leiden: Theodorum Haak. p. 11.

31. LPSN. [homepage en Internet]. [consultado septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.bacterio.net/>

32. Matsuoka, H., Miura, A., & Hori, K. (2009). Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107(4), 401-408.

33. Medina, R. D. F. (2012). Algunas reflexiones sobre la clasificación de los organismos vivos. *Hist. ciênc. saúde-Manguinhos*, 19(3), 883-898.

34. Mwangi, S. N., Karanja, N. K., Boga, H., Kahindi, J. H. P., Muigai, A., Odee, D., & Mwenda, G. M. (2011). Diversidad genética y eficiencia simbiótica de bacterias noduladoras de leguminosas obtenidas de sistemas con diferentes usos de suelo en Taita Taveta, Kenia. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 13(1), 109-118.

35. Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., Chueire, L. M. O., Tiedje, J. M., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2012). Genome sequences of *Burkholderia* sp. strains CCGE1002 and H160, isolated from legume nodules in Mexico and Brazil. *Journal of bacteriology*, 194(24), 6927-6927.

36.

37. Pedersen, K. (2000). Exploration of deep intraterrestrial life. *FEMS Microbiol. Lett.* 185:9-16

38. Perin, L., Martínez-Aguilar, L., Castro-González, R., Estrada-de Los Santos, P., Cabellos-Avelar, T., Guedes, H. V. & Caballero-Mellado, J. (2006). Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3103-3110.
40. Reis, V. M., Estrada-De Los Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S., & Balandreau, J. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2155-2162.
41. Rossello-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
42. Sanguin, H., A. Herrera, C. Oger-Desfeux, A. Dechesne, P. Simonet, E. Navarro, T.M. Vogel, Y. Moënne-Loccoz, X. Nesme, & G.L. Grundmann. (2006). Development and validation of a prototype 16S rRNA-based taxonomic microarray for *Alphaproteobacteria*. *Environ Microbiol.* 8:289–307.
43. Schönmann, S., A. Loy, C. Wimmersberger, J. Sobek, C. Aquino, P. Vandamme, B. Frey, H. Rehrauer, & L. Eberl. (2009). 16S rRNA gene-based phylogenetic microarray for simultaneous identification of members of the genus *Burkholderia*. *Environ. Microbiol.* 11:779–800.
44. Santini, A. C., Santos, H. R. M., Gross, E., & Corrêa, R. X. (2013). Genetic diversity of *Burkholderia* (Proteobacteria) species from the Caatinga and Atlantic rainforest biomes in Bahia, Brazil. *Genetics and molecular research: GMR*, 12(1), 655.
45. Sawana, A., Adeolu, M., & Gupta, R. S. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia gen. nov.* harboring environmental species. *Frontiers in Genetics*, 5, 429.
46. Schopf, J. W. (1993). Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, 260(5108), 640-646.
- Shin, S. Y., Chung, M. J., Yi, H. R., Kim, C. K., Min, K. H., & Ka, J. O. (1998). Identification and characterization of aniline-degrading bacteria isolated from soil and wastewater. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-*, 36, 80-85.
47. Stoyanova, M., Pavlina, I., Moncheva, P., & Bogatzevska, N. (2007). Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21(3), 306-310.

48.

49. Tago, K., Itoh, H., Kikuchi, Y., Hori, T., Sato, Y., Nagayama, A., & Hayatsu, M. (2014). A Fine-Scale Phylogenetic Analysis of Free-Living *Burkholderia* Species in Sugarcane Field Soil. *Microbes and Environments*, 29(4), 434.

Tindall, B. J., Rosselló-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266.

Vandamme, P., Goris, J., Wen-Ming, C., de Vos, P., & Willems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(4), 507.

51. Vial, L., Groleau, M. C., Dekimpe, V., & Déziel, É. (2007). *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(9), 1407-1429.

52..

53.

54. Woese, Carl R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088-5090.

55..

56. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., & Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology*, 36(12), 1251-1275.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645.

Zuleta, L. F. G., de Oliveira Cunha, C., De Carvalho, F. M., Ciapina, L. P., Souza, R. C., Mercante, F. M., ... & De Vasconcelos, A. T. R. (2014). The complete genome of *Burkholderia phenoliruptrix* strain BR3459a, a symbiont of *Mimosa flocculosa*: highlighting the coexistence of symbiotic and pathogenic genes. *BMC genomics*, 15(1), 1.

16. ANEXO

1° Muestreo: Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán			
Resumen de los Aislamientos			
Aislado (Clave)	Origen	Fluorescencia	Cebadores específicos
M1-200	Tehuacán_Tierra de Cultivo de Maíz	+ Fluorescencia	
M1-201	Tehuacán_Tierra de Cultivo de Maíz	-	-
M1-212	Tehuacán_Tierra de Cultivo de Maíz	-	-
M1-213	Tehuacán_Tierra de Cultivo de Maíz	-	-
M1-214	Tehuacán_Tierra de Cultivo de Maíz	+ Fluorescencia	
M2-215	Tehuacán_Rizósfera de Cactus	-	-
M2-222	Tehuacán_Rizósfera de Cactus	-	-
M4-202	Tehuacán_Rizósfera de Biznaga grande	+ Fluorescencia	
M4-203	Tehuacán_Rizósfera de Biznaga grande	+ Fluorescencia	
M5-204	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M5-205	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M5-206	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M5-207	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M5-208	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M5-209	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M5-210	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M5-211	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M5-216	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M5-217	Tehuacán_Rizosfera de Maguey	-	-
M7-218	Tehuacán_Rizósfera de Mammillaria	-	-
M7-219	Tehuacán_Rizósfera de Mammillaria	+ Fluorescencia	
M7-220	Tehuacán_Rizósfera de	-	-

	Mammillaria		
M7-221	Tehuacán_Rizósfera de Mammillaria	-	-
M8-223	Tehuacán_Rizósfera de Nopal	-	-
M8-224	Tehuacán_Rizósfera de Nopal	-	-
M8-225	Tehuacán_Rizósfera de Nopal	-	-
M9-226	Tehuacán_Rizósfera de Arbusto	-	-
TOTAL DE AISLAMIENTOS		27	
FLUORESCENCIA		5	
DESCARTADO POR MORFOLOGIA		0	
BF-BR		0	

2° Muestreo: Cuetzalan, Tenampulco y Tlatlauquitepec Resumen de los Aislamientos			
Aislado (Clave)	Origen	Fluorescencia	Cebadores específicos
M1-401	Tenampulco_Rizósfera de Naranja	-	-
M1-402	Tenampulco_Rizósfera de Naranja	-	-
M1-403	Tenampulco_Rizósfera de Naranja	+ Fluorescencia	
M1-404	Tenampulco_Rizósfera de Naranja	+ Fluorescencia	
M1-405	Tenampulco_Rizósfera de Naranja	+ Fluorescencia	
M1-406	Tenampulco_Rizósfera de Naranja	-	-
M1-407	Tenampulco_Rizósfera de Naranja	-	-
M2-301	Tenampulco_Rizósfera de Maíz	-	-
M5-302	Tenampulco_Rizósfera de Maíz	+ Fluorescencia	
M5-303	Tenampulco_Rizósfera de Maíz	+ Fluorescencia	
M5-304	Tenampulco_Rizósfera de Maíz	+ Fluorescencia	
M5-305	Tenampulco_Rizósfera de Maíz	-	-

M5-306	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	Descartado por morfología	
M5-307	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	+ Fluorescencia	
M7-308	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	+ Fluorescencia	
M7-309	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	-	*
M7-310	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	-	-
M9-311	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	-	-
M9-312	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	-	-
M4-313	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	-	-
M5-314	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	-	*
M5-315	Tenampulco_Rizósfera de Pasto	+ Fluorescencia	
M5-316	Tenampulco_Rizósfera de Platano	-	-
M5-317	Tenampulco_Rizósfera de Platano	-	-
M5-318	Tenampulco_Rizósfera de Platano	-	-
M5-319	Tenampulco_Rizósfera de Platano	-	-
M5-320	Tenampulco_Rizósfera de Platano	-	-
M5-321	Tenampulco_Rizósfera de Platano	Descartado por morfología	
M4-322	Tenampulco_Rizósfera de Platano	-	-
M4-323	Tenampulco_Rizósfera de Platano	-	*
M4-324	Tenampulco_Rizósfera de Platano	Descartado por morfología	
M4-325	Tenampulco_Rizósfera de Platano	-	-
M5-326	Cuetzalan_Rizósfera de Mora Azul	Descartado por morfología	
M5-327	Cuetzalan_Rizósfera de Mora Azul	-	-

M5-328	Cuetzalan_Rizósfera de Blue Berry	-	+
M5-329	Cuetzalan_Rizósfera de Blue Berry	-	*
M5-330	Cuetzalan_Rizósfera de Blue Berry	-	-
M6-331	Cuetzalan_Rizósfera de Chile	Descartado por morfología	
M6-332	Cuetzalan_Rizósfera de Chile	-	-
M6-333	Cuetzalan_Rizósfera de Chile	Descartado por morfología	
M6-334	Cuetzalan_Rizósfera de Chile	-	-
M6-335	Cuetzalan_Rizósfera de Chile	-	+
M6-336	Cuetzalan_Rizósfera de Chile	-	+
M7-408	Cuetzalan_Rizósfera de Cafe	+ Pigmento	
M7-409	Cuetzalan_Rizósfera de Café	-	+
M7-410	Cuetzalan_Rizósfera de Café	+ Fluorescencia	
M7-411	Cuetzalan_Rizósfera de Café	-	+
M7-412	Cuetzalan_Rizósfera de Cafe	-	-
M8-413	Cuetzalan_Rizósfera de Nogal	-	-
M8-414	Cuetzalan_Rizósfera de Nogal	-	-
M8-415	Cuetzalan_Rizósfera de Nogal	-	-
M9-337	Cuetzalan_Rizósfera de Maíz II	-	-
M9-338	Cuetzalan_Rizósfera de Maíz II	-	-
M9-339	Cuetzalan_Rizósfera de Maíz II	-	-
M9-340	Cuetzalan_Rizósfera de Maíz II	-	-
M9-341	Cuetzalan_Rizósfera de Maíz II	-	-

M9-342	Cuetzalan_Rizósfera de Maíz II	-	-
M9-343	Cuetzalan_Rizósfera de Planta Silvestre	-	-
M9-344	Cuetzalan_Rizósfera de Planta Silvestre	+ Pigmento	
M9-345	Cuetzalan_Rizósfera de Planta Silvestre	-	-
M9-346	Cuetzalan_Rizósfera de Planta Silvestre	-	-
M10-416	Cuetzalan_Rizósfera de Ajo	-	+
M10-417	Cuetzalan_Rizósfera de Ajo	-	-
M10-418	Cuetzalan_Rizósfera de Ajo	+ Fluorescencia	
M10-419	Cuetzalan_Rizósfera de Ajo	-	-
M10-420	Cuetzalan_Rizósfera de Ajo	-	-
M11-347	Cuetzalan_Rizósfera de Cola de Mono	-	-
M11-348	Cuetzalan_Rizósfera de Cola de Mono	-	-
M11-349	Cuetzalan_Rizósfera de Cola de Mono	-	-
M11-350	Cuetzalan_Rizósfera de Cola de Mono	-	-
M12-421	Cuetzalan_Rizósfera de Orquídea	+ Fluorescencia	
M12-422	Cuetzalan_Rizósfera de Orquídea	-	+
M12-423	Cuetzalan_Rizósfera de Orquídea	-	*
M12-424	Cuetzalan_Rizósfera de Orquídea	-	+
M13-425	Cuetzalan_Rizósfera de Alcatraz	-	+
M13-426	Cuetzalan_Rizósfera de Alcatraz	+ Fluorescencia	
M13-427	Cuetzalan_Rizósfera de Alcatraz	-	*
M13-428	Cuetzalan_Rizósfera de Alcatraz	+ Fluorescencia	

M14-429	Tlatlauquitepec _Rizósfera de Papa	-	-
M14-430	Tlatlauquitepec _Rizósfera de Papa	-	-
M14-431	Tlatlauquitepec _Rizósfera de Papa	+ Fluorescencia	
M14-432	Tlatlauquitepec _Rizósfera de Papa	+ Fluorescencia	
M14-433	Tlatlauquitepec _Rizósfera de Papa	-	+
M14-434	Tlatlauquitepec _Rizósfera de Papa	-	-
TOTAL DE AISLAMIENTOS		84	
FLUORESCENCIA		18	
DESCARTADO POR MORFOLOGIA		6	
BF-BR		10	

3° Muestreo: Volcán Pico de Orizaba Resumen de los Aislamientos

Aislado (Clave)	Origen	Fluorescencia	Cebadores específicos
M1-1	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-2	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-3	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	*
M1-4	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-5	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	*
M1-6	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-7	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-8	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-9	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-

M1-10	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-11	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-12	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-13	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	+ Fluorescencia	
M1-14	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-15	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-16	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-17	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-18	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M1-19	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Haba	-	-
M2-20	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	+ Fluorescencia	
M2-21	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-22	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	+
M2-23	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-24	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	+
M2-25	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	*
M2-26	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-27	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	+
M2-28	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-29	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-30	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-31	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	+ Fluorescencia	

M2-32	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-33	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-34	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-35	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-36	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-37	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-38	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M2-39	Pico de Orizaba_Rizosfera de Oyamel	-	-
M3-40	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-41	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-42	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-43	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-44	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-45	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	*
M3-46	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-47	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-48	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-49	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-50	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-51	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-52	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-53	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-

M3-54	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-55	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-56	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M3-57	Pico de Orizaba_Rizosfera de Árbol	-	-
M4-58	Pico de Orizaba_Suelo	-	-
M4-59	Pico de Orizaba_Suelo	-	-
M4-60	Pico de Orizaba_Suelo	+ Fluorescencia	
M4-61	Pico de Orizaba_Suelo	-	-
M4-62	Pico de Orizaba_Suelo	-	-
M4-63	Pico de Orizaba_Suelo	-	-
M4-64	Pico de Orizaba_Suelo	-	-
M4-65	Pico de Orizaba_Suelo	+ Fluorescencia	
M4-66	Pico de Orizaba_Suelo	-	-
M5-67	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-68	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-69	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-70	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-71	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-72	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-73	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	*
M5-74	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-75	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-

M5-76	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-77	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	*
M5-78	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-79	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M5-80	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	+
M5-81	Pico de Orizaba_Rizósfera de Leguminosa	-	-
M6-82	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-83	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-84	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-85	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-86	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-87	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-88	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-89	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-90	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-91	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-92	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-93	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-94	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-
M6-95	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	+ Fluorescencia	
M6-96	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	*
M6-97	Pico de Orizaba_Rizósfera de Pasto	-	-

M6-98	Pico de Orizaba_Rizosfera de Pasto	-	-
M6-99	Pico de Orizaba_Rizosfera de Pasto	-	*
M6-100	Pico de Orizaba_Rizosfera de Pasto	-	-
M6-101	Pico de Orizaba_Rizosfera de Pasto	-	-
M7-102	Pico de Orizaba_Rizosfera de Cardo	-	-
M7-103	Pico de Orizaba_Rizosfera de Cardo	+ Fluorescencia	
M7-104	Pico de Orizaba_Rizosfera de Cardo	+ Fluorescencia	
M7-105	Pico de Orizaba_Rizosfera de Cardo	-	-
M7-106	Pico de Orizaba_Rizosfera de Cardo	+ Fluorescencia	
M7-107	Pico de Orizaba_Rizosfera de Cardo	+ Fluorescencia	
M7-108	Pico de Orizaba_Rizosfera de Cardo	-	-
M7-109	Pico de Orizaba_Rizosfera de Cardo	-	-
M7-110	Pico de Orizaba_Rizosfera de Cardo	-	-
M8-111	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-112	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-113	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-114	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-115	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-116	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-117	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-118	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-119	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	+ Fluorescencia	

M8-120	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-121	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	+ Fluorescencia	
M8-122	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M8-123	Pico de Orizaba_Suelo arenoso	-	-
M9-124	Pico de Orizaba_Hongo pequeño	-	-
M9-125	Pico de Orizaba_Hongo pequeño	-	-
M9-126	Pico de Orizaba_Hongo pequeño	-	-
M9-127	Pico de Orizaba_Hongo pequeño	-	+
M9-128	Pico de Orizaba_Hongo pequeño	-	*
M9-129	Pico de Orizaba_Hongo pequeño	-	-
M9-130	Pico de Orizaba_Hongo pequeño	-	-
M10-131	Pico de Orizaba_Hongo grande	-	-
M10-132	Pico de Orizaba_Hongo grande	-	-
M10-133	Pico de Orizaba_Hongo grande	-	+
M10-134	Pico de Orizaba_Hongo grande	-	-
M10-135	Pico de Orizaba_Hongo grande	-	-
M10-136	Pico de Orizaba_Hongo grande	-	-
M10-137	Pico de Orizaba_Hongo grande	-	-
M10-138	Pico de Orizaba_Hongo grande	-	-
M11-139	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M11-140	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M11-141	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-

M11-142	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M11-143	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M11-144	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M11-145	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M11-146	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M11-147	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M11-148	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M11-149	Pico de Orizaba_Tierra de cultivo de Nabo	-	-
M12-150	Pico de Orizaba_Musgo	-	-
M12-151	Pico de Orizaba_Musgo	-	-
M12-152	Pico de Orizaba_Musgo	-	-
M12-153	Pico de Orizaba_Musgo	-	*
M12-154	Pico de Orizaba_Musgo		
M12-155	Pico de Orizaba_Musgo	+ Fluorescencia	
M12-156	Pico de Orizaba_Musgo	+ Fluorescencia	
M12-157	Pico de Orizaba_Musgo	-	-
M12-158	Pico de Orizaba_Musgo	+ Fluorescencia	
M12-159	Pico de Orizaba_Musgo	-	*
M12-160	Pico de Orizaba_Musgo	-	-
M12-161	Pico de Orizaba_Musgo	-	-
M12-162	Pico de Orizaba_Musgo	-	-
M12-163	Pico de Orizaba_Musgo	-	-

M12-164	Pico de Orizaba_Musgo	-	*
M12-165	Pico de Orizaba_Musgo	-	*
M12-166	Pico de Orizaba_Musgo	-	-
M12-167	Pico de Orizaba_Musgo	-	-
TOTAL DE AISLAMIENTOS		167	
FLUORESCENCIA		15	
DESCARTADOS POR MORFOLOGIA		0	
BF-BR		3	

* Diferentes valores de peso molecular con los oligonucleótidos Bf y Br

CALDO LURIA BERTANI	
Compuesto	(g/litro)
Peptona de caseína	10.0
Extracto de levadura	5.0
Ácido succinico	0.05
K_2HPO_4	4.0
KH_2PO_4	4.0
Extracto de Levadura	0.2
Agar	15.0
Nistatina	100,000 UI/L

MEDIO CETRIMIDA	
Compuesto	(g/litro)
Peptona de caseína	20.0
MgCl	1.4

Sulfato potasico	10.0
Sulfato de magnesio	10.0
Cetrimida	0.3
Agar	13.6
Glicerol	10.0 ml

MEDIO KING A	
Compuesto	(g/litro)
Peptona de gelatina	20.0
Sulfato de potasio	10.0
MgCl	1.4
Agar	15.0
Glicerol	10.0 ml

SUPER BUFFER	
Compuesto	(g/litro)
Ácido Bórico	45.0
Hidróxido de Sodio	8.0

WASHING BUFFER	
Compuesto	(g/litro)
Tris	2.42
NaCl	0.58