

**Identificación taxonómica de bacterias cultivables de la cavidad oral de *Porthidium
lansbergii* (Serpentes: Viperidae).**

Juan David Bayona Serrano

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

Director

Jorge Hernández Torres

Ph.D. en Ciencias

Co-Directora

Oriana Danuta Serna

Bióloga

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Bucaramanga

2017

Agradecimientos

A mi papá que fue madre y padre; y a mi abuela que me crio, por enseñarme las cosas que de verdad importan y hacerme todo lo que soy. Sin ustedes no habría logrado nada. Esto y todo lo que venga es tanto suyo como mío. Los amo.

A mi mamá por enseñarme a disfrutar en grande los tiempos pequeños y a siempre devolverle una sonrisa a la vida. ¡Te amo ma!

A toda mi familia por haberme acompañado en este camino que apenas comienza y que quiero continuar a su lado, riendo, llorando o bailando, pero siempre juntos.

A Santiago Palencia y Juan Sebastián Martínez por enseñarme a divertirme con una pelota entre los pies y a reírme de mí mismo, y bueno, de los demás también.

A Hongui, por estar conmigo cuando la necesité y por ser mi compañera de risas favorita. Por una simbiosis que dure hasta que olvidemos qué es una simbiosis. *¡In sæcula sæculorum!*

A Omar Daniel León y Karen Méndez por haberme dejado entrar en sus vidas como a pocos y carcajearme más veces de las que puedo recordar. Porque se metió un chicharrón por la ventana y ya quitaron la jardinera del Camilo Torres. ¡Los quiero!

A Elson Meneses por ayudarme a encontrar mi pasión, guiarme siempre que lo he necesitado, y ser tanto maestro, como amigo. ¡Gracias!

A Wilfredo Chinchilla, por haberme hecho sentir como en casa cuando lo necesitaba y haberme regalado momentos y risas que nunca olvidaré. ¡Si vos vieraaaas!

A Jeisson Gómez por compartir y apoyar mis gustos ‘venenosos’ y a todo G.E.A.R.S.

A Peggy, por haber sido profesora, conocida y luego amiga. Gracias por tantas risas y momentos únicos. ¡Abrazo pandis!

Al profesor Jorge Hernández por tantos consejos y enseñanzas, por confiar en mí y darme siempre su apoyo para encontrar la mejor solución a las adversidades. ¡Muchas gracias!

A Oriana Serna por su inmensurable ayuda y apoyo durante gran parte de mi carrera; espero haber pagado con risas tantas lecciones. ¡Gracias!

A todos los profesores que me han soportado durante mi carrera, gracias por cada momento que dedicaron a enseñarme algo. Espero honrar esa dedicación algún día.

A todos los amigos que hice durante el camino. No me quedó espacio para nombrarlos, pero sepan que cada risa, salida, cerveza y caída que compartimos me acompañarán por siempre.

Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Objetivos	17
1.1 General	17
1.2 Específicos	17
2. Competencias	17
3. Materiales y métodos	18
3.1 Toma de muestras	18
3.2. Aislamiento bacteriano en medios de cultivo.	20
3.3. Individualización de las cepas bacterianas	20
3.4. Caracterización morfológica de las cepas bacterianas.....	20
3.4.1. Caracterización macroscópica	20
3.4.2. Caracterización microscópica.	21
3.5. Caracterización molecular de las cepas bacterianas	21
3.5.1. Extracción de DNA total bacteriano.	21
3.5.2. Amplificación por PCR del gen <i>16S rRNA</i>	21
3.5.3. Purificación de los amplificados PCR.	22
3.5.4. Secuenciación de los productos PCR.....	22
3.6. Análisis bioinformático de las secuencias del gen <i>16S rRNA</i>	22
3.6.1. Búsquedas de secuencias similares en bases de datos	22

3.6.2. Análisis de distancia genética	23
3.7. Identificación taxonómica de los cultivos bacterianos	23
3.8. Criopreservación de los cultivos bacterianos.....	23
4. Resultados.....	24
4.1 Caracterización morfológica de las cepas bacterianas.....	24
4.1.1. Cepa P-lan 01	25
4.1.2. Cepa P-lan 02.....	26
4.1.3. Cepa P-lan 03.....	27
4.1.4. Cepa P-lan 04.....	29
4.1.5. Cepa P-lan 05.....	30
4.1.6. Cepa P-lan 06.....	31
4.1.7. Cepa P-lan 07.....	33
4.1.8. Cepa P-lan 08.....	34
4.1.9. Cepa P-lan 09.....	35
4.1.10. Cepa P-lan 10.....	37
4.1.11. Cepa P-lan 11.....	38
4.1.12. Cepa P-lan 12.....	39
4.1.13 Cepa P-lan 13.....	41
4.1.14. Cepa P-lan 14.....	42
4.1.15. Cepa P-lan 15.....	43
4.1.16. Cepa P-lan 16.....	45
4.1.17. Cepa P-lan 17.....	46
4.1.18. Cepa P-lan 18.....	47

4.1.19. Cepa P-lan 19..... 49

.1.20. Cepa P-lan 20..... 50

4.2 Caracterización molecular de las cepas aisladas..... 51

4.3 Criopreservación de cultivos..... 66

5. Discusión..... 66

6. Conclusiones 69

7. Recomendaciones 70

Referencias Bibliográficas 71

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Secuencias de referencia del gen 16S rRNA con mayor similitud para cada aislado</i>	56
Tabla 2. <i>Regiones hipervariables recuperadas de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislados P-lan.</i>	57
Tabla 3. <i>Determinación taxonómica definitiva de las cepas aisladas de la cavidad oral de P. lansbergii con base en la caracterización morfológica y el análisis molecular del gen 16S rRNA.</i>	64

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Mapa del Departamento de Santander. Se hace énfasis en la localización del Municipio de Betulia, sitio de muestreo (https://atlasdesantander.blogspot.com.co).....	19
<i>Figura 2.</i> Frotis para la obtención de las muestras.	19
<i>Figura 3.</i> Cultivos iniciales a partir de los frotis de la cavidad oral de <i>P. lansbergii</i> . A y B corresponden a siembras sobre medio LB; C siembras sobre medio BHI.....	24
<i>Figura 4.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 01	25
<i>Figura 5.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 01	26
<i>Figura 6.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 02.....	26
<i>Figura 7.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 02	27
<i>Figura 8.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 03.....	28
<i>Figura 9.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 03	28
<i>Figura 10.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 04.....	29
<i>Figura 11.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 04	30
<i>Figura 12.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 05.....	30
<i>Figura 13.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 05	31
<i>Figura 14.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 06.....	32
<i>Figura 15.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 06	32
<i>Figura 16.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 07.....	33

<i>Figura 17.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 07	34
<i>Figura 18.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 08.....	34
<i>Figura 19.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 08	35
<i>Figura 20.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 09.....	36
<i>Figura 21.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 09	36
<i>Figura 22.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 10.....	37
<i>Figura 23.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 10	38
<i>Figura 24.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 11	38
<i>Figura 25.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 11	39
<i>Figura 26.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 12.....	40
<i>Figura 27.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 12	40
<i>Figura 28.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 13.....	41
<i>Figura 29.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 13	42
<i>Figura 30.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 14.....	42
<i>Figura 31.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 14	43
<i>Figura 32.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 15.....	44
<i>Figura 33.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 15	44
<i>Figura 34.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 16.....	45
<i>Figura 35.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 16	46
<i>Figura 36.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 17.....	46
<i>Figura 37.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 17	47
<i>Figura 38.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 18.....	48
<i>Figura 39.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 18	48

<i>Figura 40.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 19.....	49
<i>Figura 41.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 19	50
<i>Figura 42.</i> Morfología macroscópica de la cepa P-lan 20.....	50
<i>Figura 43.</i> Morfología microscópica de la cepa P-lan 20	51
<i>Figura 44.</i> Gel 0.8% agarosa de extractos de DNA total de las cepas de aisladas.....	52
<i>Figura 45.</i> Geles 1% agarosa de amplificados parciales del gen <i>16S rRNA</i> con los oligonucleótidos 27F-1492R.....	53
<i>Figura 46.</i> Gel 1% agarosa de amplificados parciales del gen <i>16S rRNA</i> con los oligonucleótidos EUB338F-UniV907R.....	54
<i>Figura 47.</i> Gel 1% agarosa de los productos PCR purificados con columna de afinidad GeneJet™ (Thermo Scientific®).....	55
<i>Figura 48.</i> Alineamiento en Geneious R8 de las secuencias obtenidas de los aislados P-lan con las secuencias de referencia.	59
<i>Figura 49.</i> Árbol de distancia del grupo de secuencias “A”, inferido a partir de secuencias del gen <i>16S rRNA</i> mediante el método de Neighbor-Joining.	60
<i>Figura 50.</i> Árbol de distancia del grupo de secuencias “B” inferido a partir de secuencias del gen <i>16S rRNA</i> mediante el método de Neighbor-Joining.	61
<i>Figura 51.</i> Árbol de distancia del grupo de secuencias “C” inferido a partir de secuencias del gen <i>16S rRNA</i> mediante el método de Neighbor-Joining.	62
<i>Figura 52.</i> Árbol de distancia para la secuencia de la cepa P-lan 19 inferido a partir de secuencias del gen <i>16S rRNA</i> mediante el método de Neighbor-Joining.	63
<i>Figura 53.</i> Distribución de géneros identificados con base en el gen <i>16S rRNA</i> y características morfológicas.....	65

Resumen

Título: Identificación taxonómica de bacterias cultivables de la cavidad oral de *Porthidium lansbergii* (Serpentes: Viperidae)*

Autores: Bayona-Serrano, Juan David**

Palabras Clave: Viperidae, *Porthidium lansbergii*, Patoco, bacterias patógenas, gen 16S rRNA.

Descripción:

Las infecciones bacterianas son un factor común y de relevancia clínica en accidentes ofídicos, en especial, aquellos relacionados con géneros dentro de la familia Viperidae. Por esta razón, muchos autores han buscado caracterizar la comunidad bacteriana de la cavidad bucofaríngea de diversas especies de ofidios. En Colombia, esta problemática ha sido poco evaluada, por lo que se desconoce la diversidad bacteriana en la mayoría de las especies de serpientes venenosas del país. En Colombia, el género *Porthidium* (Viperidae) fue responsable de aproximadamente 260 accidentes ofídicos en 2015. Los accidentes con serpientes de este género están caracterizados por cuadros severos de hemorragia local, que pueden favorecer la infección bacteriana en el sitio de la mordida. En Santander, encontramos a la especie *P. lansbergii*, de la que se desconoce la comunidad bacteriana que habita su cavidad oral. El objetivo de este proyecto fue realizar una primera aproximación a las bacterias encontradas en la cavidad oral de esta especie, utilizando técnicas microbiológicas y moleculares. En total, se obtuvieron 20 cepas bacterianas que fueron clasificadas preliminarmente con base en la morfología macro y microscópica. Posteriormente, las cepas fueron determinadas integrando los rasgos morfológicos, con información derivada de alineamientos de secuencias del gen *16S rRNA*. Se identificaron exitosamente 18 cepas, distribuidas entre los géneros *Bacillus*, *Bordetella*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus* y *Enterobacter*, siendo este último el más representativo (35%). Los resultados de este proyecto aportarán al conocimiento de los posibles géneros bacterianos relacionados con infecciones por mordeduras de *P. lansbergii*. En el futuro inmediato, los resultados podrán servir de base para que profesionales de la salud indaguen las posibles implicaciones clínicas en caso de un accidente.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. y Co-Directora: Oriana Danuta Serna, Bióloga

Abstract

Title: Taxonomic identification of cultivable bacteria from the oral cavity of *Porthidium lansbergii* (Serpentes: Viperidae)*

Authors: Bayona-Serrano, Juan David**

Keywords: Viperidae, *Porthidium lansbergii*, Patoco, pathogenic bacteria, gen 16S rRNA.

Des cription:

Bacterial infections are a common and clinically relevant factor after ophidian accidents, especially those related to genera within the Viperidae family. Hence, many authors have sought to characterize the bacterial communities of the oropharyngeal cavity of various species of ophidians. In Colombia, this problem has been poorly evaluated, so the bacterial diversity in most of the venomous snake species in the country is still unknown. Within the Viperidae family is the genus *Porthidium*, responsible for approximately 260 ophidian accidents in the country in 2015. Accidents with snakes of this genus are characterized by severe local hemorrhage, which may favor bacterial infection at the site of the bite. In Santander, we find *P. lansbergii*, whose bacterial community that inhabits its oral cavity is unknown. The goal of this project was to make a first inventory of the bacteria found in the oral cavity of *P. lansbergii*, by using microbiological and molecular techniques. In total, 20 bacterial strains were obtained and preliminarily identified based on their macro and microscopic morphologies. Subsequently, the strains were taxonomically determined by integrating morphology and sequence alignments of the *16S rRNA* gene. Eighteen strains distributed among the genera *Bacillus*, *Bordetella*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus* and *Enterobacter* were successfully identified, the latter being the most representative (35%). The results of this project will contribute to the knowledge of possible bacterial genera related to bite infections of *P. lansbergii*. In the near future, our results should serve as a basis for health professionals, to investigate the possible clinical implications after being bitten.

* Bachelor degree work

** Science Faculty, Department of Biology, Advisor: Jorge Hernández Torres, Ph.D. and Co-advisor: Oriana Danuta Serna, Biologist

Introducción

El accidente ofídico en Colombia es una problemática de salud pública relevante, con 4273 casos de mordeduras de serpientes reportados para el año 2015 (Instituto Nacional de Salud, 2015). Aunque la mayoría de los accidentes ofídicos ocurren en el campo, también es significativa la ocurrencia de mordeduras en serpentarios, con veterinarios, biólogos y estudiantes como víctimas (Henaó et al., 2005). Más de 95% de los accidentes ofídicos reportados al año se atribuyen a serpientes de la familia Viperidae, especialmente a los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Porthidium* (Instituto Nacional de Salud, 2015).

El cuadro clínico de accidentes con serpientes de la familia Viperidae suele caracterizarse por severas manifestaciones locales de dolor, hemorragia y edema, que conducen a la destrucción de tejidos y la formación de abscesos (Mackessy, 2010). La perforación tisular favorece la entrada de microorganismos patógenos que habitan la cavidad oral y el veneno mismo, lo que puede generar complicaciones secundarias hasta en 30% de los casos (Jorge et al., 1990; Jorge et al., 1994; Costa et al., 2002; Otero et al., 2002). La microbiota oral y del veneno de las serpientes es variable entre regiones del mundo (Goldstein et al., 1981; Theakston et al., 1990; Blaylock, 2001; Fonseca et al., 2009; Shek et al., 2009; Dehghani et al., 2016). Marcadas diferencias en las poblaciones microbianas se presentan entre especies, organismos en hábitat natural o en cautiverio, estado de salud y tipo de alimentación (Jorge et al., 1990; Ortiz-Suárez et al., 2016). En Colombia, se conoce poco de la flora bacteriana asociada a la cavidad oral de la mayoría de especies de la familia Viperidae.

Investigaciones en pacientes con mordeduras de serpientes del género *Bothrops* reportaron bacilos Gram negativos de los géneros *Aeromonas*, *Escherichia*, *Proteus* y *Morganella* como la principal causa de complicaciones infecciosas (Otero, 2002). Así mismo, Blandón (2009) reportó los géneros *Peptostreptococcus* y *Clostridium* en la cavidad oral de *Porthidium nasutum*. El género *Porthidium* (Schlegel, 1841) está constituido de nueve especies (i.e., *P. arcossae*, *P. dunnii*, *P. hespere*, *P. lansbergii*, *P. nasutum*, *P. ophryomegas*, *P. porrasi*, *P. volcanicum* y *P. yucatanicum*) ampliamente distribuidas en América (Campbell y Lamar, 2004). En Colombia, encontramos a *P. nasutum* y *P. lansbergii*, responsables de aproximadamente 270 casos de envenenamiento al año (Instituto Nacional de Salud, 2015). *P. lansbergii*, coloquialmente denominada como ‘Patoco’, habita en los ambientes semiáridos y húmedos del valle del Magdalena medio y es la especie encontrada en el Departamento de Santander (Campbell y Lamar, 2004). *P. lansbergii* posee un veneno miotóxico y dermonecrótico que puede acarrear una infección bacteriana en el sitio de la mordedura (Jiménez-Charris, 2015). Actualmente, se desconocen las especies bacterianas que alberga la cavidad oral de *P. lansbergii*, dificultándose la prescripción de tratamientos antibacterianos preventivos, en caso de una mordedura. En esta Pasantía de Investigación se aislaron e identificaron bacterias cultivables de la cavidad oral de *P. lansbergii* mantenida en cautiverio. Estos aislados corresponden a una primera aproximación a los grupos bacterianos que residen en la cavidad oral de esta serpiente. Los grupos bacterianos fueron criopreservados en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología de la UIS (LBM), para futuros análisis.

1. Objetivos

1.1 General

Construir un cepario de bacterias cultivables aisladas de la cavidad oral de *Porthidium lansbergii*, mantenida en cautiverio.

1.2 Específicos

- Aislar en medios de cultivo específicos la mayor cantidad de cepas bacterianas de la cavidad oral de *P. lansbergii*.
- Caracterizar macro y microscópicamente las cepas aisladas.
- Identificar las cepas aisladas mediante análisis del gen *16S rRNA*.
- Determinar taxonómicamente las cepas integrando la información morfológica y molecular.
- Criopreservar las cepas bacterianas aisladas.

2. Competencias

- Emplea correctamente los protocolos de aislamiento de bacterias para la obtención de cultivos axénicos.
- Describe los caracteres taxonómicos (macro y microscópicos) relevantes de las cepas bacterianas aisladas.

- Implementa apropiadamente las técnicas en biología molecular necesarias la identificación taxonómica de los aislados bacterianos.
- Registra adecuadamente las cepas aisladas y criopreservadas en el cepario del LBM.
- Cumple con los horarios y las actividades programadas.

3. Materiales y métodos

3.1 Toma de muestras

Para este estudio se capturó una hembra juvenil de *P. lansbergii*, en la vereda ‘La Aguameluda Alta’ del municipio de Betulia, Santander (Figura 1). El ejemplar fue trasladado y mantenido en condiciones de cautiverio. Tras 10 días de la última comida (para evitar contaminaciones), se realizaron 3 frotis de la cavidad oral, utilizando hisopos estériles (Figura 2).

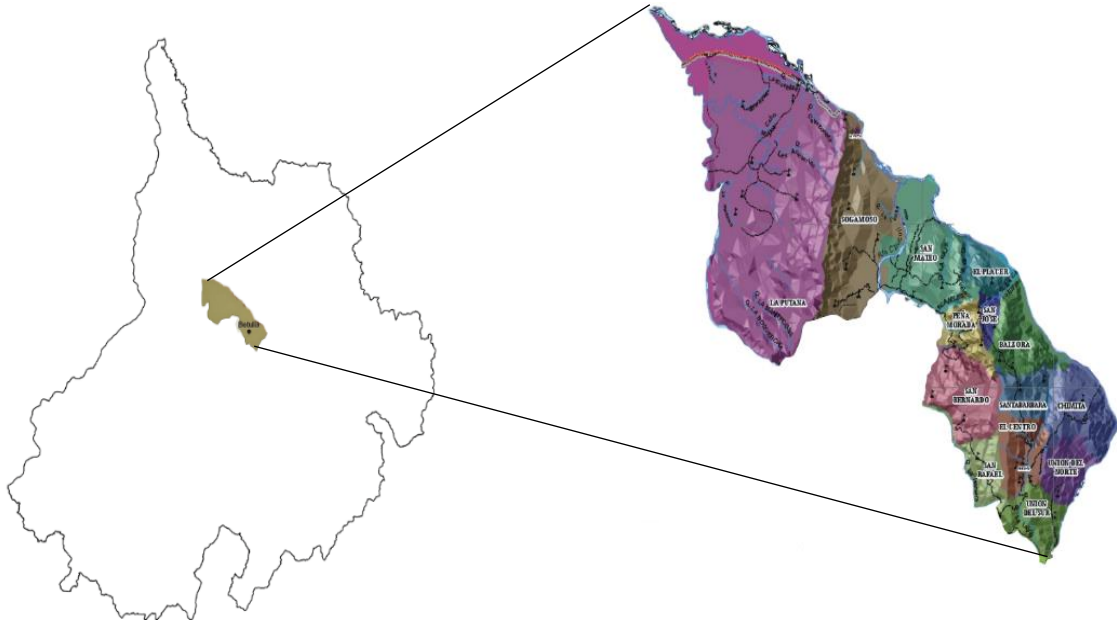


Figura 1. Mapa del Departamento de Santander. Se hace énfasis en la localización del Municipio de Betulia, sitio de muestreo (<https://atlasdesantander.blogspot.com.co>).



Figura 2. Frotis para la obtención de las muestras.

3.2. Aislamiento bacteriano en medios de cultivo.

Los frotis fueron inoculados en medio sólido Luria Bertani (LB) y agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI, por sus siglas en inglés), e incubados a 37 °C hasta observar crecimiento de morfotipos bacterianos (ca. 48 h).

3.3. Individualización de las cepas bacterianas

Colonias bacterianas de diferentes morfologías fueron recuperadas e individualizadas con asas estériles, en nuevos medios de cultivo. Los cultivos fueron incubados durante ca. 10 días para asegurar la presencia de un sólo morfotipo.

3.4. Caracterización morfológica de las cepas bacterianas

Durante 8 días se hizo seguimiento de los caracteres microbiológicos macro y microscópicos taxonómicamente determinantes. Estos caracteres fueron contrastados y consultados en el Manual de Bacteriología Sistemática Bergey's (Garrity, 2009). El seguimiento estuvo enfocado en los siguientes caracteres:

3.4.1. Caracterización macroscópica Los cultivos se documentaron fotográficamente. Para las colonias bacterianas, se registraron la forma, el color y el borde, así como la aparición de caracteres secundarios como producción de pigmentos o estructuras diferenciadas.

3.4.2. Caracterización microscópica. A nivel microscópico, se evaluó tamaño y forma de las células bacterianas, tipo de agrupación y formación de esporas. Para determinar estos caracteres se realizaron coloraciones de Gram a los 3 y 8 días de cultivo (Otero, 2011; Ramírez y Cocha, 2003) y tinción de Wirtz-Conklin con 0,1% verde de malaquita y 0,5% safranina (Schaeffer y Fulton, 1933).

3.5. Caracterización molecular de las cepas bacterianas

3.5.1. Extracción de DNA total bacteriano. Cada aislado fue transferido a medio líquido LB y BHI e incubado a 37 °C y 150 rpm, hasta alcanzar una $DO_{600nm} \approx 0.4 - 1$. Posteriormente, se obtuvieron extractos de DNA total mediante el protocolo de extracción de Ausubel et al. (2003). La calidad de los extractos fue verificada por medio de electroforesis en geles 0.8% agarosa coloreados con EZ-Vision®.

3.5.2. Amplificación por PCR del gen *16S rRNA*. La amplificación parcial del gen *16S rRNA* se realizó mediante PCR con énfasis en las regiones hipervariables (RHVs) V2 y V3 (Chakravorty et al., 2007). La amplificación de un fragmento de ~1465 pb se llevó a cabo con los oligonucleótidos universales para bacteria 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (GGTACCTTGTTACGACTTT) (Devereux y Wilkinson, 1995). En los casos para los que no se obtuvieran amplificadas con estos oligonucleótidos se utilizó el par Univ907R (CCGTCCATTCCTTTGAGTTT) (Muyzer et al., 1993) y EUB338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAGCAG) (Amann et al., 1990).

En ambos casos, la mezcla de reacción contenía ~20 ng de DNA total, 0.4 μ M de cada oligonucleótido, 1X buffer Taq con 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y 2.5-3 mM MgCl_2 , 0.4-0.6 mM dNTPs, y 1.25 – 1.5 U de Taq polimerasa (Thermo Scientific®), dependiendo del tamaño esperado del amplificado. Las reacciones de amplificación se realizaron con un termociclador Swift™ MaxPro (Esco). Los productos de la amplificación fueron coloreados con EZ-Vision® y visualizados en electroforesis sobre gel 1% agarosa.

3.5.3. Purificación de los amplificados PCR. Los amplificados obtenidos fueron purificados mediante membranas de afinidad GeneJet™ (Thermo Scientific©) y QIAquick® (Qiagen).

3.5.4. Secuenciación de los productos PCR Las secuencias de los amplificados fueron determinadas con un secuenciador automático ABI Prism® XL3730. Este servicio fue contratado con la empresa Macrogen (Corea del Sur).

3.6. Análisis bioinformático de las secuencias del gen *16S rRNA*

Todo el análisis *in silico* se realizó en el programa Geneious versión R8 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012). Previamente, se previno la presencia de quimeras, usando el programa de análisis en línea Bellerophon (Huber, et al., 2004).

3.6.1. Búsquedas de secuencias similares en bases de datos Las búsquedas y capturas de secuencias de referencia se realizaron mediante la aplicación BlastN, en las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y RDP-II (*Ribosomal Database Project*).

3.6.2. Análisis de distancia genética A partir de las secuencias de referencia encontradas en las bases de datos y las secuencias obtenidas, se determinaron distancias genéticas mediante alineamientos con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Posteriormente, se construyeron matrices y árboles de distancia por el método de Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987). Se usaron 1500 réplicas en *Bootstrap* para probar el soporte de las ramas.

3.7. Identificación taxonómica de los cultivos bacterianos

Las secuencias con distancia genética $\geq 95\%$ fueron asignadas a la categoría de género (Ludwig et al., 1998). Finalmente, se contrastaron los caracteres morfológicos en concordancia con el Manual de Bacteriología Sistemática Bergey's (Garrity, 2009), junto con los valores de distancia genética para una determinación taxonómica definitiva.

3.8. Criopreservación de los cultivos bacterianos

Cultivos axénicos en medio líquido fueron criopreservados con 20% glicerol, de acuerdo con el protocolo propuesto por Sambrook y Russell (2001). Las cepas fueron almacenadas por triplicado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular (LBM) de la Escuela de Biología UIS.

4. Resultados

4.1 Caracterización morfológica de las cepas bacterianas

A partir de los frotis de la cavidad oral se hicieron 3 siembras (2 en medio LB y 1 en medio BHI). Los morfotipos fueron separados paulatinamente en nuevo medio de cultivo (Figura 3). En total se recuperaron 20 cepas con morfotipos diferenciables. Las cepas fueron denominadas con el acrónimo P-lan (01-20), aludiendo a la especie de la que fueron aisladas. De éstas, 13 fueron aisladas en medio LB (P-lan 01 – P-lan 13) y 7 en medio BHI (P-lan 14 – P-lan 20). Los aislados presentaron diversas morfologías celulares, variando entre cocos, cocobacilos y bacilos. El aislado P-lan 02 terminó presentando las mismas características microbiológicas que la cepa P-lan 03. En consecuencia, para el aislado P-lan 02 sólo reportamos el seguimiento microbiológico.

A continuación, se presentan las características macro y microscópicas de cada cepa.

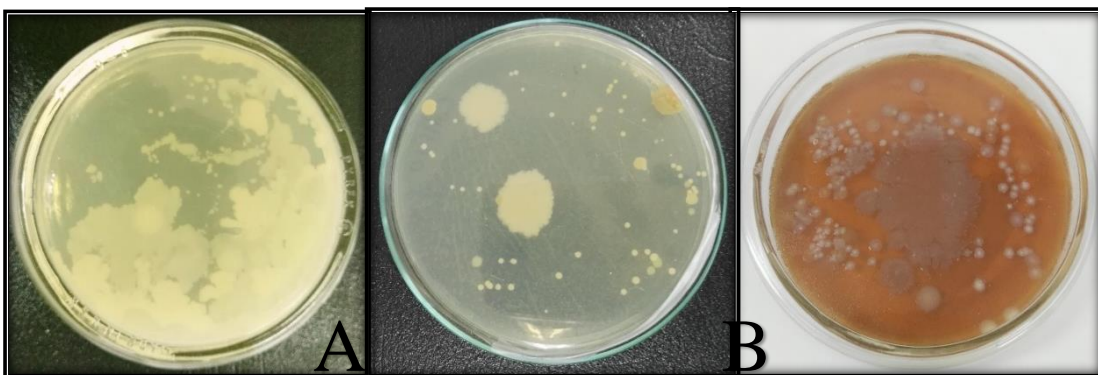
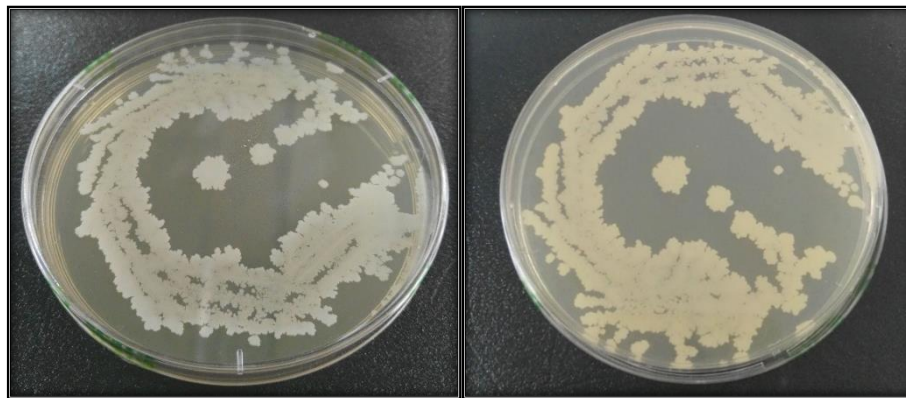


Figura 3. Cultivos iniciales a partir de los frotis de la cavidad oral de *P. lansbergii*. A y B corresponden a siembras sobre medio LB; C siembras sobre medio BHI.

4.1.1. Cepa P-lan 01

Descripción macroscópica:

Colonias de color blanco crema que se tornan blanco pálido en los bordes, de forma circular, superficie lisa, consistencia cremosa y margen irregular con proyecciones lobulares. El diámetro de las colonias varió entre 2 y 6 mm.



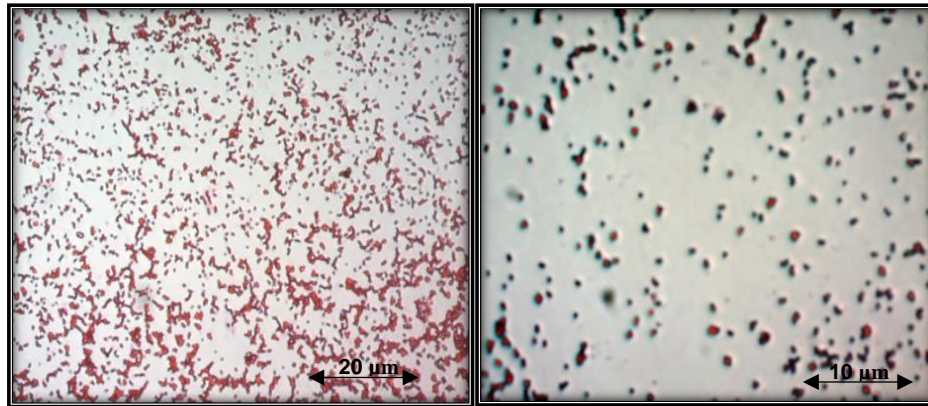
8d de cultivo vista inferior.

8d de cultivo vista superior.

Figura 4. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 01

Descripción microscópica:

Células Gram variables en forma de cocos, con un tamaño de entre 1 y 2 μm . Las células se encontraron solitarias o en agrupaciones pequeñas de máximo 2 cocos. No se observó desarrollo de ninguna estructura secundaria.



Tinción de Gram – 40x.

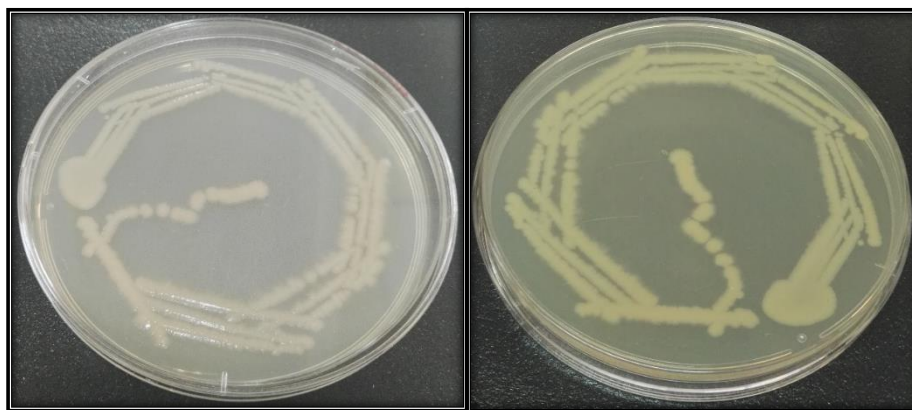
Tinción de Gram – 100x.

Figura 5. Morfología microscópica de la cepa P-lan 01

4.1.2. Cepa P-lan 02

Descripción macroscópica:

Colonias de color crema, de forma circular con una ligera elevación convexa hacia el centro, de margen rizado y consistencia cremosa. El diámetro de las colonias osciló entre los 3-4 mm.



8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 6. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 02

Descripción microscópica:

Células Gram negativas en forma de cocobacilos y tamaño menor a 1 μm . Se encontraron solitarias o en agrupaciones irregulares de 2-3 células en forma de cadena. No se observó desarrollo de ningún tipo de estructura secundaria.

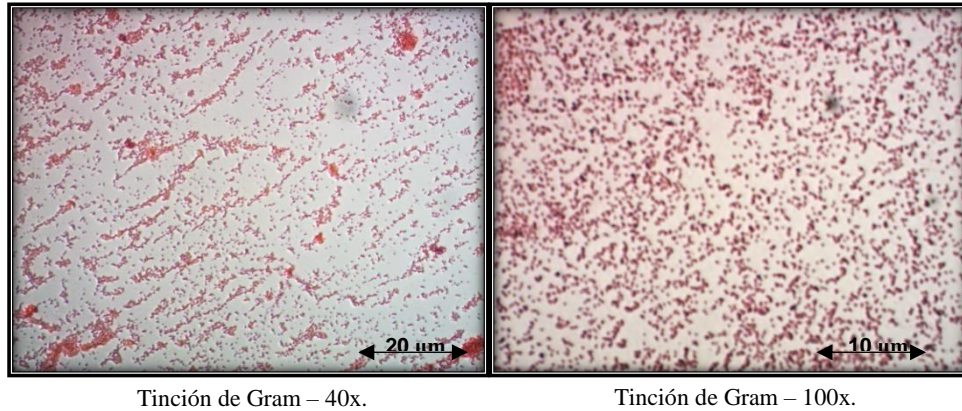
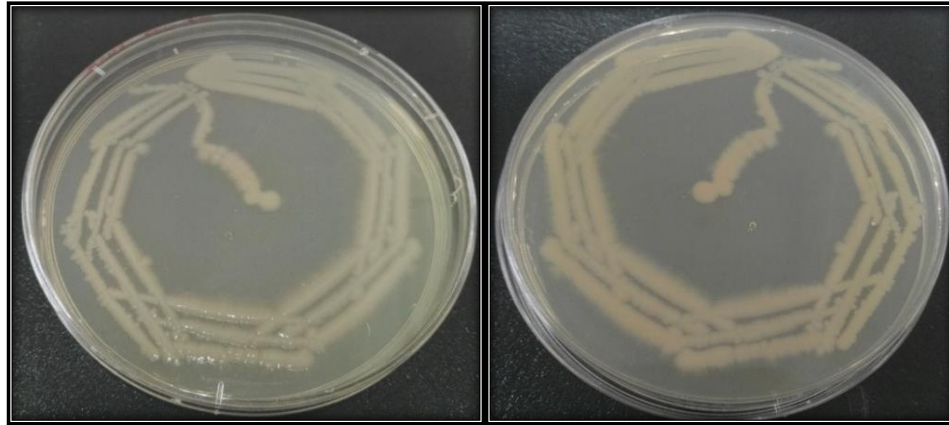


Figura 7. Morfología microscópica de la cepa P-lan 02

4.1.3. Cepa P-lan 03**Descripción macroscópica:**

Colonias de color crema, de forma circular con una ligera elevación convexa hacia el centro, de margen rizado y consistencia cremosa. El diámetro de las colonias varió entre los 3-4 mm.

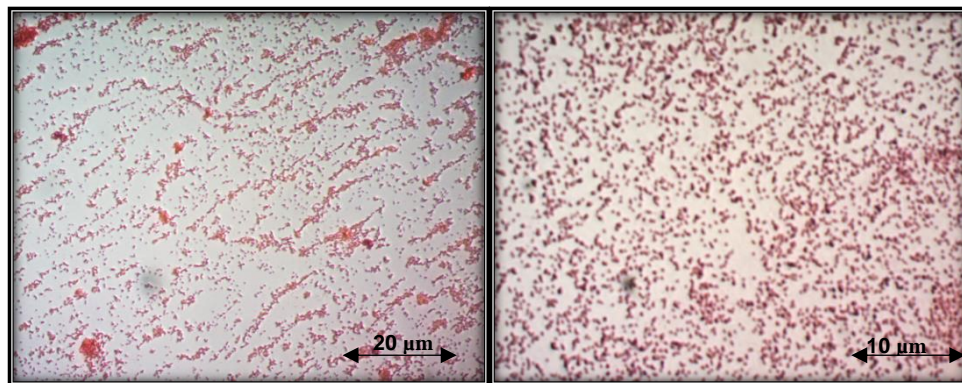


8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 8. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 03**Descripción microscópica:**

Células Gram negativas en forma de cocobacilos y tamaño menor a $1 \mu\text{m}$. Se encontraron solitarias o en agrupaciones irregulares de 2-3 células en forma de cadena. No se observó desarrollo de ningún tipo de estructura secundaria.



Tinción de Gram – 40x.

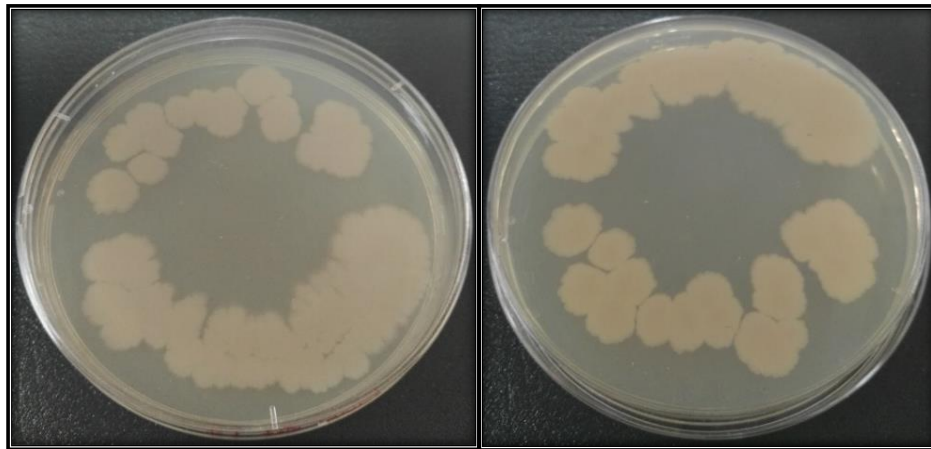
Tinción de Gram – 100x.

Figura 9. Morfología microscópica de la cepa P-lan 03

4.1.4. Cepa P-lan 04

Descripción macroscópica:

Colonias de color café claro, de forma circular, de borde rizado y superficie lisa, de consistencia pegajosa. El diámetro de las colonias fue de ca. 1 cm.



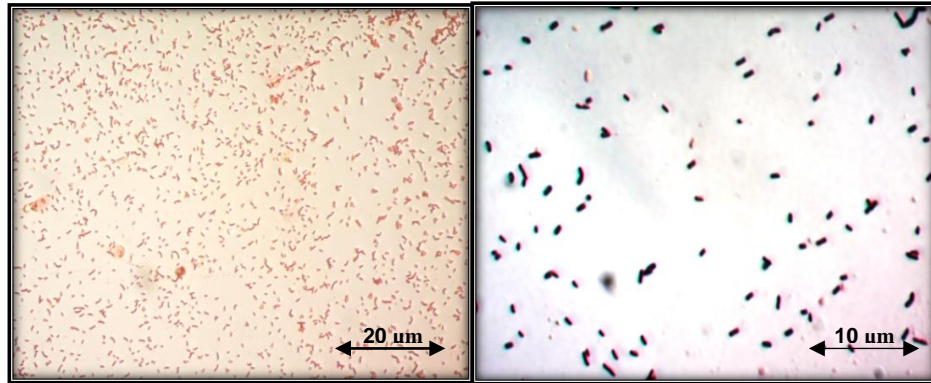
8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 10. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 04

Descripción microscópica:

Células en forma de bacilos, Gram positivas, de 2-3 μm . Se encontraron solitarias o en agrupaciones de dos células. No se encontraron estructuras secundarias.



Tinción de Gram – 40x.

Tinción de Gram – 100x.

Figura 11. Morfología microscópica de la cepa P-lan 04

4.1.5. Cepa P-lan 05

Descripción macroscópica:

Colonias grandes (0.8 – 1.5 cm) color crema, de forma circular y borde rizado. Presentó una superficie de apariencia áspera y reseca y una consistencia arenosa. A los 3 días de cultivo surgieron unas arrugas blancas, proyectadas desde el centro hacia los bordes de las colonias.



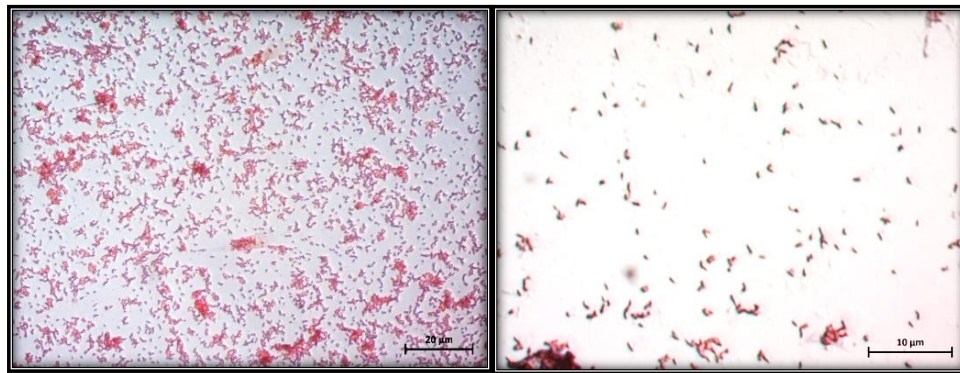
8d de cultivo vista superior

8d de cultivo vista inferior

Figura 12. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 05

Descripción microscópica:

Células cocobacilares, Gram negativas, de un tamaño no mayor a 3 μm y que no forman agrupaciones. No se encontraron estructuras secundarias.



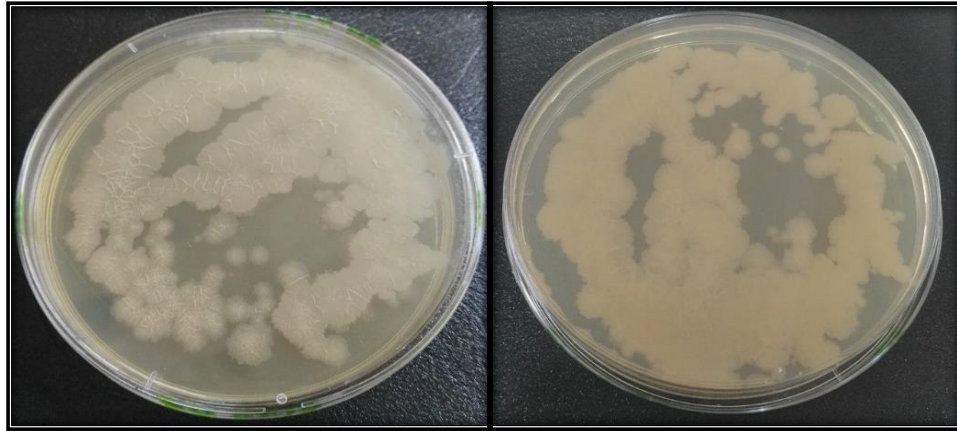
Tinción de Gram – 40x.

Tinción de Gram – 100x.

Figura 13. Morfología microscópica de la cepa P-lan 05

4.1.6. Cepa P-lan 06**Descripción macroscópica:**

Colonias de 0.3-1 cm, color crema, forma circular y borde rizado. Presentó una superficie de apariencia áspera y reseca y una consistencia arenosa. A los 3 días de cultivo surgieron unas arrugas blancas, proyectadas desde el centro hacia los bordes de las colonias.

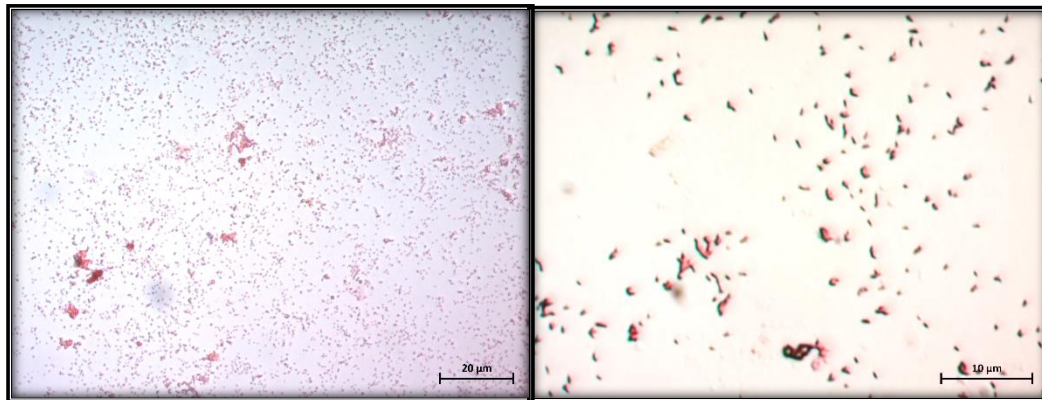


8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 14. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 06**Descripción microscópica:**

Células cocobacilares, Gram negativas, de un tamaño no mayor a $3 \mu\text{m}$ y que no forman agrupaciones. No se encontraron estructuras secundarias.



Tinción de Gram – 40x.

Tinción de Gram – 100x.

Figura 15. Morfología microscópica de la cepa P-lan 06

4.1.7. Cepa P-lan 07

Descripción macroscópica:

Colonias de color crema, de forma circular con una ligera elevación convexa hacia el centro, de margen rizado y consistencia cremosa. El tamaño de las colonias osciló entre los 4-5 mm.



8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 16. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 07

Descripción microscópica:

Células en forma de cocobacilos, Gram negativas y $<1 \mu\text{m}$ de diámetro. Pueden encontrarse solitarias o formando agrupaciones de 2 o más cocos. No se observaron estructuras secundarias.

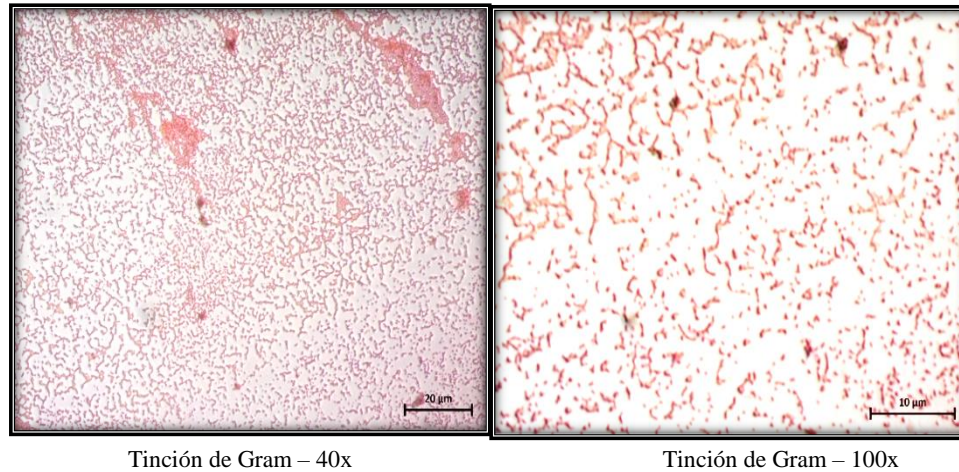


Figura 17. Morfología microscópica de la cepa P-lan 07

4.1.8. Cepa P-lan 08

Descripción macroscópica:

Colonias de color crema, de forma circular con una ligera elevación convexa hacia el centro, de margen rizado y consistencia cremosa. El tamaño de las colonias osciló entre los 4-8 mm. Además, esta cepa presentó desarrollo de prolongaciones lobulares en forma de abanico a los 8d de cultivo.

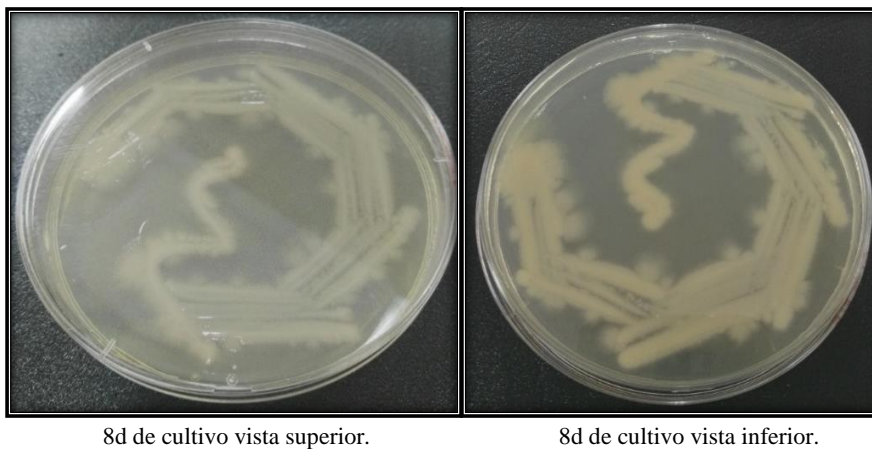
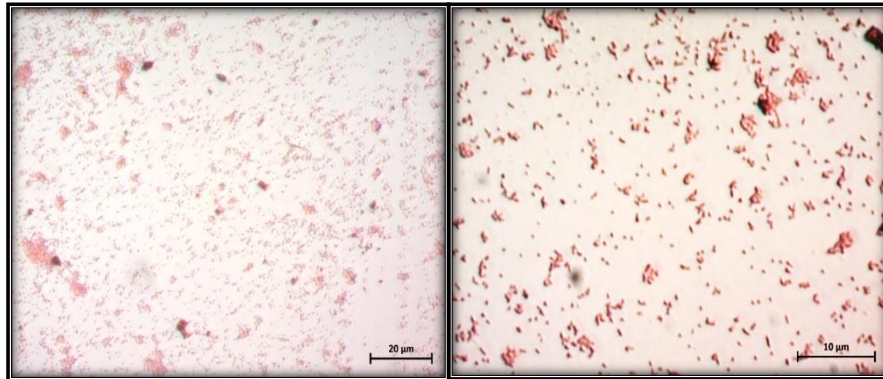


Figura 18. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 08

Descripción microscópica:

Células Gram negativas en forma de cocobacilos pequeños $<1 \mu\text{m}$ de diámetro, que pueden encontrarse solitarias o formando agrupaciones de 2-3 cocos. No se observaron estructuras secundarias.



Tinción de Gram – 40x

Tinción de Gram – 100x

Figura 19. Morfología microscópica de la cepa P-lan 08

4.1.9. Cepa P-lan 09**Descripción macroscópica:**

Colonias de color crema, de forma circular con una ligera elevación convexa hacia el centro, de margen liso y consistencia cremosa. El tamaño de las colonias oscila entre los 1-2 mm.

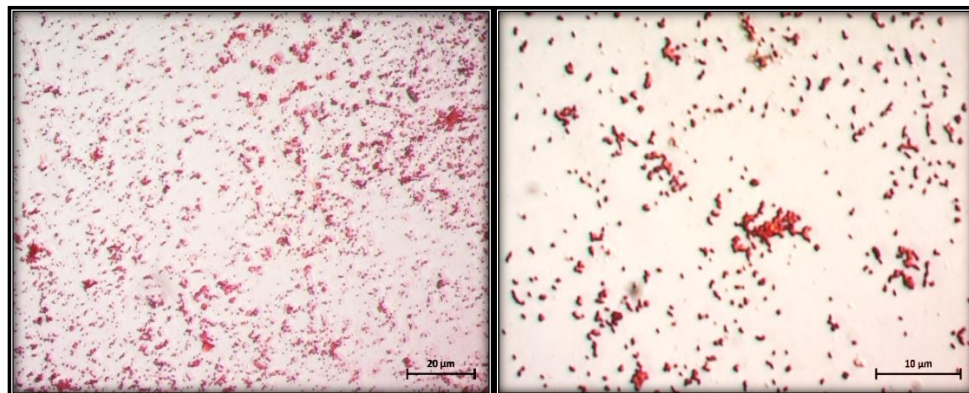


8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 20. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 09**Descripción microscópica:**

Células cocobacilares Gram negativas, de ca. 1 μm de diámetro, que no forman agrupaciones resaltables. No se observaron estructuras secundarias.



Tinción de Gram – 40x.

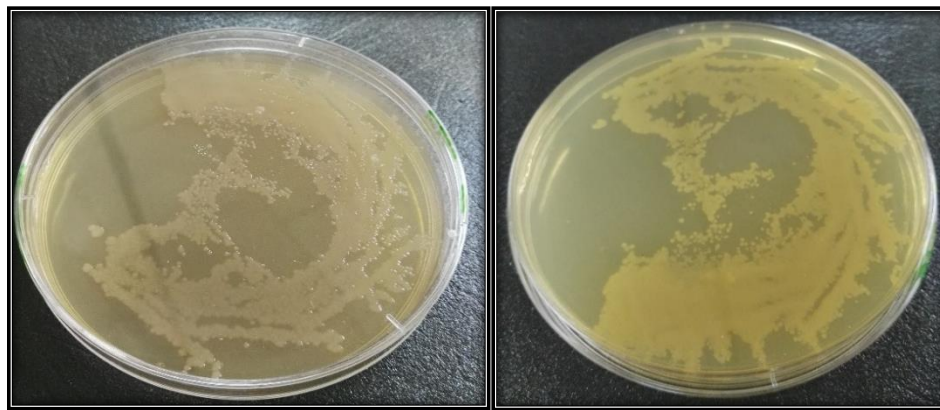
Tinción de Gram – 100x

Figura 21. Morfología microscópica de la cepa P-lan 09

4.1.10. Cepa P-lan 10

Descripción macroscópica:

Colonias circulares de color amarillo claro en el centro y un tono más oscuro en el borde; margen entero y liso, y superficie ligeramente convexa. Se observó la producción de pigmentos amarillentos que tiñen levemente el medio a los 8 días de cultivo. Las colonias presentaron un tamaño entre los 1-3 mm de diámetro.



8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 22. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 10

Descripción microscópica:

Células Gram negativas en forma de cocobacilos pequeños $<2 \mu\text{m}$, que se encuentran solitarias o en parejas. No se observaron estructuras secundarias.

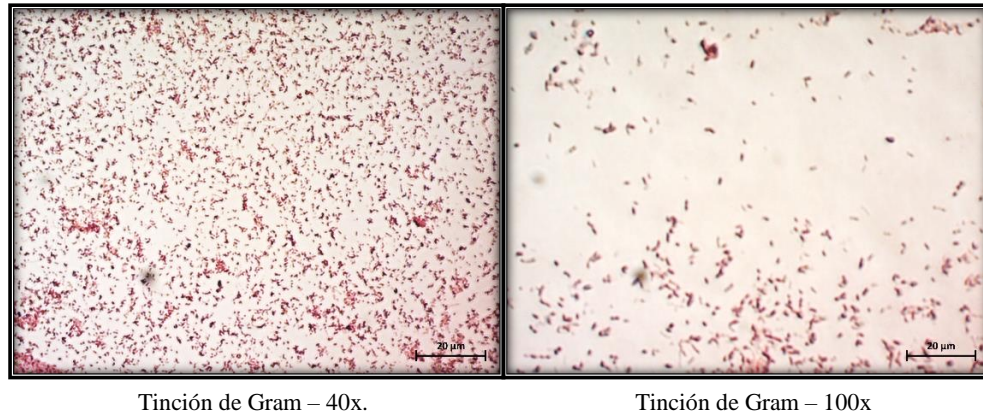


Figura 23. Morfología microscópica de la cepa P-lan 10

4.1.11. Cepa P-lan 11

Descripción macroscópica:

Colonias de color blanco cremoso, forma circular, margen difuso y superficie ligeramente convexa. El tamaño de las colonias varió entre 0.2-0.5 mm.

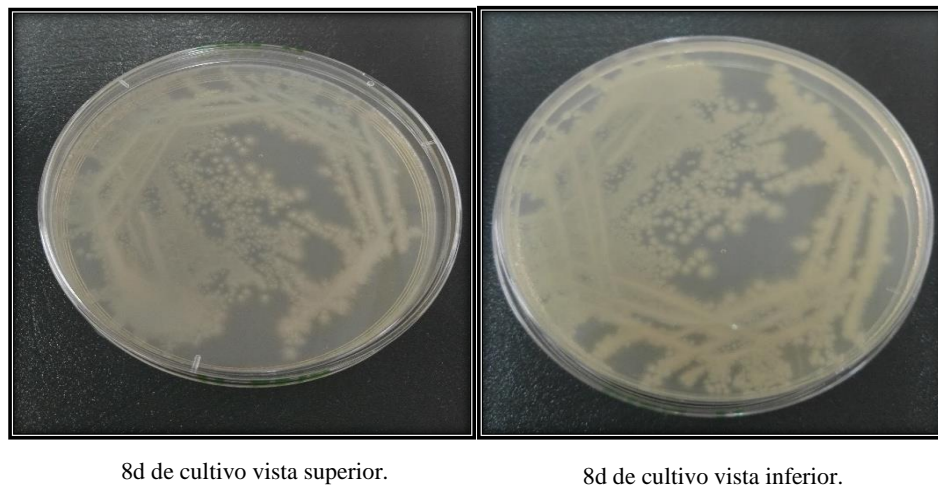


Figura 24. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 11

Descripción microscópica:

Células cocobacilares Gram negativas, de diámetro $<1 \mu\text{m}$. No forman agrupaciones resaltables, encontrándose como células solitarias en su mayoría. No se encontraron estructuras secundarias.

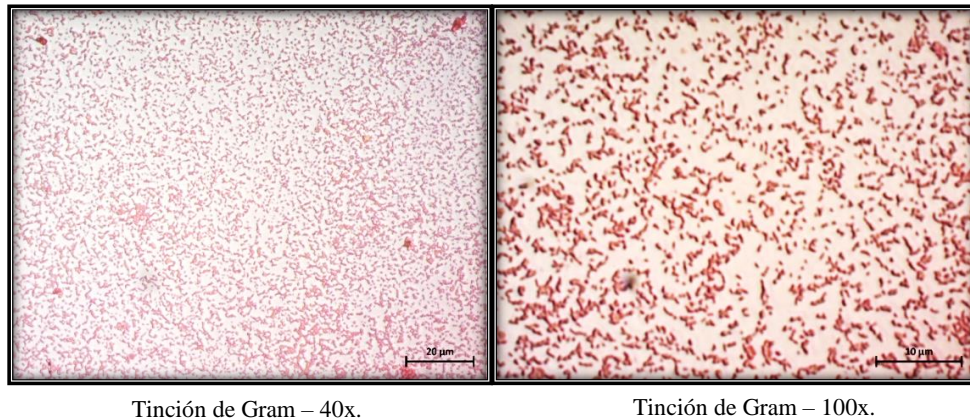


Figura 25. Morfología microscópica de la cepa P-lan 11

4.1.12. Cepa P-lan 12**Descripción macroscópica:**

Colonias de color amarillento, forma circular y borde liso. Su tasa de crecimiento fue bastante lenta y sólo hasta 8 días de cultivo se lograron diferenciar claramente sus caracteres. Las colonias poseen una textura cremosa, una forma levemente convexa y un tamaño pequeño (1-2 mm).

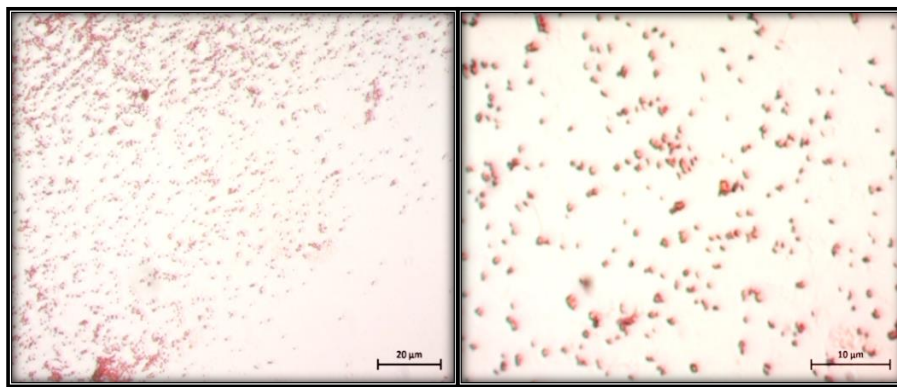


8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 26. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 12**Descripción microscópica:**

Células cocobacilares, Gram negativas, de tamaño entre 1-2 μm . Se encuentran solitarias o en agrupaciones de dos o hasta tres células. No se observaron estructuras secundarias.



Tinción de Gram – 40x.

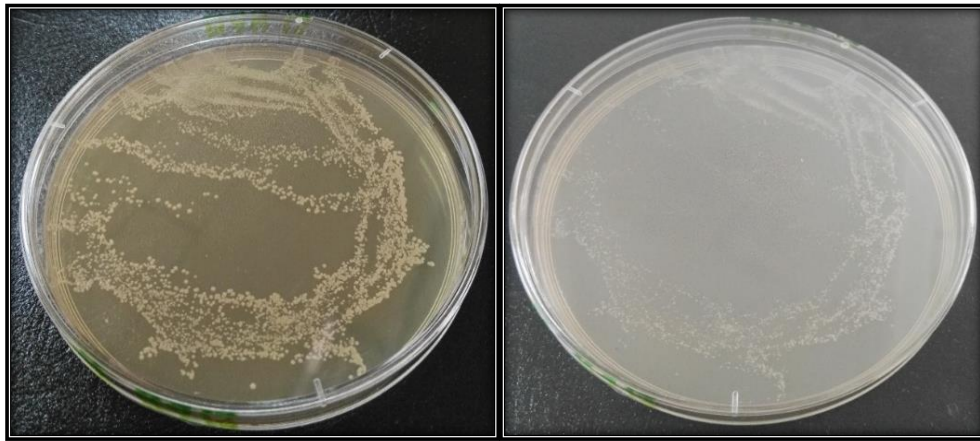
Tinción de Gram – 100x

Figura 27. Morfología microscópica de la cepa P-lan 12

4.1.13 Cepa P-lan 13

Descripción macroscópica:

Colonias pequeñas (0.5 mm) de color amarillento, forma circular y borde liso. Su tasa de crecimiento fue lenta y sólo hasta los ocho días de cultivo se lograron diferenciar claramente sus caracteres. Las colonias poseen una textura cremosa y una forma levemente convexa.



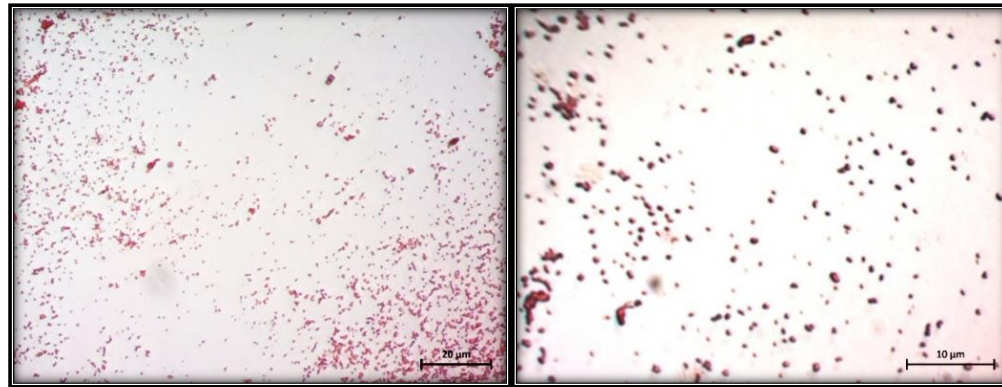
8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 28. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 13

Descripción microscópica:

Células cocobacilares, Gram negativas, de 1-2 μm , individuales o formando agrupaciones de 2 células. No se observaron estructuras secundarias.



Tinción de Gram – 40x.

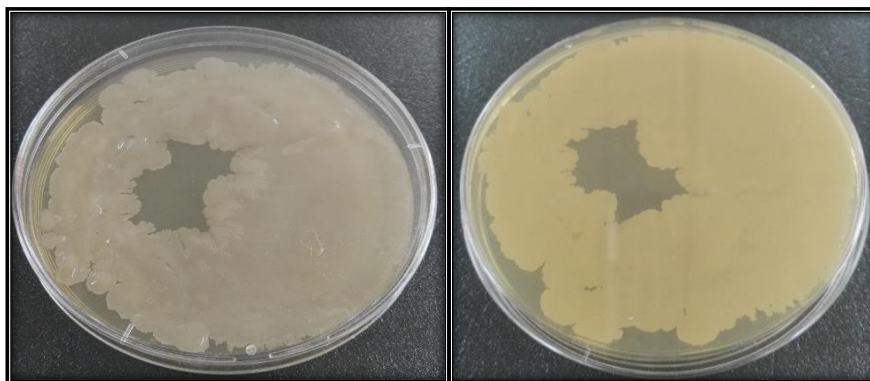
Tinción de Gram – 100x

Figura 29. Morfología microscópica de la cepa P-lan 13

4.1.14. Cepa P-lan 14

Descripción macroscópica:

Esta cepa presentó un crecimiento extendido sobre toda la caja. Nunca se observaron colonias individuales; el borde expuesto era rizado y presentó un color crema más claro que el observado hacia el interior. La contextura de esta cepa fue cremosa, con proyecciones convexas en su superficie.



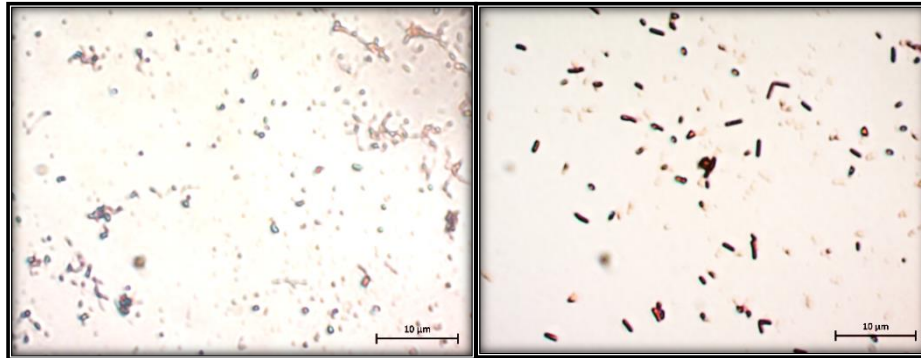
8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 30. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 14

Descripción microscópica:

Células bacilares Gram positivas, de 2-4 μm individuales o rara vez en parejas. Se observó el desarrollo de endosporas bacterianas tras 8 días de cultivo.



Tinción de Wirtz-Conklin – 100x.

Tinción de Gram – 100x

Figura 31. Morfología microscópica de la cepa P-lan 14

4.1.15. Cepa P-lan 15**Descripción macroscópica:**

Colonias de color blanco con una coloración beige en su zona central, de forma circular y borde liso y entero, de 2-4 mm. El borde se eleva un poco asemejando un pliegue a los 8d de cultivo.

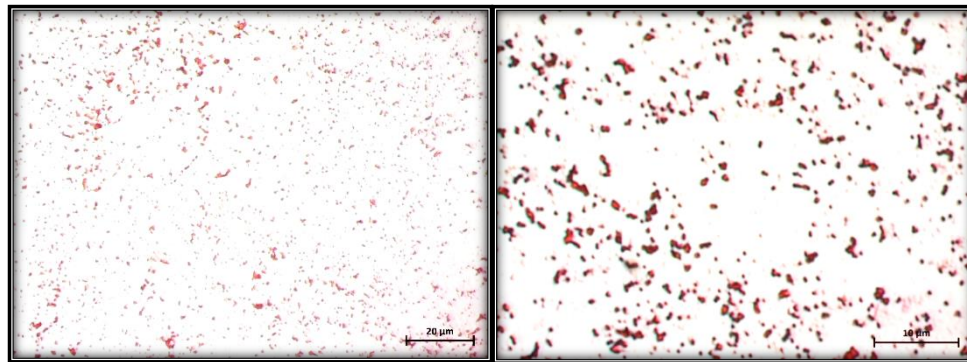


8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 32. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 15**Descripción microscópica:**

Células Gram variables, en forma de coco, de 1-2 μm . Se encontraron solitarias o en agrupaciones de hasta 4 células. No se observaron estructuras secundarias.



Tinción de Gram – 40x.

Tinción de Gram – 100x

Figura 33. Morfología microscópica de la cepa P-lan 15

4.1.16. Cepa P-lan 16

Descripción macroscópica:

Colonias de color amarillo con una coloración beige en su zona central, de forma circular, borde liso y entero, y de 2-6 mm. El borde se eleva un poco asemejando un pliegue a los 8d de cultivo.



8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 34. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 16

Descripción microscópica:

Células cocobacilares, Gram negativas, de 1-2 μm . Se encontraron solitarias o en agrupaciones de 2 células. No se observaron estructuras secundarias.

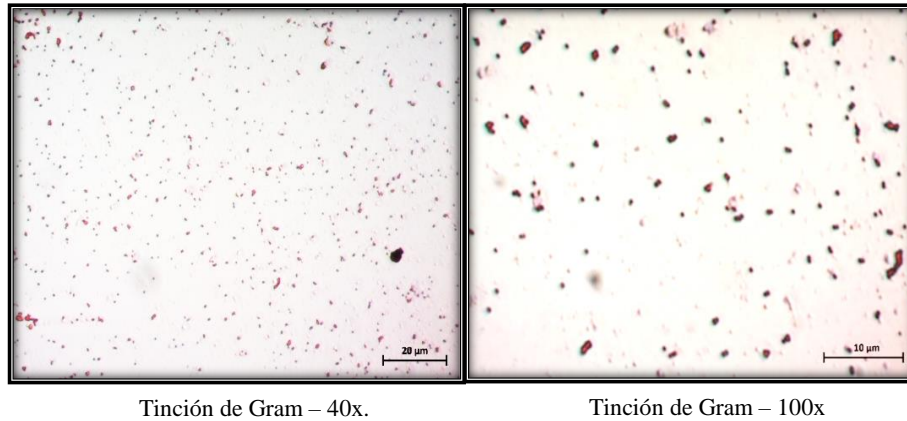


Figura 35. Morfología microscópica de la cepa P-lan 16

4.1.17. Cepa P-lan 17

Descripción macroscópica:

Colonias de color amarillento, de forma irregular, de borde liso y ondulado, de textura cremosa, y de 3-8 mm.



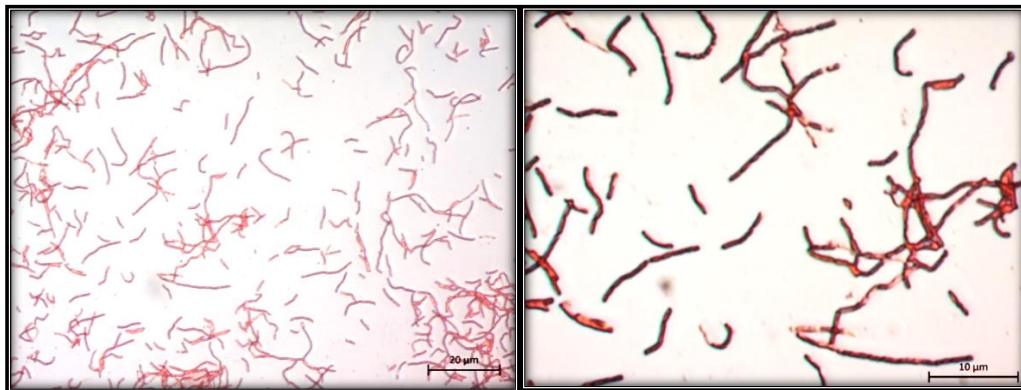
8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 36. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 17

Descripción microscópica:

Células Gram positivas, en forma de bacilos de 4-7 μm , solitarias o formando cadenas de 2-5 células. No se observaron estructuras secundarias.



Tinción de Gram – 40x.

Tinción de Gram – 100x

Figura 37. Morfología microscópica de la cepa P-lan 17

4.1.18. Cepa P-lan 18**Descripción macroscópica:**

Colonias de tamaño y forma variable, color café claro y borde liso entero. A los 3d de cultivo aparece una capa blancuzca en el centro de las colonias que se expande hacia el borde. Tras 8d la región blancuzca despliega gránulos de color amarillento que cubren toda la superficie de las colonias.

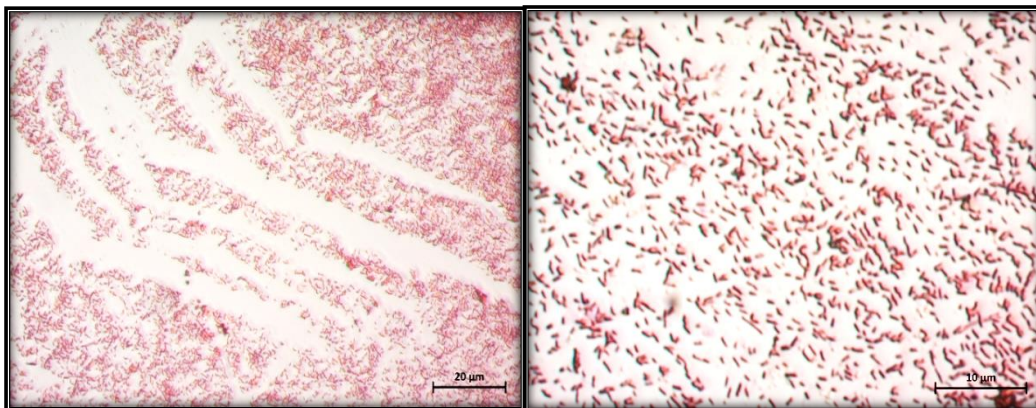


3d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista superior.

Figura 38. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 18**Descripción microscópica:**

Células Gram positivas en forma de bacilos de 2-3 μm , solitarias o formando agrupaciones pequeñas de pares de células. No se observaron estructuras secundarias.



Tinción de Gram – 40x.

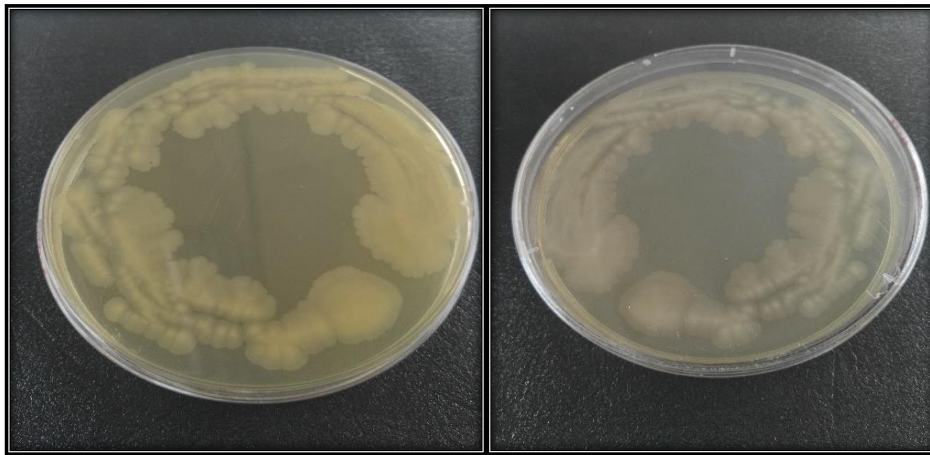
Tinción de Gram – 100x.

Figura 39. Morfología microscópica de la cepa P-lan 18

4.1.19. Cepa P-lan 19

Descripción macroscópica:

Colonias de color beige en su región central que se va haciendo casi translúcido conforme se acerca al margen; bordes ondulados, consistencia cremosa y de un tamaño de 2-4 mm.



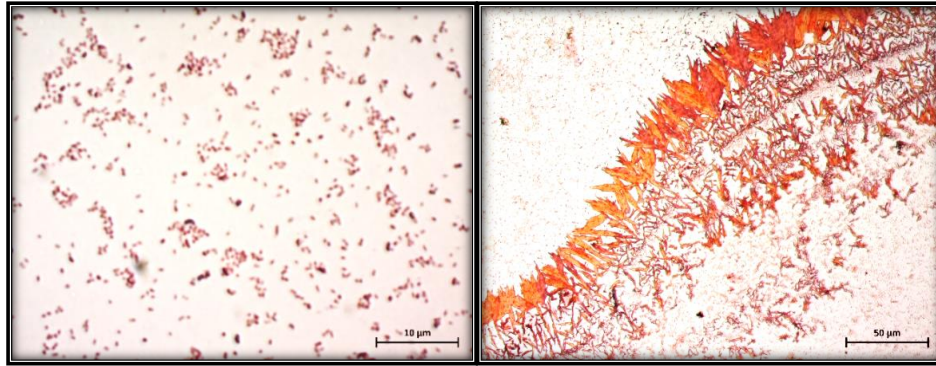
8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 40. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 19

Descripción microscópica:

Células Gram negativas, de forma cocobacilar, ca. 1 μm , solitarias o en agrupaciones de 2-3 células. Se observó también la presencia de estructuras similares a cristales que no se lograron identificar.



Tinción de Gram – 100x.

Tinción de Gram – 20x. Estructuras cristaliformes.

Figura 41. Morfología microscópica de la cepa P-lan 19

.1.20. Cepa P-lan 20

Descripción macroscópica:

Colonias de color blanco, de borde liso y continuo, 2-3 mm de diámetro, con una ligera elevación convexa y contextura pegajosa.



8d de cultivo vista superior.

8d de cultivo vista inferior.

Figura 42. Morfología macroscópica de la cepa P-lan 20

Descripción microscópica:

Células Gram negativas, de forma cocobacilar, ca. 1 μm , solitarias o en agrupaciones de 2-4 células. No se observaron agrupaciones secundarias.

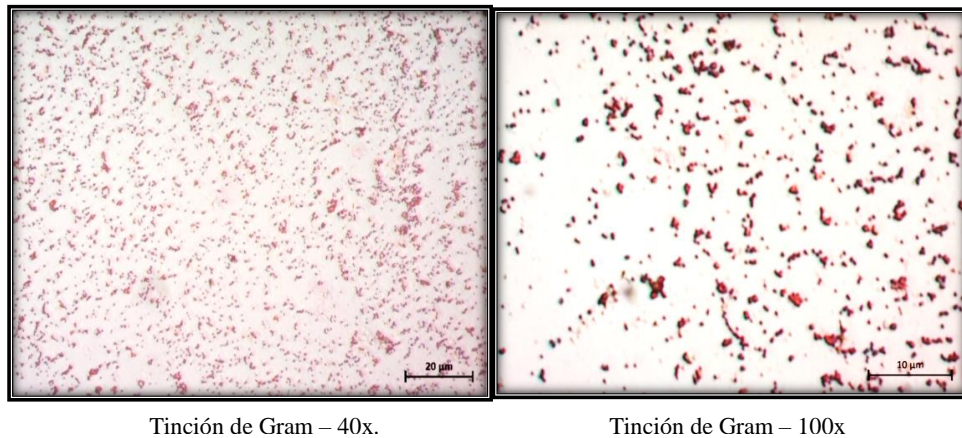


Figura 43. Morfología microscópica de la cepa P-lan 20

4.2 Caracterización molecular de las cepas aisladas.

Para complementar la identificación taxonómica, se recurrió al apoyo de evidencia molecular. De las cepas aisladas, se realizaron extracciones de DNA total con fragmentos >20 kb. El rendimiento osciló entre 4 y 13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Figura 4). El mejor rendimiento se obtuvo con la cepa P-lan 09, mientras que la cepa P-lan 05 presentó algo de degradación, probablemente debido a actividad nucleasa.

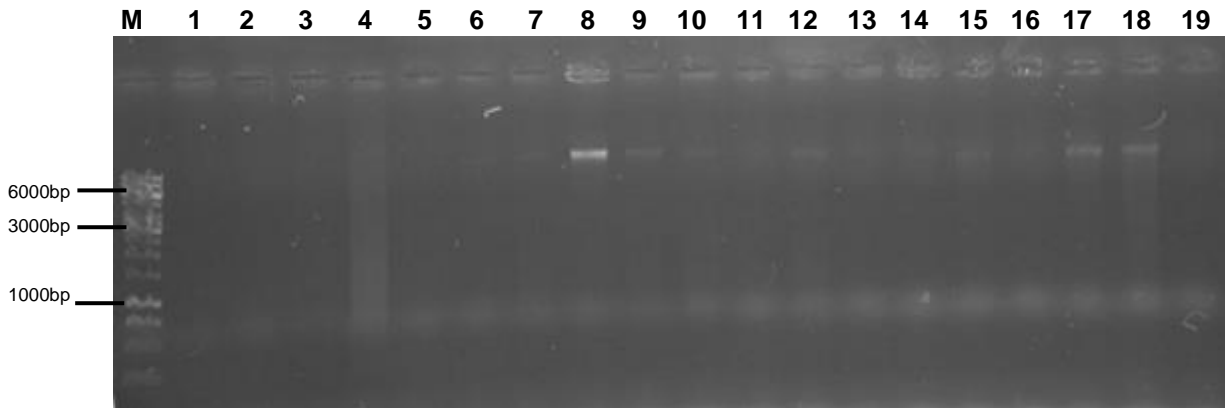


Figura 44. Gel 0.8% agarosa de extractos de DNA total de las cepas de aisladas.

En orden se observan: Marcador de peso molecular 1 Kb Thermo Scientific® [carril M]; extractos de los aislados P-lan 1 a P-lan 20 [carriles 1-19], excepto el aislado P-lan 02.

La calidad de los extractos permitió la amplificación parcial, mediante PCR, del gen *16S rRNA*, con énfasis en las RHVs V2 y V3 (Chakravorty et al., 2007). Un fragmento parcial del gen *16S rRNA* de ca. 1465 pb (Figura 5) se amplificó con el par de oligonucleótidos universales para Bacteria, 27F y 1492R (Devereux y Wilkinson, 1995). En los casos en que no se obtuvieron amplificadas, se utilizó el par de oligonucleótidos Univ907R (Muyzer et al., 1993) y EUB338F (Amann et al., 1990), obteniéndose como producto un fragmento de 570 pb, que cubija las regiones V3 a V5 (Figura 6).

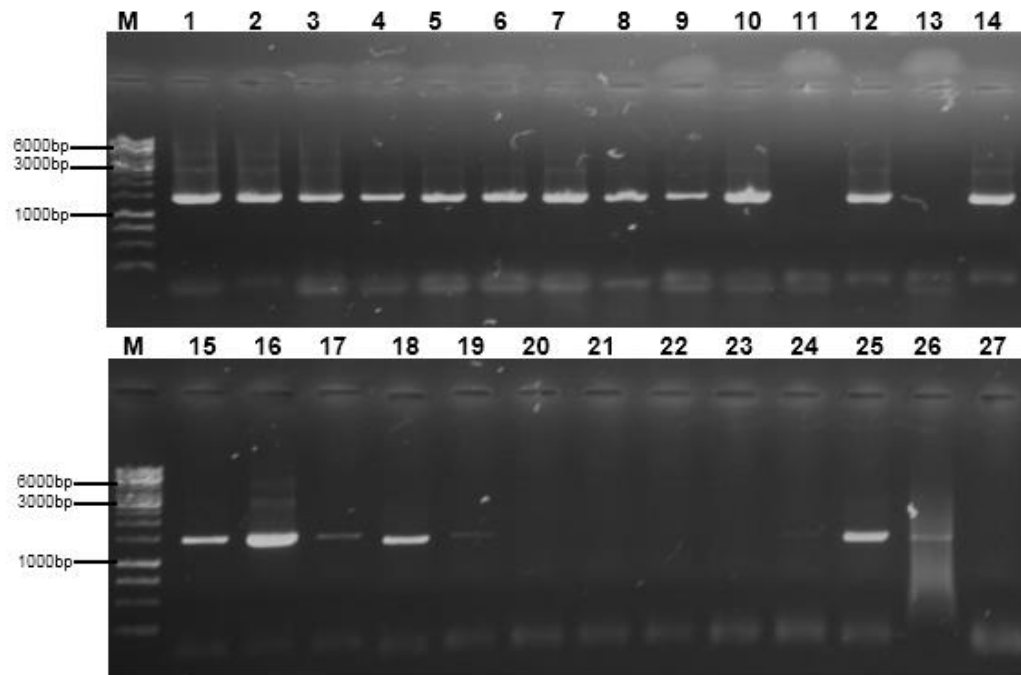


Figura 45. Geles 1% agarosa de amplificados parciales del gen *16S rRNA* con los oligonucleótidos 27F-1492R.

En orden se observa: Marcador de peso molecular, 1 Kb (Thermo Scientific®) [carril M]. Amplificados de los aislados P-lan 01 [carril 1], P-lan 03-11 [carriles 2-10], P-lan 12 [carril 12], P-lan 13 [carril 14], P-lan 14-18 [carriles 15-19], P-lan 19-20 [carriles 24-25], control positivo (Actinobacteria) [carril 26] y control negativo [carril 27].

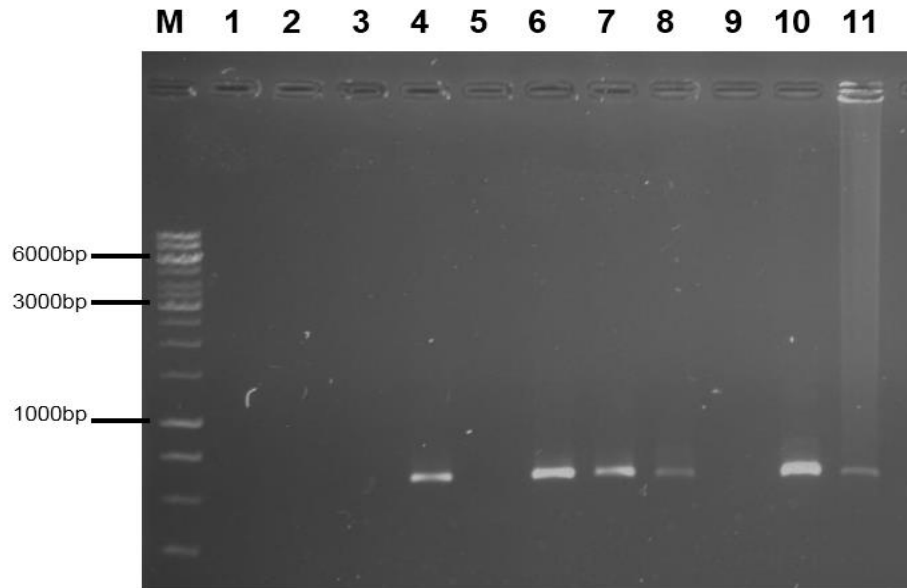


Figura 46. Gel 1% agarosa de amplificados parciales del gen *16S rRNA* con los oligonucleótidos EUB338F-UniV907R.

En orden se observa: Marcador de peso molecular, 1 Kb (Thermo Scientific®) [carril M]. Amplificados de los aislados P-lan 11 [carril 4], P-lan 14-16 [carriles 6-8], P-lan 17 [carril 10].

Como puede apreciarse en la Figura 5, la mayoría de los amplificados no contienen bandas únicas, sino que están contaminados con productos no específicos. A pesar de múltiples ensayos por eliminar estos fragmentos, todos los intentos resultaron infructuosos. Por esta razón, se procedió a purificar las bandas de DNA del tamaño correcto directamente de geles de agarosa, utilizando columnas de afinidad GeneJet™ (Thermo Scientific®), con buenos resultados (Figura 7). Este procedimiento cobijó los productos PCR de los aislados P-lan 01, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 12, 13 y 15, amplificados con los oligonucleótidos 27F-1492R. Los amplificados de los aislados restantes (P-lan 09, 14, 16, 17, 18, 19 y 20) no presentaron bandas inespecíficas, por lo que se procedió a secuenciación directa. Finalmente, los productos se enviaron a MacroGen® para su secuenciación, desde ambos extremos.

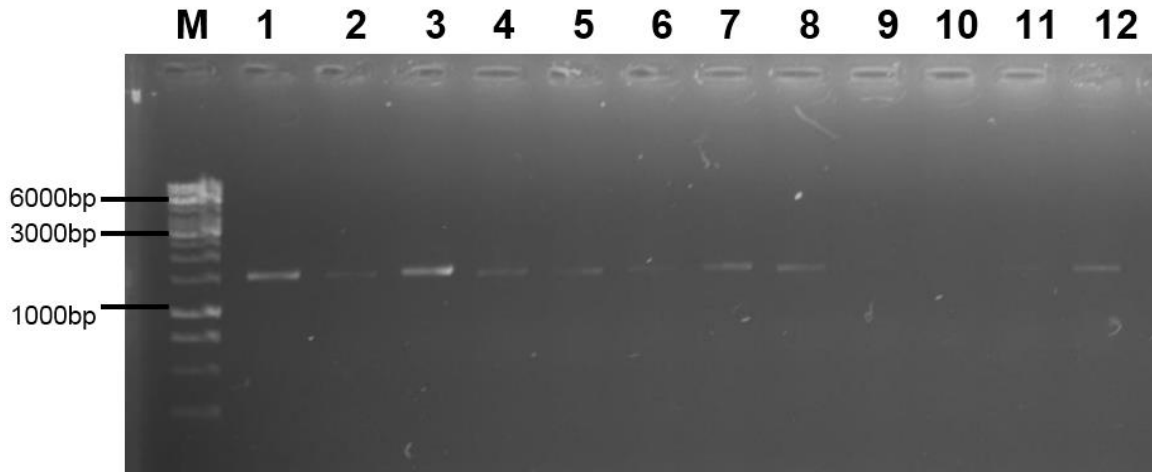


Figura 47. Gel 1% agarosa de los productos PCR purificados con columna de afinidad GeneJet™ (Thermo Scientific®).

Marcador de peso molecular, 1 Kb Thermo Scientific® [carril M]. Amplificados de los aislados P-lan 01, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 12, 13 y 15 [carriles 1-12].

Previamente al análisis *in silico*, las secuencias recibidas fueron verificadas con el software Bellerophon (Huber, et al., 2004), para evitar la presencia de anomalías de tipo quimera. Posteriormente, se realizaron búsquedas en bases de datos mediante la aplicación BlastN, las cuales permitieron identificar los géneros más cercanos, de acuerdo con los criterios establecidos en la metodología. La mayoría de las secuencias obtenidas presentaron una identidad $\geq 96\%$ (Tabla 1). No obstante, en el caso de las cepas P-lan 04, 06 y 18, no fue posible obtener secuencias de buena calidad debido a que fueron ilegibles (P-lan 04), de muy corta longitud (P-lan 06) o presentaron identidades $\leq 90\%$ con varios grupos taxonómicos (P-lan 18), lo que dificultó la identificación de estas especies.

En base a las secuencias que más identidad presentaron mediante BlastN, se capturaron 40 secuencias de referencia de Genbank. Con las secuencias de referencia y las obtenidas para cada aislado se construyeron matrices y árboles de distancia para su asignación taxonómica.

Tabla 1.

Secuencias de referencia del gen 16S rRNA con mayor similitud para cada aislado.

Aislado	Género más cercano (Número de acceso)	Identidad
P-lan 01	<i>Staphylococcus</i> (MF429262.1)	98%
P-lan 02	No determinada	N/A
P-lan 03	<i>Bordetella</i> (NR_145922.1)	99%
P-lan 04	No determinada	N/A
P-lan 05	<i>Enterobacter</i> (CP019889.1)	100%
P-lan 06	No determinada	N/A
P-lan 07	<i>Bordetella</i> (HQ018806.1)	100%
P-lan 08	<i>Bordetella</i> (HQ018806.1)	99%
P-lan 09	<i>Enterobacter</i> (KY568714.1)	96%
P-lan 10	<i>Stenotrophomonas</i> (MF801342.1)	98%
P-lan 11	<i>Bordetella</i> (MF377978.1)	99%
P-lan 12	<i>Enterobacter</i> (MF768986.1)	99%
P-lan 13	<i>Enterobacter</i> (MF687205.1)	100%
P-lan 14	<i>Bacillus</i> (KX681463.1)	100%
P-lan 15	<i>Staphylococcus</i> (KY653102.1)	100%
P-lan 16	<i>Enterobacter</i> (CP022532.1)	100%
P-lan 17	<i>Bacillus</i> (KX218318.1)	99%
P-lan 18	No determinada	N/A
P-lan 19	<i>Enterobacter</i> (MF804995.1)	99%
P-lan 20	<i>Enterobacter</i> (MF101702.1)	99%

A pesar de la calidad de los amplificadores observados en las electroforesis, la porción legible de las secuencias se vio reducida a longitudes finales de entre 130 y 1000 posiciones. En consecuencia, los análisis de distancia genética se limitaron a las regiones hipervariables legibles para cada cepa (Tabla 2). A pesar de esta reducción en longitud, las secuencias permitieron

discriminar efectivamente hasta nivel de género la mayoría de los aislados, debido al poder discriminatorio de las RHVs recuperadas (Chakravorty et al., 2007).

Tabla 2.

Regiones hipervariables recuperadas de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislados P-lan.

<i>Aislado</i>	Región(es) hipervariables recuperadas
<i>P-lan 01</i>	V3, V4 y V5
<i>P-lan 02</i>	N/A
<i>P-lan 03</i>	V2 y V8
<i>P-lan 04</i>	N/A
<i>P-lan 05</i>	V3 - V5
<i>P-lan 06</i>	N/A
<i>P-lan 07</i>	V2 y V8
<i>P-lan 08</i>	V2 y V8
<i>P-lan 09</i>	V2 y V8
<i>P-lan 10</i>	V2 y V8
<i>P-lan 11</i>	V2 y V8
<i>P-lan 12</i>	V8
<i>P-lan 13</i>	V3 - V5
<i>P-lan 14</i>	V3 y V4
<i>P-lan 15</i>	V3 - V6
<i>P-lan 16</i>	V3 - V6
<i>P-lan 17</i>	V3 - V5
<i>P-lan 18</i>	N/A
<i>P-lan 19</i>	V7 y V8
<i>P-lan 20</i>	V8

Se realizaron análisis de distancia genética, organizando las secuencias obtenidas en tres grupos (A, B y C), de acuerdo con las RHVs recuperadas. La secuencia del aislado P-lan 19 no se ajustó a ningún grupo, por lo que fue analizada por separado (Figura 8).

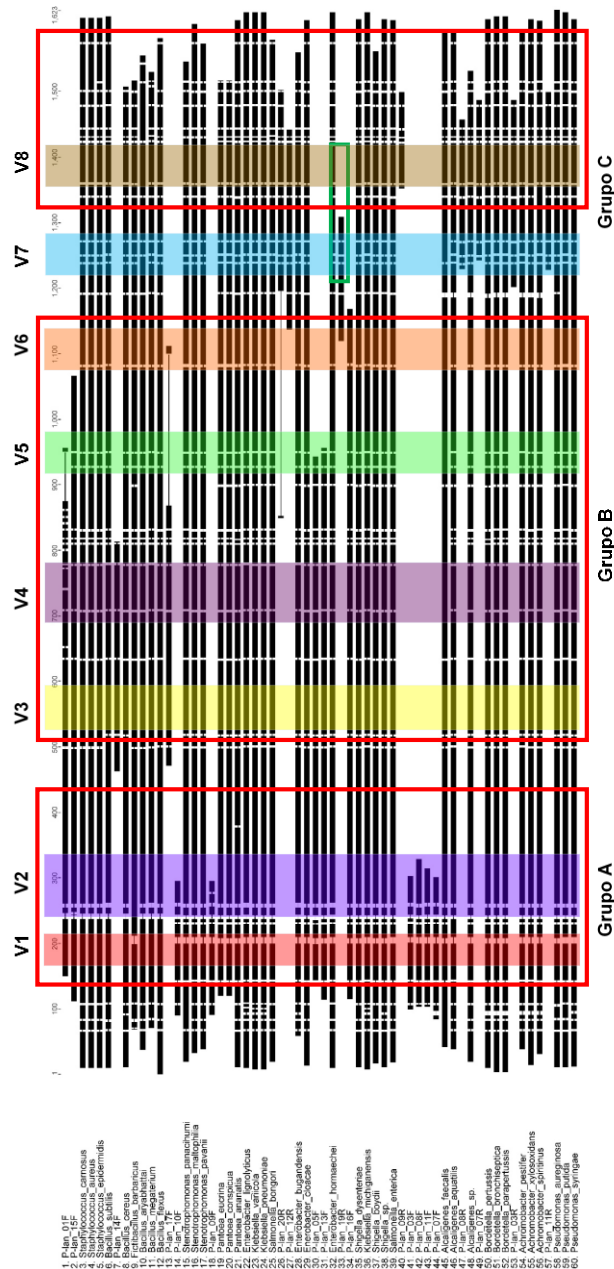


Figura 48. Alineamiento en Geneious R8 de las secuencias obtenidas de los aislados P-lan con las secuencias de referencia.

En colores se resaltan las regiones hipervariables del gen *rRNA 16S* [V1 – V8]. Los recuadros rojos representan los tres grupos de secuencias seleccionados según las regiones recuperadas. Grupo A: Secuencias P-lan 03, 07, 08, 09, 10 y 11; Grupo B: Secuencias P-lan 01, 05, 13, 14, 15, 16 y 17; Grupo C: Secuencias P-lan 12 y 20. El recuadro verde muestra en detalle la secuencia del aislado P-lan 19.

Se construyeron cuatro árboles de distancia utilizando las secuencias obtenidas y las de referencia. De acuerdo con los valores de identidad, las secuencias se agruparon en las familias Alcaligenaceae, verde; Bacillaceae, naranja; Enterobacteriaceae, rojo; Staphylococcaceae, azul; y Xanthomonadaceae, amarillo (Figuras 9 a 12).

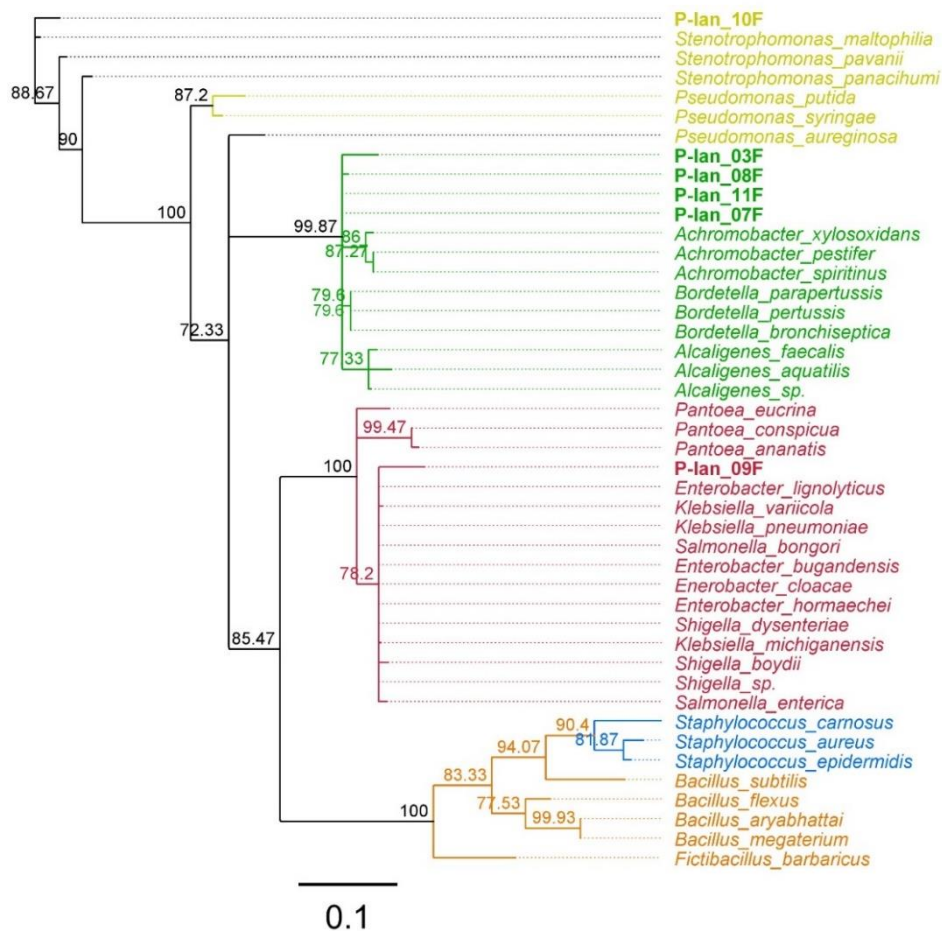


Figura 49. Árbol de distancia del grupo de secuencias “A”, inferido a partir de secuencias del gen *16S rRNA* mediante el método de Neighbor-Joining.

El árbol consenso *bootstrap* inferido de 1500 réplicas es tomado para representar las relaciones entre los taxa analizados. El árbol es dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades de las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo Tamura-Nei (TN93) y están en unidades de número de sustituciones por sitio.

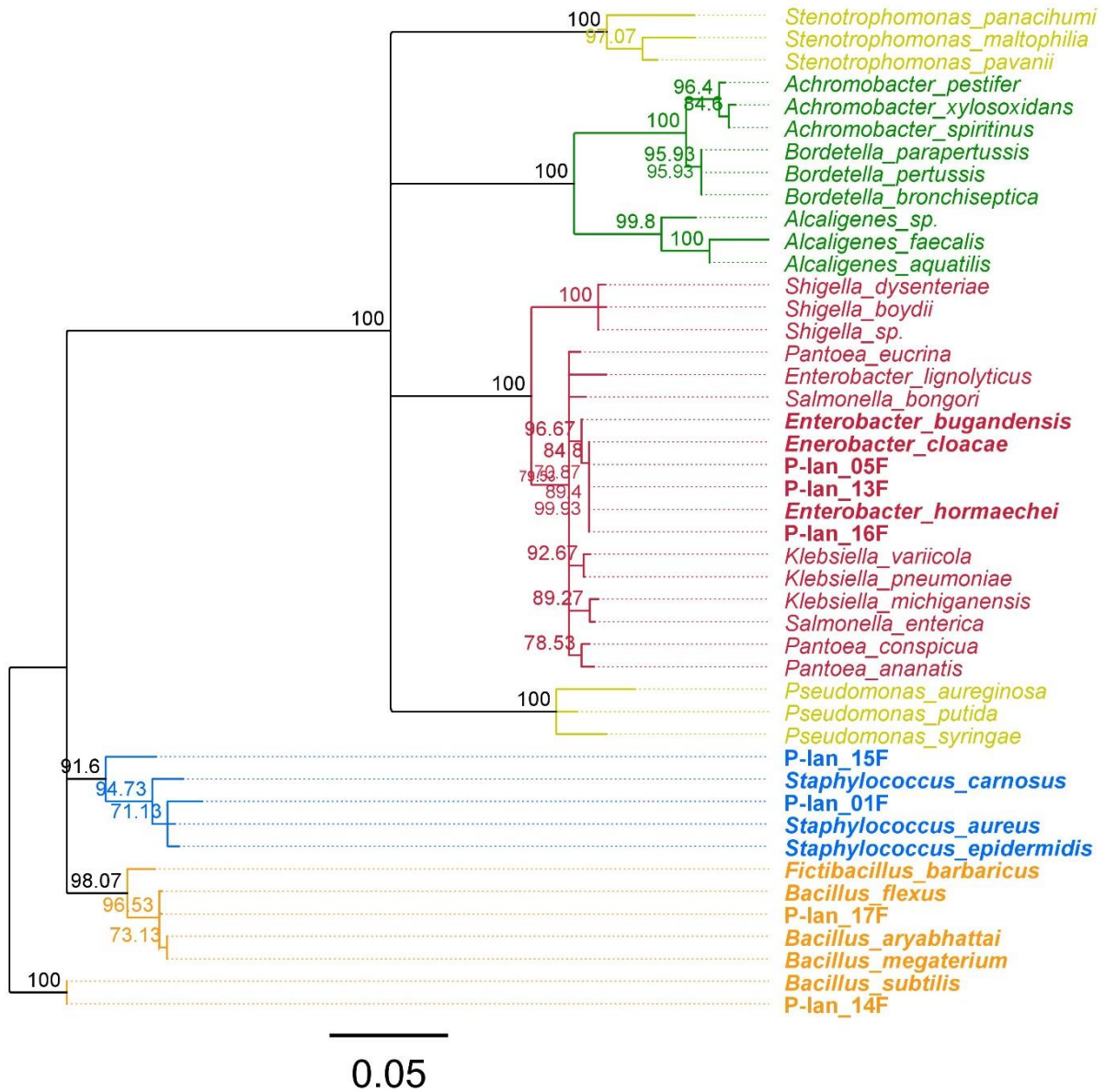


Figura 50. Árbol de distancia del grupo de secuencias "B" inferido a partir de secuencias del gen *16S rRNA* mediante el método de Neighbor-Joining.

El número de réplicas y demás parámetros fueron los mismos de la Figura 9.

Como se observa en la Figura 9, las cepas P-lan 03, 07, 08 y 11 se agruparon dentro la familia *Alcaligenaceae*, relacionadas con los géneros *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Bordetella*. Por otro

lado, las cepas P-lan 05, 09, 12, 13, 16, y 20 se relacionan con el género *Enterobacter* dentro de la familia Enterobacteriaceae (Figuras 9, 10, 11 y 12).

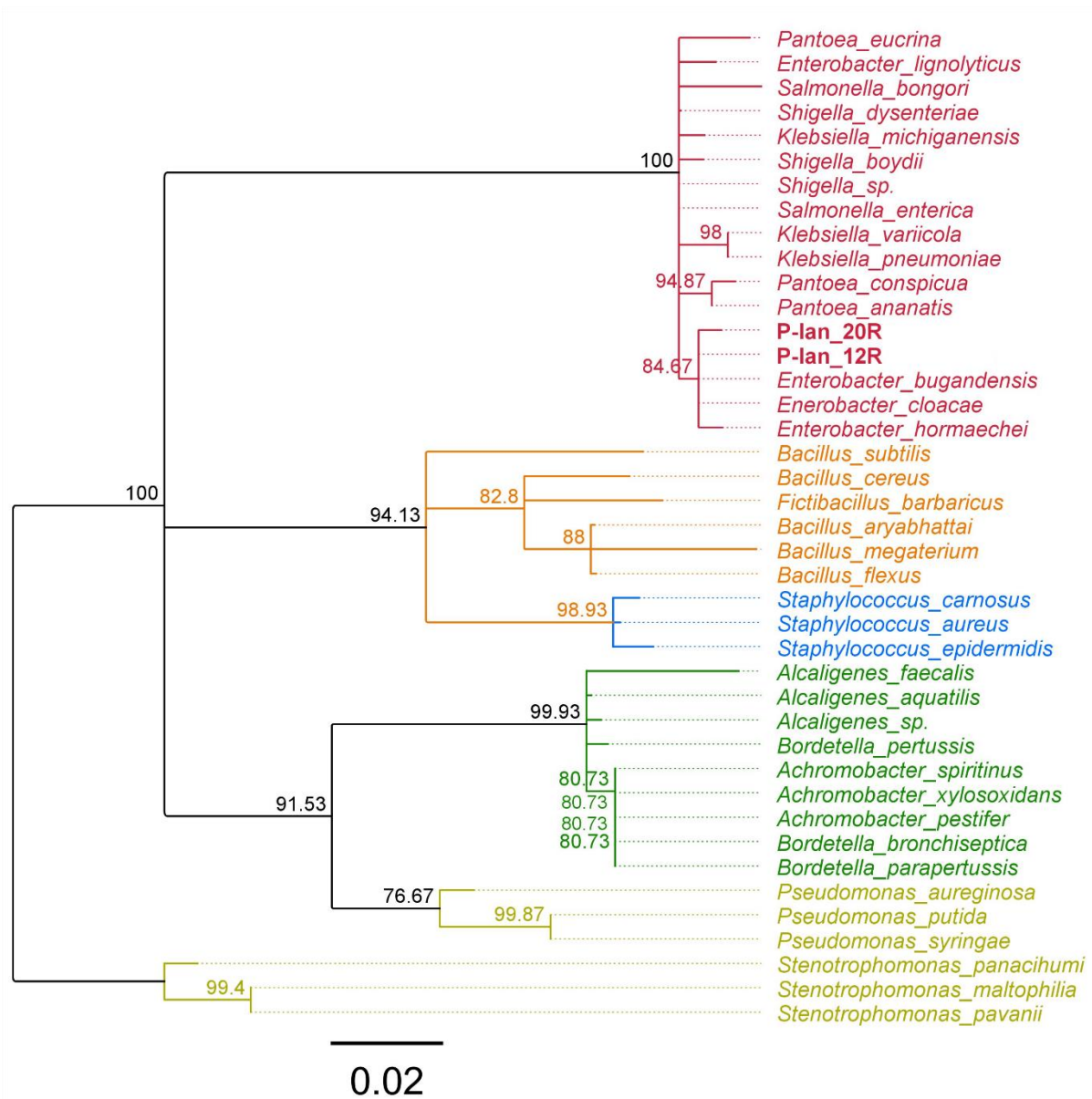


Figura 51. Árbol de distancia del grupo de secuencias “C” inferido a partir de secuencias del gen *16S rRNA* mediante el método de Neighbor-Joining.

El número de réplicas y demás parámetros fueron los mismos de la Figura 9. En colores se detallan las familias encontradas.

Las cepas restantes se agruparon con los géneros *Bacillus* (P-lan 14 y 17, Figura 10), *Staphylococcus* (P-lan 01 y 15, Figura 10), *Stenotrophomonas* (P-lan 10, Figura 9).

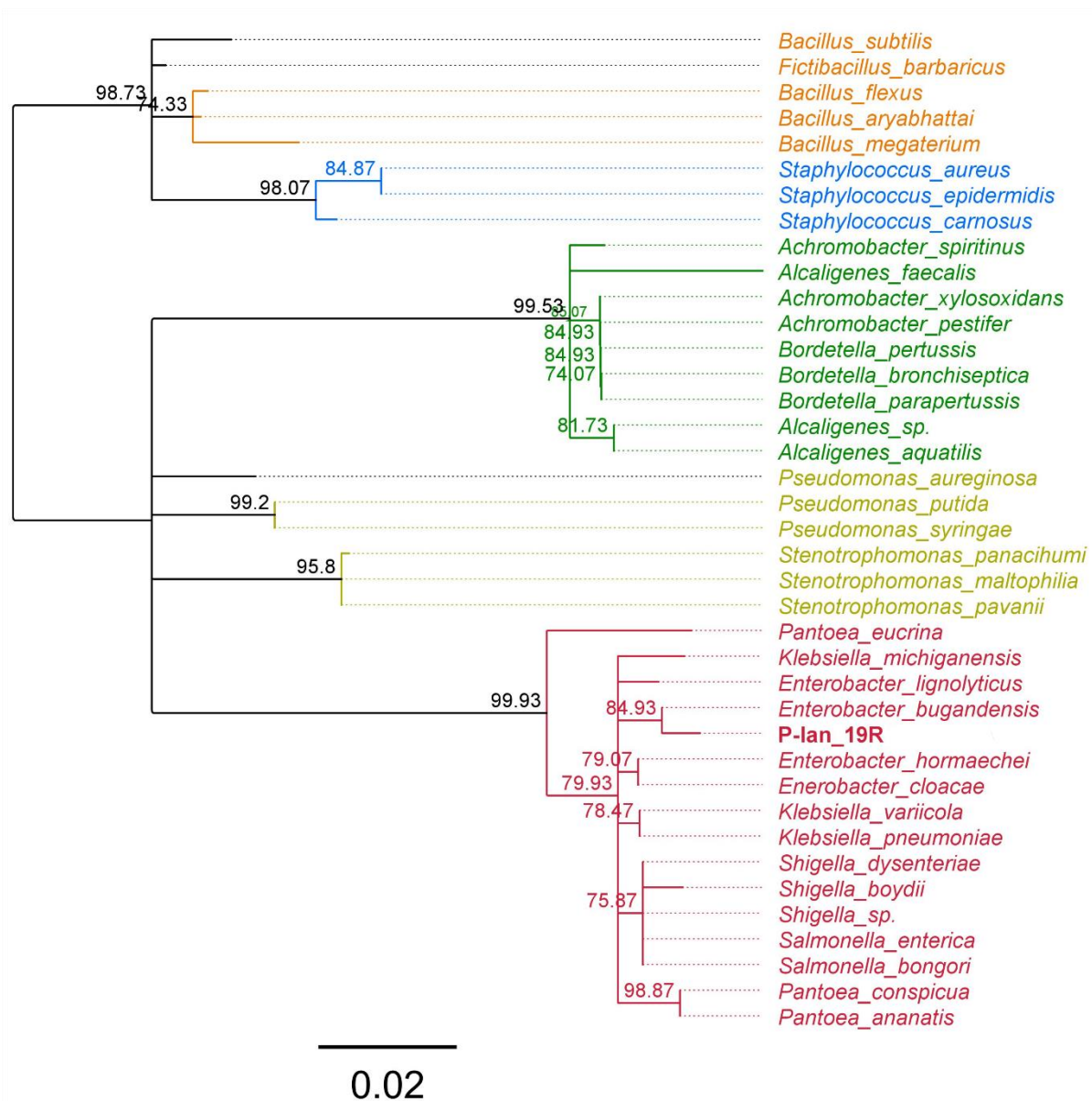


Figura 52. Árbol de distancia para la secuencia de la cepa P-lan 19 inferido a partir de secuencias del gen 16S rRNA mediante el método de Neighbor-Joining.

El número de réplicas y demás parámetros fueron los mismos de la Figura 9.

Finalmente, se procedió a la determinación taxonómica definitiva de las 20 cepas, por medio de un análisis de las evidencias obtenidas de la caracterización morfológica y la evidencia molecular revelada por el análisis del gen *16S rRNA* (Tabla 3). En el caso de los caracteres morfológicos, se verificó que se ajustaran a lo descrito para cada género (Garrity, 2009) determinado mediante el acercamiento molecular.

Tabla 3.

Determinación taxonómica definitiva de las cepas aisladas de la cavidad oral de P. lansbergii con base en la caracterización morfológica y el análisis molecular del gen 16S rRNA.

Aislado	Determinación taxonómica	Evidencia	
		Morfológica	Molecular
P-lan 01	<i>Staphylococcus</i> sp.	FC, GV, AG2	DG 98%
P-lan 02	<i>Bordetella</i> sp.	FCB, GN, AG3	N/D
P-lan 03	<i>Bordetella</i> sp.	FCB, GN, AG3	DG 99%
P-lan 04	ND	FB, GP, GR2	N/D
P-lan 05	<i>Enterobacter</i> sp.	FCB, GN	DG 100%
P-lan 06	<i>Enterobacter</i> sp.	FCB, GN	N/D
P-lan 07	<i>Bordetella</i> sp.	FCB, TG, AG3	DG 100%
P-lan 08	<i>Bordetella</i> sp.	FCB, GN, AG3	DG 99%
P-lan 09	<i>Enterobacter</i> sp.	FCB, GN, AG2	DG 96%
P-lan 10	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FB, GN, AG2, PA	DG 98%
P-lan 11	<i>Bordetella</i> sp.	FCB, GN, AG3	DG 99%
P-lan 12	<i>Enterobacter</i> sp.	FCB, GN, AG2	DG 99%
P-lan 13	<i>Enterobacter</i> sp.	FCB, GN, AG2	DG 100%
P-lan 14	<i>Bacillus</i> sp.	FB, GP, AG2, E	DG 100%
P-lan 15	<i>Staphylococcus</i> sp.	FC, GV, AG3	DG 100%
P-lan 16	<i>Enterobacter</i> sp.	FCB, GN, AG2	DG 100%
P-lan 17	<i>Bacillus</i> sp.	FB, GP, AG5	DG 99%
P-lan 18	ND	FB, GP, AG2	N/D

Aislado	Determinación taxonómica	Evidencia	
		Morfológica	Molecular
P-lan 19	<i>Enterobacter</i> sp.	FCB, GN, AG3	DG 99%
P-lan 20	<i>Enterobacter</i> sp.	FCB, GN, AG4	DG 99%

Abreviaturas: FC: Forma de cocos; FB: Forma de bacilos; FCB: Forma cocobacilar; GP: Gram positivo, GN: Gram negativo y GV: Gram variable; AG#: Agrupaciones de # células; E: Formación de Esporas; PA: Pigmentos amarillos; DG: Valores de distancia genética del gen *16S rRNA* con cepas de referencia. N/D: No determinada.

Como conclusión, con este estudio se logró la identificación al nivel de género del 90% de las cepas aisladas de la cavidad oral de *P. lansbergii*. Además, se determinó la presencia de 2 filos, 3 clases, 4 órdenes, 5 familias y 5 géneros (*Bordetella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, y *Staphylococcus*), siendo *Enterobacter* el más representativo con 8 aislados (40%) (Figura 13).

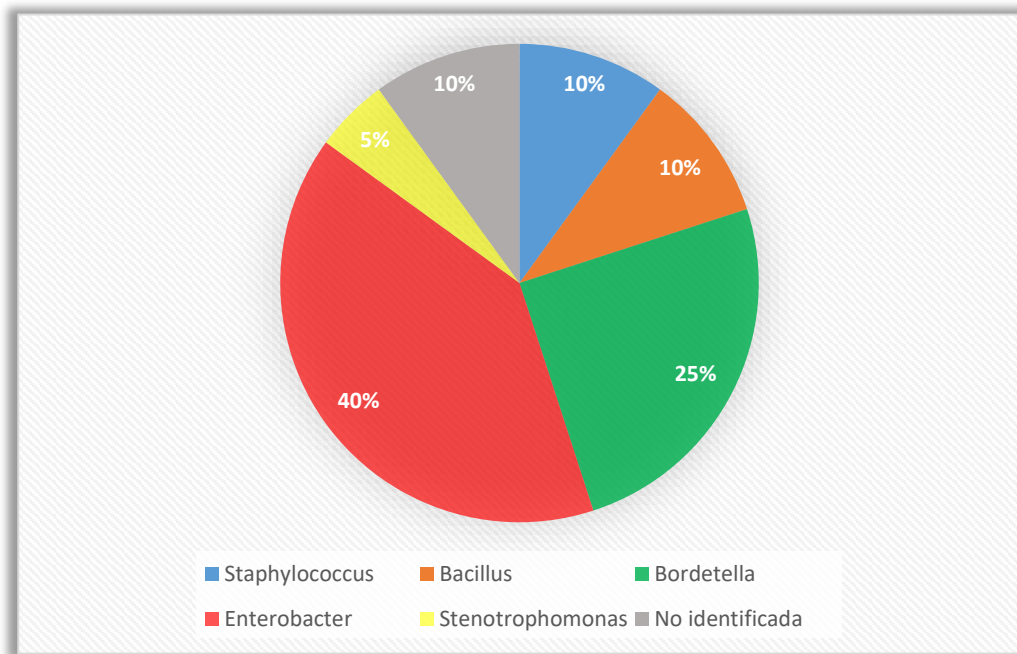


Figura 53. Distribución de géneros identificados con base en el gen *16S rRNA* y características morfológicas.

4.3 Criopreservación de cultivos.

Las 20 cepas aisladas fueron criopreservadas en 20% glicerol de acuerdo con el protocolo propuesto por Sambrook y Russell (2001). Las cepas fueron almacenadas a -70 °C por triplicado, en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología-UIS. Éstas quedaron a disposición del macroproyecto para darle continuidad en trabajos posteriores.

5. Discusión

En este estudio se obtuvieron 20 aislados bacterianos de la cavidad oral de un espécimen de *P. lansbergii*. La caracterización de los aislados y los análisis de la evidencia molecular permitieron la determinación de 18 de ellos a los géneros *Staphylococcus* sp. (2), *Bordetella* sp. (5), *Enterobacter* sp. (8), *Stenotrophomonas* sp. (1) y *Bacillus* sp. (2)

Durante la ejecución, hubo dificultades para la obtención de secuencias de calidad que permitieran la asignación de los aislados a un género taxonómico. La progresiva degradación de los extractos de DNA genómico pudo haber incidido en la optimización de las condiciones de amplificación. Este fenómeno se ha reportado en trabajos previos con enterobacterias, en los que DNAsas termoestables endógenas degradan los amplificadores, aún a 4 °C en la nevera (Nakajima et al. 1994). Debido a la interferencia que ocasionaban las bandas inespecíficas, fue necesaria la recuperación y purificación de la banda de interés directamente del gel. Este procedimiento permitió la secuenciación exitosa de los amplificadores de 80% de las cepas obtenidas.

A pesar de la implementación de protocolos alternativos, en el caso de los aislados P-lan 04, 06, y 18 no fue posible obtener secuencias de buena calidad. Los motivos fueron que las secuencias obtenidas resultaron ilegibles (P-lan 04), de muy corta longitud (P-lan 06) o presentaron identidades $\leq 90\%$ (P-lan 18). Las secuencias ilegibles suelen presentarse debido a contaminaciones durante la purificación. Esto genera que los picos de la lectura se solapen dificultando el análisis de la secuencia (Edinburgh Genomics, 2016). Por lo anterior, se recomienda clonar el producto PCR para disminuir el riesgo de DNA contaminante. La obtención de secuencias de corta longitud puede deberse a un alto contenido de guanina y citosina en el gen *rRNA 16S* de la cepa P-lan 06, lo que promueve la formación de estructuras secundarias afectando el proceso de secuenciación (Edinburgh Genomics, 2016). Finalmente, bajos porcentajes de identidad ya han sido reportados en otros estudios de identificación microbiana con el gen 16S rRNA (Janda y Abbott, 2007). Este fenómeno puede deberse a que la cepa P-lan 18 pertenezca a un grupo taxonómico poco caracterizado (Janda y Abbott, 2007).

Pese a la falta de evidencia molecular, el análisis de los caracteres morfológicos similares a los del aislado P-lan 05 permitieron la atribución de P-lan 06 al género *Enterobacter*. De igual manera, se correlacionó el aislado P-lan 02 con el género *Bordetella* debido a su alta similitud morfológica con P-lan 03 y 07.

En el caso de los aislados P-lan 03, 07, 08 y 11, que presentaron porcentajes de identidad muy similares entre los géneros *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Bordetella* ($\geq 98.5\%$), se contrastó la evidencia microbiológica con los caracteres reportados para cada género. Sólo *Bordetella* sp. posee una morfología cocobacilar similar al de las cepas aisladas, por lo que éstas pudieron ser asignadas a este género. Por otro lado las cepas P-lan 05, 09, 12, 13, 15, 19 y 20, tuvieron porcentajes de identidad muy cercanos con varios géneros de enterobacterias, pero fueron asignadas al género

Enterobacter por su agrupamiento en los árboles de distancia. Estos resultados concuerdan con la baja resolución del gen *rRNA 16S* para la discriminación a nivel de género dentro de las familias Enterobacteriaceae y Alcaligenaceae (Chakravorty et al., 2007; Janda y Abbott, 2007).

Los aislados P-lan 01 y 15 fueron identificados como *Staphylococcus* sp., con porcentajes de identidad $\geq 98\%$. Si bien este género se reporta como Gram positivo, los aislados presentaron morfología Gram variable después de 3 días de incubación. Este fenómeno ya ha sido reportado en muestras clínicas de *Staphylococcus* a causa de exposición de las células a agentes microbianos o cultivos en fases de crecimiento exponencial (McClatchey, 2002). Para este género se reporta que los cultivos alcanzan la fase de crecimiento exponencial luego de 7 h de incubación en agar sangre (Garrity, 2009). Los medios LB y BHI utilizados en el aislamiento son de manera similar, ricos en nutrientes que pueden favorecer el crecimiento acelerado de las cepas. Esto pudo causar que después de tres días de incubación, éstas presentaran morfologías atípicas.

Este es el primer trabajo en el que se identifican bacterias obtenidas de la cavidad oral de *P. lansbergii*. Blandón (2009) realizó la identificación de la flora bacteriana de la cavidad oral de diversas especies de vipéridos colombianos, incluyendo a la especie *Porthidium nasutum*. Sin embargo, no especificó la comunidad bacteriana aislada por especie de ofidio, por lo que este trabajo es el primero en registrar las bacterias residentes en la boca de una especie del género *Porthidium* en Colombia.

Del total de cepas aisladas, 16 (80%) fueron identificadas como géneros potencialmente patógenos para los humanos y su presencia en otras serpientes ya ha sido reportada (Jorge et al., 1990; Plenz, 2014). De los géneros identificados *Bordetella*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas* están directamente relacionados con enfermedades humanas como tos ferina, neumonía, osteomielitis y fibrosis quística, respectivamente (Demko et al., 1998; Parkhill et al.,

2003; Labandeira-Rey et al., 2007; Corti et al., 2007). La abundancia de aislados del género *Enterobacter* es resaltable, debido a que algunas especies suelen involucrarse en infecciones de heridas a nivel cutáneo, muscular y óseo: celulitis, fascitis, miositis y abscesos, pueden generar serias complicaciones secundarias en los pacientes (Garrity, 2009). Estos riesgos toman relevancia al considerar el potencial dermonecrótico y miotóxico del veneno de *P. lansbergii* (Jiménez-Charris, 2015) que puede incrementar la infectividad de las bacterias presentes en la herida (Saravia-Otten et al., 2007). Teniendo en cuenta el efecto que pueden causar estos microorganismos tras una mordedura, un impacto clave de estos resultados es que permiten anticipar las secuelas potenciales de un accidente ofídico con *P. lansbergii*.

El objetivo de este trabajo era la identificación de cepas cultivables de la cavidad oral de un individuo de *P. lansbergii* como un primer acercamiento a la diversidad bacteriana que puede hallarse en la boca de esta serpiente en condición de cautiverio. Para la realización del macroproyecto, en el que se usará un número mayor de individuos, se recomienda la implementación de pruebas bioquímicas para lograr diferenciar entre grupos taxonómicamente complejos de las familias Enterobacteriaceae y Alcaligenaceae, y así confrontar las ambigüedades que puedan generarse a la hora de asignar los aislados a un grupo taxonómico.

6. Conclusiones

- Se obtuvieron 20 aislados bacterianos a partir de frotis de la cavidad oral de un espécimen de *P. lansbergii*.

- La identificación de 18 de los aislados con el uso de oligonucleótidos del gen *16S rRNA* fue exitosa, coherente y complementaria con los caracteres morfológicos a los cuales se les hizo seguimiento.
- Los 18 aislados se encuentran distribuidos en los géneros *Staphylococcus* sp., *Bordetella* sp, *Enterobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp. y *Bacillus* sp.
- La cavidad oral de *P. lansbergii* puede albergar gran variedad de grupos bacterianos, la mayoría de los cuales podrían llegar a ser patógenos humanos.
- Las 20 cepas están criopreservadas en el LBM para análisis posteriores.
- Este estudio corresponde al primer reporte de los géneros bacterianos cultivables alojados en la cavidad oral de *P. lansbergii*

7. Recomendaciones

- Se recomienda la utilización de pruebas bioquímicas para complementar la identificación bacteriana.
- Así mismo, se recomienda incrementar el N muestral y la cantidad de medios de cultivo para la realización del macroproyecto, para lograr identificar un mayor número de cepas bacterianas.
- Se sugiere utilizar un mayor número de juegos de oligonucleótidos para mejorar la calidad de los amplificadores y las secuencias obtenidas.

Referencias Bibliográficas

- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. y Stahl, D. A. (1990). Combination of *16S rRNA*-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1919-1925.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. y Struhl, K. (Eds.). (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. doi: 10.1002/0471142727
- Blandón, G. (2009). Flora bacteriana asociada a la cavidad bucal en serpientes de la familia *Viperidae*. (Tesis de pregrado). Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- Blaylock, R. S. M. (2001). Normal oral bacterial flora from some southern African snakes. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68(3), 175-182.
- Campbell, J. A. y Lamar, W. W. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere. (Vol. 2). Ithaca, United States: Cornell University Press.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M. y Connell, N. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 330-339.
- Corti, G., Panunzi, I., Losco, M. y Buzzi, R. (2007). Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man. *Journal of chemotherapy*, 19(1), 94-96.
- Costa, J. L. (Ed). (2002). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clinica e terapêutica dos acidentes*. Sao Paulo, Brasil: Sarvier.
- De Andrade, J. G., Pinto, R. N. L., de Andrade, A. L. S. S., Martelli, C. M. T., y Zicker, F. (1989). Estudio bacteriológico de abscessos causados por picada de serpientes do gênero *Bothrops*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 31(6), 363-367.

- Dehghani, R., Sharif, M. R., Moniri, R., Sharif, A. y Kashani, H. H. (2016). The identification of bacterial flora in oral cavity of snakes. *Comparative Clinical Pathology*, 25(2), 279-283.
- Demko, C. A., Stern, R. C. y Doershuk, C. F. (1998). *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence. *Pediatric pulmonology*, 25(5), 304-308.
- Devereux, R., y Wilkinson, S. S. (1995). Amplification of ribosomal RNA sequences. *Molecular microbial ecology manual*, 3(1), 1-11.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- Fonseca, M. G., Moreira, W. M. Q., Cunha, K. C., Ribeiro, A. C. M. G. y Almeida, M. T. G. (2009). Oral microbiota of Brazilian captive snakes. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 15(1), 54-60.
- Garrity G. (Ed.). (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, USA:Springer.
- Goldstein, E. J., Agyare, E. O., Vagvolgyi, A. E. y Halpern M. (1981). Aerobic bacterial oral flora of garter snakes: development of normal flora and pathogenic potential for snakes and humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 13, 954-956.
- Henao, E. (2005). Caracterización de la flora bacteriana patógena presente en la cavidad bucal de víboras en el serpentario del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca*, 7(1).
- Huber T., Faulkner G. y Hugenholtz P. (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 20(14), 2317-2319.
- Instituto Nacional de Salud (2015). *Informe final del evento accidente ofídico, Colombia, Año 2015*. Instituto Nacional de Salud. Recuperado de <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiol%C3%ADgico/Accidente%20of%C3%ADdico%202015.pdf>

- Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., Mora-Obando, D., Camacho, E., Castro-Herrera, F. y Lomont, E. B. (2015). Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *Journal of proteomics*, 114, 287-299.
- Jorge, M. T., Mendonça, J. S., Ribeiro, L. A., Silva, M. L., Kusano, E. J. y Cordeiro, C. L. (1990). Flora bacteriana da cavidade oral, presas e venenos de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 32(1), 6-10.
- Jorge, M. T., Ribeiro, L. A.; Silva, M. L., Kusano, E. J. y Mendonça, J. S. (1994). Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: a prospective study. *Toxicon*, 32, 743-748.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology Evolution*, 33, 1870-1874.
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E. L., Bes, M., Benito, Y. y Vandenesch, F. (2007). *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*, 315(5815), 1130-1133.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*, 19(4), 554-568.
- Mackessy, S. P. (Ed.). (2010). *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. doi: 10.1201/9781420008661
- McClatchey, K. D. (Ed.). (2002). *Clinical laboratory medicine*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins
- Muyzer, G., De Waal, E. C. y Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain

- reaction-amplified genes coding for *16S rRNA*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695–700.
- Nakajima, H., Itoh, K. I., Arakawa, E., Inoue, M., Mori, T. y Watanabe, H. (1994). Degradation of a Polymerase Chain Reaction (PCR) Product by Heat-Stable Deoxyribonuclease (DNase) Produced from *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology and immunology*, 38(2), 153-156.
- Ortiz-Suárez, F.I., Ortigón-Cárdenas, L.H., Ortega-Bolaños, Y. L. y Toledo-Brausin, L. A. (2016). Identificación de la flora bacteriana asociada a la cavidad oral en ejemplares cautivos de cascabel Suramericana (*Crotalus durissus*). *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias – FAGROPEC. Universidad de la Amazonia, Florencia – Caquetá*, 8(1), 25-29.
- Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M. B., Duque, E., Rodríguez, O., Arango, J. L., Díaz, A. (2002). Complication of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia: A clinical and epidemiology study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, 40, 1107-114.
- Otero, V. (2011). Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácidos lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., y Cerdeño-Tárraga, A. M. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature genetics*, 35(1), 32-40.
- Plenz, B., Schmidt, V., Grosse-Herrenthey, A., Krüger, M., y Pees, M. (2014). Characterisation of the aerobic bacterial flora of boid snakes: application of MALDI-TOF mass spectrometry. *The veterinary record*, 176(11), 285.
- Ramírez, P., y Cocha, J. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 67–77.

- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saravia-Otten, P., Gutiérrez, J. M., Arvidson, S., Thelestam, M., & Flock, J. I. (2007). Increased Infectivity of *Staphylococcus aureus* in an Experimental Model of Snake Venom—Induced Tissue Damage. *The Journal of infectious diseases*, 196(5), 748-754.
- Schaeffer, A., Fulton, M. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77(1990), 190-194.
- Schlegel, H. (1841). Description d'une nouvelle espèce du genre Trigonocéphale (*Trigonocephalus Lansbergii*). *Magasin de Zoologie: Reptiles*, 1, 1-3
- Shek, K. C., Tsui, K. L., Lam, K. K., Crow, P., Ng, K. H., Ades, G. Lam, T. S. (2009). Oral bacterial flora of the Chinese cobra (*Naja atra*) and bamboo pit viper (*Trimeresurus albolabris*) in Hong Kong SAR, China. *Hong Kong Medical Journal*, 15(3), 183-90.
- Stackerbrandt, E., y Goebel B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 846-849.
- Theakston, R. D., Phillips, R. E., Looareesuwan, S., Echeverria, P., Makin, T., Warrell, D. A. (1990). Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild Malayan pit vipers (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand. *Transactions of The Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 875-879.