

AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis* EN SUELO AGRÍCOLA, PUEBLA, MÉXICO

Isolation of *Brucella melitensis* on agricultural land, Puebla, Mexico

Elsa I. CASTAÑEDA-ROLDÁN^{1†}, Juan R. CRUZ-AVIÑA^{1,2},
María G. TENORIO-ARVIDE³, Miguel A. VALERA-PÉREZ³,
Abel E. VILLA-MANCERA⁴, Jhoana DÍAZ-LARREA⁵ y Rubén CABRERA^{6*}

¹ Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio, Ciudad Universitaria, Jardines de San Manuel, 72592, Puebla, Puebla, México.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Fauna Silvestre, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, km 7.5 carretera Tecamachalco-Cañada Morelos, El Salado, 75460 Tecamachalco, Puebla, México.

³ Centro de Investigación en Ciencias Agrícolas, 14 Sur 6301, Jardines de San Manuel, 72570 Puebla, Puebla, México.

⁴ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 Sur 304, Centro, 75482 Tecamachalco, Puebla, México.

⁵ Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, 09340 Ciudad de México, México.

⁶ Oficina del Historiador de la Ciudad, Gabinete de Arqueología, Habana Vieja, Calle Tacón 12 entre Obispo y O'Reilly, 86150 Ciudad de La Habana, Cuba.

*Autor para correspondencia: cabreraalgas@gmail.com

(Recibido: mayo de 2023; aceptado: marzo de 2024)

Palabras clave: contaminación de terreno, zoonosis ambiental, zona endémica.

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica importante debido a su distribución mundial, su potencial infectocontagioso (medio millón de nuevos pacientes cada año) y su gran variedad de nichos (ganado, humanos, fauna silvestre, agua, aire). Se atribuye a *Brucella* gran parte de la alta afectación en los rendimientos productivos de ganado vacuno y caprino en la comunidad Emilio Portes Gil del municipio de Puebla, México. Por ello, el objetivo de este estudio fue aislar a *Brucella* sp. en muestras de suelo agrícola (n = 90) en una zona de alta incidencia en humanos y ganado. Por medio de métodos microbiológicos estándares se aisló, detectó y confirmó la presencia de *Brucella melitensis* en las muestras analizadas, con una efectividad del 100 % durante el primoaislamiento (total de muestras), 69.8 % para la resiembra y 57 % en las pruebas confirmatorias PCR de punto final (PCR-PF) utilizando BM16 y *E. coli* como testigos. Se amplificó el gen *bp26* con 1024 pb y los perfiles microbiológicos resultaron comparativamente idénticos para *B. melitensis*. Este es el primer registro de detección, aislamiento y confirmación de *B. melitensis* en suelo agrícola en México. Se reconoce al sistema suelo como una extensión del nicho para *B. melitensis*. Estos datos constituyen una herramienta útil para mejorar la comprensión sobre la patogénesis y virulencia del género *Brucella* en el medio natural, así como su efecto potencial en la salud pública y animal.

Key words: ground contamination, environmental zoonosis, endemic zone.

ABSTRACT

Brucellosis is an important zoonotic disease due to its global distribution, infectious-contagious potential (half a million new patients yearly), and a wide variety of niches (livestock, humans, wildlife, water, and air). A large part of these effects on the productive yields of cattle and goats in the Emilio Portes Gil community in the municipality of Puebla, Mexico, is attributed to *Brucella*. Therefore, this study aims to isolate *Brucella* sp. in agricultural soil samples in an area with a high incidence in animals and humans. Agricultural soil samples were used ($n = 90$). By standard microbiological methods, *Brucella melitensis* was isolated, and its presence was detected and confirmed in the analyzed samples, 100% for the primary isolation (total samples), 69.8% during re-seeding, and 57% in the endpoint PCR confirmatory tests (using BM16 and *E. coli* as controls). The *bp26* gene was amplified by 1024 bp, and the microbiological profiles were identical for *B. melitensis*. This is the first record of detection, isolation, and confirmation of *B. melitensis* in agricultural soil in Mexico. The soil system is recognized as an extension of the niche for *B. melitensis*. These data constitute a useful tool to improve understanding of the pathogenesis and virulence of the *Brucella* genus in a natural environment and its potential effect on public and animal health.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis o fiebre de Malta es una enfermedad zoonótica producida por bacterias del género *Brucella*. Es una de las zoonosis más importantes del orbe y su incidencia en humanos está relacionada íntimamente con la enfermedad en animales domésticos, conocida desde el siglo XIX; sin embargo, hasta hace 40 años se creía que sólo afectaba al ganado. Actualmente se reconocen 14 especies con una amplia variedad de hospederos, incluyendo animales silvestres como peces, anfibios, reptiles y aves (Ramos-Ramírez et al. 2020, Cruz-Aviña et al. 2021a, b, Aguilar et al. 2022, Occhialini et al. 2022). Su distribución es mundial y, a pesar de que algunas especies de *Brucella* han sido erradicadas en países desarrollados, son un grave problema para la salud pública (medio millón de nuevos pacientes se infectan al año) y salud animal (causando abortos, mortinatos y fiebre de Malta) en países emergentes como México (Almuneef et al. 2004, Corbel 2006, Cruz-Aviña et al. 2021b).

Brucella spp. tiene afinidad por el eritrol en los tejidos de los órganos reproductivos; en consecuencia, los organismos sexualmente maduros o en estado de preñez son más susceptibles a la infección. Los animales infectados eliminan las bacterias después de un aborto (o un parto), así como a través de la leche, secreciones vaginales, semen, sangre, orina y heces, llegando a contaminar suelo, pastos y agua. De esta forma se completa el ciclo infeccioso, motivando la contaminación de otros animales y la persistencia del germen en la naturaleza. *Brucella* spp. puede

sobrevivir en el ambiente y mantener su infectividad durante periodos variables, de acuerdo con las condiciones del medio (Ortega et al. 2013, Whatmore y Foster 2021). Tiene la capacidad de sobrevivir en una gran variedad de nichos: *B. abortus* y *B. suis* sobreviven en el aire como bioaerosoles (Ollé-Goig y Canela-Soler 1987); *B. abortus* sobrevive en agua marina y *B. melitensis* sobrevive como contaminante emergente en lagos de cráter o Maars (vocablo de origen alemán, que se utiliza ampliamente en limnología y se refiere a los lagos que ocupan cráteres volcánicos) de acuerdo con White y Ross (2011). Recientemente se ha registrado a *B. abortus* y *B. suis* en aguas de bordos de uso agropecuario (Ramos-Ramírez et al. 2020, Cruz-Aviña et al. 2022). La presencia de *B. microti* también se ha verificado en el suelo como vector en la interfaz suelo-animal-humano (Scholz et al. 2008, Godfroid 2018, Dadar et al. 2021).

Cabe señalar que los métodos microbiológicos se basan en diferentes tipos de pruebas para establecer la sospecha, detección y cuantificación de los microorganismos, según su capacidad de crecer en un medio de cultivo específico (lo cual recibe el nombre de primoaislamiento). Posteriormente se realiza la resiembra del cultivo para disponer del microorganismo investigado, conforme a los postulados de Koch (se preservan en ultracongelación a corto o mediano plazo en bancos y colecciones científicas bacterianas, para futuros estudios, como referencia o para aplicaciones biotecnológicas), y confirmar su presencia mediante ensayos bioquímicos (i.e., metabólicos). Estas pruebas siguen siendo el estándar de oro en microbiología (Krieg 2005). La

identificación bacteriana implica la confirmación del aislado mediante otras pruebas y ensayos, como la prueba de sobrevivencia y la de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (MacFaddin 2000).

Por su parte, el suelo, como recurso natural, es considerado no renovable, dinámico y primordial para la vida (Dominati et al. 2010, Schoonover y Crim 2015), por lo que constituye un reservorio importante de microorganismos que impactan tanto a las plantas como a sus propiedades físicas y químicas. Por ello puede definirse como un sistema complejo de interacción entre las fases sólida, líquida y gaseosa (Schoonover y Crim 2015).

Durante la fase sólida, el tipo y composición de la materia mineral están determinados por las características de las rocas madre y por los procesos edáficos que intervienen. En este sentido, la porción inorgánica es importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua. La materia orgánica procede de la actividad de los distintos microorganismos del suelo, de su composición y cantidad, la cual varía principalmente en función del tipo de cubierta vegetal. Una de las capas del suelo está constituida por espacios porosos que, a su vez, están ocupados por agua y gases que constituyen la atmósfera edáfica (Schoonover y Crim 2015). En este sentido, el género *Brucella* guarda estrechas relaciones filogenéticas con las α -proteobacterias Gram negativas parasitarias del suelo, entre las que destacan: *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Rhizobium* y *Rhodobacter* (Moreno et al. 1990, Velasco et al. 2000).

Se hipotetizaba que el suelo constituía un reservorio potencial para *Brucella*, pero su relación filogenética con *Ochrobactrum* permitió corroborar que ambos géneros comparten la inusual característica de que sus membranas externas son permeables y resistentes ante sondas hidrofóbicas, al tiempo que pueden desestabilizarse al interactuar con péptidos policatiónicos (Velasco et al. 2000, Wattam et al. 2009, Dadar et al. 2021). La mayor parte de las α -proteobacterias son simbioses intracelulares o patógenos de plantas y animales (Ugalde 1999), y destacan por su capacidad para degradar compuestos y fijar nitrógeno en el rizobioma (Krieg 2005). Con independencia de lo anterior, las primeras sospechas de sobrevivencia de *Brucella* spp. en suelo fueron evidenciadas por Zakharova (1956) y corroboradas por van Donsel et al. (1967) utilizando los postulados de Koch. En 2007 se aisló a *Brucella* en muestras de suelo de una comunidad en la República Checa (al principio la tipificaron como una variante de *Brucella*

melitensis, pero en análisis posteriores resultó ser una nueva especie que con el tiempo se llamó *B. microti*) (Hubalek et al. 2007). Posteriormente se vinculó a *B. microti* con los ratones de campo (topillos) infectados que utilizan al suelo como madrigueras y que contaminan con bacterias de *Brucella* el suelo agrícola de esa comunidad a través de sus excretas y orina (Scholz et al. 2008).

Desde la década de 1980, considerando los resultados de van Donsel et al. (1967), se atribuyeron al sistema suelo todos los requisitos potenciales para ser colonizado en diferentes áreas geográficas por el género *Brucella* spp. (García-Carrillo 1987). Actualmente, esta sospecha ha sido confirmada en diferentes regiones y los procesos de colonización se han verificado ampliamente (Scholz et al. 2008, Ahmed et al. 2017, Janowicz et al. 2018).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue aislar a *Brucella melitensis* en suelo agrícola de una zona con alta incidencia y prevalencia de brucelosis humana (10 y 33 %, respectivamente) y de ganado (30 y 50 %, respectivamente) en Puebla, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

La comunidad Emilio Portes Gil pertenece al municipio de San Nicolás Buenos Aires, Puebla, México (19°18' 30" N, 97°51' 00" W) y está situada a 2350 msnm. El clima de la región es semiárido, templado y con lluvias en verano. Su principal actividad económica es la agricultura de riego. El número de habitantes es de 2174. La zona presenta una alta incidencia de casos de brucelosis animal (30 %) y humana (10 %), con referencias históricas desde 1923, fecha que coincide con los primeros registros de importación de cabras murcianas-granadinas (españolas) en la zona (Cruz-Aviña et al. 2022). En estos suelos, cuyos sitios se muestran en la **figura 1**, el ganado caprino pastorea y transita itinerante en la zona, de manera extensiva y sin control de buenas prácticas.

Trabajo de campo

Toma de muestras

Entre 2017 y 2019 se recolectaron por triplicado muestras de suelo agrícola en 10 sitios diferentes (n = 90). Se depositaron para su homogenización en tinas de plástico (30 L) y se tamizaron hasta obtener una muestra final (1.5 kg). El criterio seleccionado fue al azar, con una distancia de 2 ha entre cada muestreo, y la forma de recolección fue en zigzag, a una profundidad aproximada de 0-30, 30-60 y

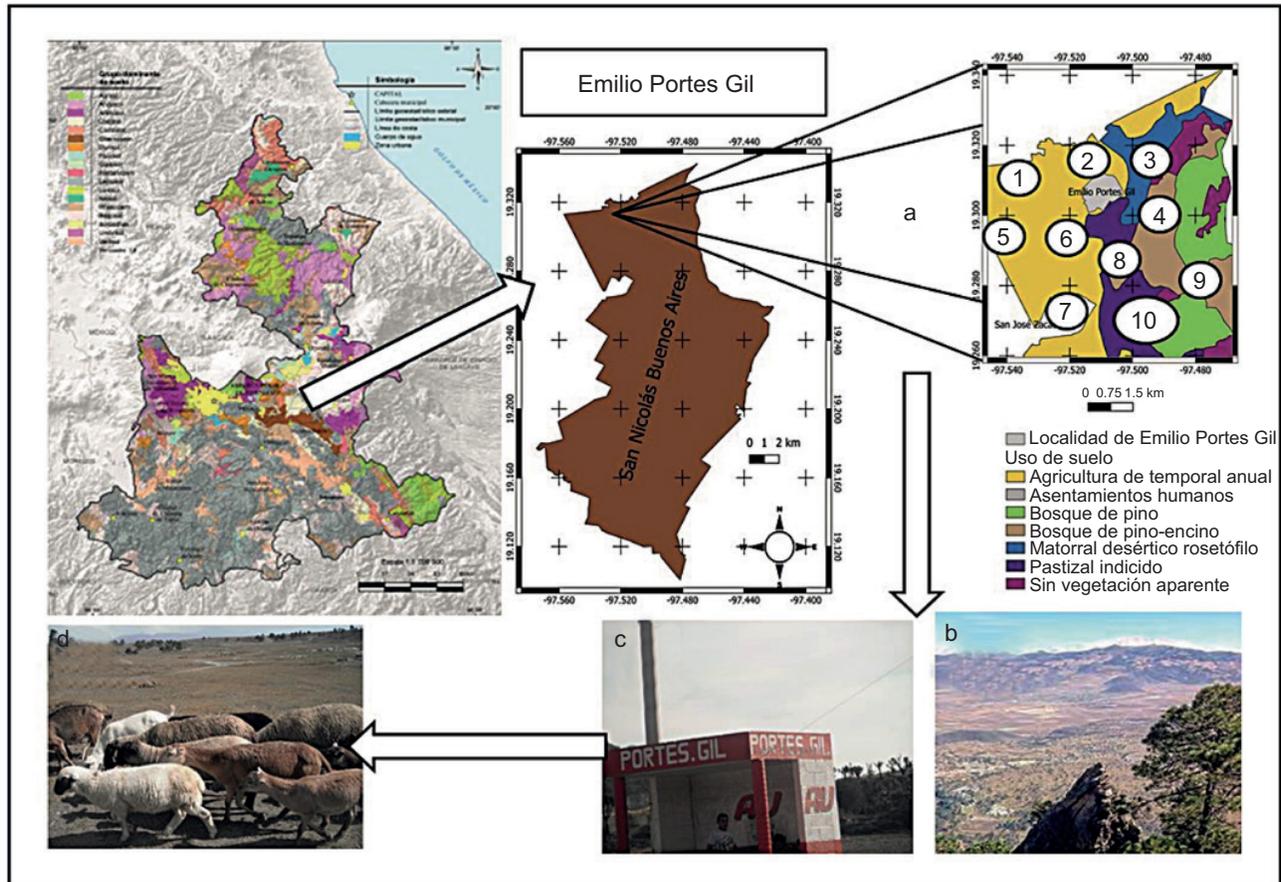


Fig. 1. Problemática del área de estudio (comunidad Emilio Portes Gil, municipio de San Nicolás Buenos Aires, Puebla). (a) Vista panorámica de la zona de muestreo, (b) sitios de muestreo de suelo agrícola, (c) entrada o acceso principal a la comunidad, (d) ganado caprino que transita libre e itinerante en la región. Elaboración propia basada en INEGI (2022).

60-100 cm, conforme a la NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT 2002).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) paramétrico. Para determinar las diferencias entre las medias se utilizó la prueba de mínima diferencia significativa (LSD, por sus siglas en inglés; $p \leq 0.05$) con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1. Los valores de p significativos se expresan con un valor de significancia de 0.05 y 001.

Análisis de laboratorio

Trabajo de laboratorio

Las muestras recolectadas en campo fueron puestas en hielo y preparadas para su traslado ($t < 3$ h). Su caracterización tuvo lugar en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita

Universidad Autónoma de Puebla, donde se analizaron sus características químicas y físicas de acuerdo con el método señalado por Díaz-Romeau y Hunter (1978).

Los análisis de rutina en el laboratorio de suelos incluyeron los propuestos por Quintana et al. (1983). Esta práctica siguió diferentes protocolos según el parámetro evaluado. Para la determinación de la textura se siguió a Bouyoucos (1962); para los indicadores de reacción del suelo (pH) y materia orgánica (MO, %), a Walkley y Black (1934); para la densidad aparente (g/cm^3), a Rhoades (1982), y para el macronutriente fósforo disponible (P, ppm), a Olsen et al. (1954), con adecuaciones con el ácido sulfúrico 6 N, según Nelson y Bremner (1972).

En cuanto a los reactivos, los patrones utilizados para realizar la curva de calibración fueron preparados con soluciones estándares de 500 mg/L para Ca y Mg y 1000 mg/L para K, a partir de sal de

carbonato de calcio al 100 %, cinta de magnesio al 100 % y sal de cloruro de potasio 99 % de pureza, respectivamente. Todos los productos utilizados fueron de la marca Sigma-Aldrich. En la disolución estándar de ácido tricloroacético (24% V/V) al 98%, disolución de cloruro de lantano al 5% m/V al 99% y ácido clorhídrico al 1% V/V al 37% de pureza, respectivamente, la totalidad de los productos utilizados fueron de la marca Sigma-Aldrich. La determinación de calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K) y sodio (Na) se realizó por el método del acetato de amonio 1N pH 7 (Rhoades 1982); su lectura se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica (Jackson 1964) y se hizo efectiva por el desplazamiento con KCl, 1N (Díaz-Romeau y Hunter 1978). En suelos calcáreos se recomienda extraer con acetato de amonio 1 N a pH de 8.5, para evitar sobreestimaciones de calcio y magnesio. La acidez intercambiable (Al + H) se obtuvo por el método de Yuan (1958) y para la determinación del cadmio (Cd) y el plomo (Pb) disponibles se empleó ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente quelante (EDTA 0.05 M pH 7) (Westerman 1990).

Las muestras recolectadas y preparadas se pusieron en hielo, se trasladaron al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (LPB-ICUAP-BUAP) y se procesaron para su caracterización correspondiente en el apartado “material no consolidado” (compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos), el cual comprende desde la capa superior de la superficie terrestre hasta diferentes niveles de profundidad del suelo de acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (SEMARNAT 2013).

Caracterización física y química

Se realizó la caracterización de las muestras de suelo conforme a la NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT 2002), determinándose las especificaciones a reportar como textura, humedad, color, pH, materia orgánica, nitrógeno, composición de minerales petrogénicos, salinidad y sodicidad.

Caracterización microbiológica

Se siguió el protocolo ISO 6887 1993 (ISO 1993) para estimar el número de bacterias aerobias mesófilas entre 30 y 37 °C, conocido también como recuento de placas aeróbicas (APC), por sus siglas en inglés, que es el método oficial para determinar el número de microorganismos viables. Se utilizó el medio de cultivo agar-chocolate cuenta estándar (ACE, por sus siglas en inglés) atemperado a 45 °C.

Las muestras de suelo se homogenizaron y diluyeron hasta 10^{-4} . Las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} se inocularon en placas de Petri y se añadió el ACE según el método de vaciado en placa. Se homogenizó el medio con movimientos lentos y circulares por 10 s dejando solidificar el agar y secar las placas abiertas en posición invertida en una estufa a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se incubó la muestra entre 35 y 37 °C durante 24-48 h. Finalmente se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se reportó el resultado en log de UFC/mL (Maturin y Peeler 2001, Pepper y Gerba 2005).

Caracterización de hongos

Se recolectaron 30 g de muestra de la rizosfera a una profundidad de 10 a 20 cm. También se recolectaron muestras de suelo de hormigueros, así como de adultos y larvas de hormigas, estas últimas como fuente de actinomicetos antagonistas (Schuppler et al. 1995). Las muestras de suelo se trataron con agua fenolizada por 30 min y posteriormente se difundió 1 mL en placas de Petri con diferentes medios de aislamiento como agar dextrosa papa (PDA), agar caseína almidón (ACA), agar de actinomicetos (AA) y agar Czapek-Dox (ACD), conforme a lo expuesto por Lunge y Patil (2012). Las hormigas adultas y larvas se colocaron directamente sobre los medios de cultivo. Las cajas se incubaron a 28 ± 2 °C durante 5 a 7 d. Se aislaron y purificaron actinomicetos en PDA de acuerdo con sus características morfológicas macroscópicas (colonias polvosas secas que presentaron halos de inhibición y filamentos característicos en la observación microscópica conforme al método propuesto por Hayakawa et al. [2004]). Estas poblaciones se cuantificaron mediante la técnica de dilución en placa (Chen et al. 2003).

Primoaislamiento

Las muestras de suelo se sembraron en placas de Petri con medio Agar Brucella-BUAP (medio específico para *Brucella* spp.) más 5 % (v/v) de Agar chocolate, antibiótico y cristal violeta (Alton et al. 1976, Eisenberg et al. 2012). Se realizaron pruebas microbiológicas estándar a las colonias cultivadas conforme al método de Alton et al. (1976). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 h con una atmósfera de CO₂ al 5 % para el primoaislamiento (Alton et al. 1972, 1988).

Resiembr

Los primoaislamientos se resembraron y separaron en las siguientes 8 a 24 h en las condiciones anteriormente descritas. Posteriormente se realizaron

diluciones para pruebas de tinción de Gram y de actividad metabólica (TSI, LIA, URE, CIT, MIO, OXI, CAT, RM-VP y H₂S), así como curva de crecimiento (Alton et al. 1976, 1988). Se llevaron a cabo pruebas estándar de rutina para diagnóstico por sensibilidad a diferentes tintes colorantes derivados de la anilina: tionina (115929 Merck Millipore) a las diluciones 1:100 000, 1:50 000 y 1:25 000; fucsina (115937 Merck Millipore) a una dilución de 1:10 000, y safranina (115948 Merck Millipore) a una dilución de 1:10 000 (Alton et al. 1976, 1988). Se calculó el total de resultados positivos obtenidos para *Brucella* spp. derivados de estos cultivos (Alton et al. 1988).

Sobrevivencia de *Brucella* en suelo

A partir de las muestras recolectadas se realizó una combinación de todas las muestras ordenadas por mismo peso (w/w) y volumen (v/v). Posteriormente se pesaron 25 g de esta muestra compuesta de suelo, se esterilizaron en autoclave vertical (Sigma-Aldrich) a 200 °C en tres series con tres repeticiones cada una y se diluyeron en 75 mL de agua destilada. Luego se inocularon con 1 mL de la suspensión bacteriana de *B. melitensis* M16 (NCTC 301), *B. abortus* S19 (NCTC 305) y *B. abortus* RB51 (B-0653-048) ajustada a densidad óptica (DO₆₀₀) = 1 en caldo *Brucella*-BUAP. Posteriormente se monitoreó la sobrevivencia de las poblaciones sembradas cada 4 h en 100 µL de la suspensión en estudio, en medio Agar *Brucella*-BUAP hasta que la población bacteriana presentó muerte experimental.

Extracción de ADN total del suelo

Las muestras de suelo (250 mg) se procesaron para la extracción de ADN utilizando un kit de aislamiento (Soil Microbe DNA, Zymo Research®) según las recomendaciones del fabricante. Después de la extracción las muestras fueron sometidas a lisis celular por medio de centrifugación y filtrado por columna de purificación (V_{final} = 100 µL). Se determinó su calidad utilizando un NanoDrop 1000 a DO₆₀₀ = 1 con un espectrofotómetro (Thermo Scientific, EUA).

Para la observación de ADN total del suelo se realizó un corrimiento en gel de agarosa al 0.8% con 5 µL de muestra de ADN y 6 µL del marcador de peso molecular (Sambrook y Russell 2001).

Análisis molecular

Se realizó PCR de punto final (PCR-PF) con la mezcla sugerida por Cloeckaert et al. (2000): 25 µL de Oligo 1 (59 GCCCCTGACATAACCCGCTT 39) y Oligo 2 (59 GAGCGTGACATTTGCCGATA 39), 5 µL de la muestra de ADN total de suelo y 5 µL de

H₂O estéril (Cloeckaert et al. 1996). Se utilizaron los carriles o columnas 1 a 7 para las muestras de suelo agrícola, el Carril 8 con el ADN de la cepa vacunal de *Brucella melitensis* (BM16 NCTC 301) como testigo positivo y el Carril 9 con ADN de *E. coli* como testigo negativo. La reacción se practicó en un termociclador MasterCycler con el siguiente ciclo: naturalización inicial a 94 °C (5 s), seguida de 30 ciclos: hibridación a 58 °C (1 min), elongación a 70 °C (1.5 min), desnaturalización a 94 °C (1 min), hibridación a 58 °C (1 min) y elongación final a 70 °C (10 min). Por último, se mantuvo la reacción a 4 °C por 30 min.

Se realizaron amplificaciones del ADN bacteriano por PCR, las cuales se visualizaron en gel de agarosa al 1.3 % (p/v) y se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) para visualizar los productos de la amplificación del gen *bp26*/IS711, que es específico del género *Brucella* (Cloeckaert et al. 2000). Se observaron las bandas de amplificación del gen *bp26* en un transiluminador de rayos UV (marca Spectroline) y las fotografías de los geles se tomaron con un equipo Kodak-Edas.

RESULTADOS

Análisis físico y químico de las muestras de suelo agrícola

En el agrosistema del municipio Emilio Portes Gil, los suelos son profundos, de color claro (gris), con textura salina franco-arenosa. En cuanto a su clasificación se identificaron como de tipo Solonchak (suelos de color pálido o gris que se encuentran en condiciones áridas y con mal drenaje). Por otra parte, en cuanto su edafología, los suelos dominantes son arenosoles (40.28 %), phaeozem (22.44 %), leptosoles (15.34 %), andosoles (13.84 %) y fluvisoles (5.73 %) (FAO 2020, INEGI 2020). En el **Cuadro I** se resumen los resultados de los análisis físicos y químicos de las muestras agrícolas: porcentaje de materia orgánica (MO %), pH, humedad (%), nitrógeno total (NT) y coeficiente de variación (VAR) (NOM-021-RECNAT-2000; SEMARNAT 2002). El ANDEVA arrojó interacciones significativas para las combinaciones pH-sitio: $F_{(5,9)} = 11.512$, $p = 0.00107$; y MO %-sitio: $F_{(5,9)} = 5.8043$, $p = 0.0115$.

Determinación de minerales petrogénicos

En la **figura 2** se aprecian los principales minerales petrogénicos detectados en las muestras de suelo analizadas. De acuerdo con los resultados del análisis en la comunidad Emilio Portes Gil predominan los

CUADRO I. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE LAS MUESTRAS DE SUELO AGRÍCOLA DE LA COMUNIDAD EMILIO PORTES GIL, PUEBLA, MÉXICO.

Sitios	Materia orgánica (%)	pH	Humedad (%)	Nitrógeno total (%)	Coefficiente de variación
1	7.17	8.2	15.51	0.17	0.006
2	7.69	8.4	18.57	0.25	0.005
3	8.14	8.1	18.92	0.25	0.005
4	9.01	7.9*	22.94	0.07	0.004
5	9.09	7.8*	19.88	0.14	0.007
6	4.44**	8.8	17.22	0.25	0.005
7	7.51	8.2	21.70	0.80	0.005
8	8.20	8.5	21.05	0.25	0.005
9	6.88**	8.7	17.66	0.25	0.005
10	9.95	7.8*	18.89	0.45	0.003

*pH medianamente alcalino; **bajo porcentaje de materia orgánica.

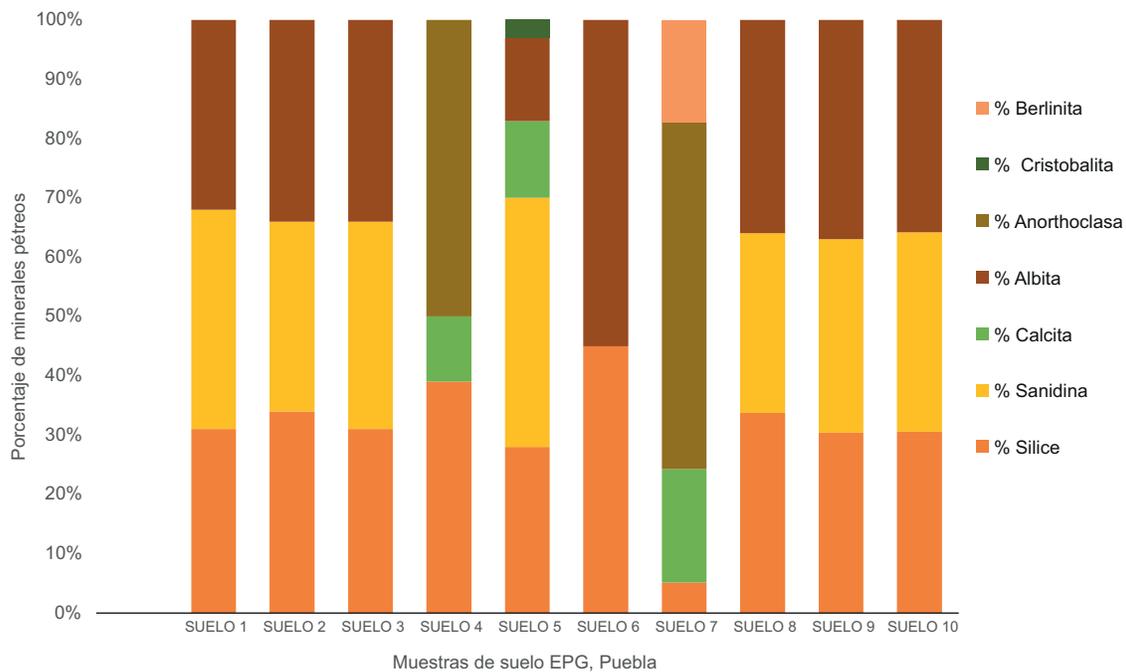


Fig. 2. Composición de los minerales pétreos detectados en las muestras recolectadas en suelo agrícola de la comunidad de Emilio Portes Gil (EPG), Puebla, México.

minerales pétreos: albita, sanidina y sílice, siendo los de menor proporción la calcita y la cristobalita.

Análisis microbiológico *Microbiota autóctona*

Se muestran los resultados (en porcentajes) del análisis de microbiota autóctona para hongos, organismos mesolíticos y actinomicetos en cada una de las muestras (**Fig. 2**). Nuestros resultados indican que los actinomicetos constituyen un componente

significativo de la población microbiana del suelo (casi un millón por gramo de suelo); en segundo término, están los organismos mesofílicos. Entre los organismos termófilos se encuentran los géneros *Clostridium*, *Streptomyces*, *Chaetomium* y *Humicola*, presentes en el estiércol y los vegetales en descomposición. El ANDEVA arrojó una interacción significativa para la combinación Shannon-sitio: $F_{(5,9)} = 4.0068$, $p = 0.0344$). Los microbios celulolíticos del suelo son principalmente mesófilos (**Fig. 3**).

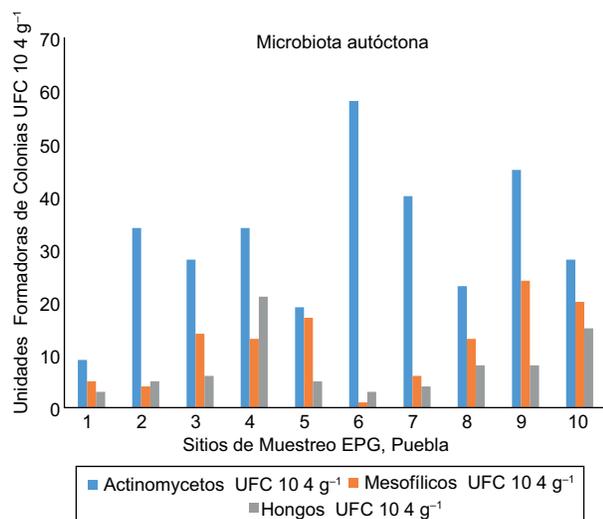


Fig. 3. Resultados del análisis de microbiota autóctona subdividida en hongos, organismos mesofílicos y actinomicetos por unidades formadoras de colonias (UFC $\times 10^4/g$) en suelo agrícola de la comunidad Emilio Portes Gil (EPG), Puebla, México.

Primoaislamiento

El aislamiento de *Brucella* spp. constituye el método diagnóstico definitivo. De los 10 sitios de muestreo de suelo analizados en este estudio, se realizó primoaislamiento para *Brucella* spp. en el total (100 %) de las muestras estudiadas.

Actividad metabólica

Debido a que *Brucella* es un género monoespecífico, contiene enzimas que están codificadas en todas sus especies, lo que permite su diferenciación. Este género se caracteriza por su baja producción de CO_2 , crecimiento lento y actividad metabólica reducida. Además, presenta bacterias oxidativas. Por lo tanto, en pruebas que normalmente evidenciarían la utilización de carbohidratos a través de la fermentación en su metabolismo, como en los casos de TSI, CIT y RMVP, o pruebas que implican descarboxilación o desaminación de aminoácidos, como LIA y MIO, los resultados en este género difieren de otras bacterias y suelen ser negativos. La evaluación de la actividad metabólica de *Brucella* spp. a partir de su primoaislamiento en suelo de la comunidad Emilio Portes Gil dio como resultado lo siguiente: CO_2 independiente (-), no produjo H_2S (-), mostró crecimiento positivo en presencia de fucsina básica (+) y de tionina (+), positivo para safranina (+) e hidrolizó de manera normal la urea (+). Estos resultados concuerdan con la actividad metabólica de *Brucella melitensis* medida con los métodos microbiológicos clásicos.

Sobrevivencia de *Brucella* spp.

En este experimento *Brucella* sobrevivió hasta 120 días en promedio (muerte experimental) en muestras de suelo inoculadas con las siguientes cepas vacunales de referencia: *B. melitensis* M16 (NCTC 301), *B. abortus* S19 (NCTC 305) y *B. abortus* RB51 (B-0653-048).

Purificación de las muestras

A partir de las resiembras efectuadas en los 10 sitios de muestreo, sólo en siete de ellos se obtuvo ADN bacteriano de calidad (69.8 %), el cual se resguardó en la colección bacteriana del LPB-ICUAP-BUAP a $-4^\circ C$ para su posterior análisis.

Detección por PCR-PF

Se amplificó el gen *bp26/IS711*, que es específico del género *Brucella*, con 1029 pb [pares de bases]. El gen *bp26* codifica la proteína BP26 (Omp28) que es un antígeno inmunodominante en la infección de *Brucella* sp. en fauna y humanos. Carril M, (marcador molecular), carriles 1-7 muestras problema (ADN bacteriano purificado a partir de suelo agrícola) (57 %), y se compararon con el testigo positivo (ADN de *Brucella melitensis* vacunal BM16) (+) Carril 8 (ADN de *E. coli*) y en el Carril 9 como testigo negativo (-) (Fig. 4, Cuadro II).

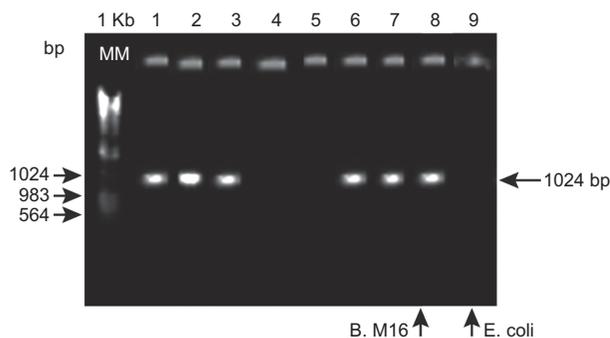


Fig. 4. Imagen en gel agarosa de la amplificación por prueba de reacción en cadenas de polimerasas (PCR) los genes *bp26* (1024 pb) (cebador directo; 59GCCCTGACATAACCCGCTT39) y *bp26B* (cebador inverso; 59GAGCGTGACATTTGCCGATA39) (GenBank U45996). Carriles 1-7: muestras problema de suelo agrícola; carril 8: cepa vacunal de *Brucella* M16 NTC 301 como testigo positivo; carril 9: *Escherichia coli* como testigo negativo.

DISCUSIÓN

Diversos estudios microbiológicos han alertado sobre el riesgo de las excretas contaminadas como vectores de diseminación de microorganismos

CUADRO II. PARÁMETROS EVALUADOS EN MUESTRAS DE SUELO QUE RESULTARON POSITIVAS PARA *BRUCELLA* SEGÚN LA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENAS DE POLIMERASAS (PCR).

Variable	Muestras						
	1	2	3	4	5	6	7
Materia orgánica del suelo (suelos volcánicos) (%)	7.17	7.69	8.14	9.01	9.09	4.44	17.51
pH	8.2	8.4	8.1	8.2	8.3	7.8	8.2
Humedad del suelo (%)	15.15	18.57	18.92	22.94	19.88	17.22	21.7
Cuarzo (%)	31	33	31	39	28	45	5.1
Sanidina (%)	37	32	35	0	42	0	0
Calcita (%)	0	0	0	11	13	0	19.2
Albita (%)	32	33	34	0	14	55	0
Anortoclasa (%)	0	0	0	50	0	0	58.6
Cristobalita (%)	0	0	0	0	3	0	0
Berlinita (%)	0	0	0	0	0	0	17.2
Actinomicetos (UFC × 10 ⁴)/g	9	34	28	34	19	58	40
Bacterias mesófilas (UFC × 10 ⁴)/g	5	4	14	13	17	1	6
Hongos (UFC × 10 ⁴)/g	3	5	6	21	5	3	4
Supervivencia en suelo estéril (días)	35	30	34	31	30	31	32
ADN total del suelo y <i>Brucella</i> por prueba PCR	Positiva						
Nitrógeno total (%)	0.17	0.25	0.25	0.07	0.14	0.25	0.8
Proteínas y nitrógeno (%)	1.0625	1.5625	1.5625	0.4375	0.875	1.5625	5

UFC: unidades formadoras de colonias.

patógenos en suelos (Hutchison et al. 2005). Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo registrado por Morales-Estrada et al. (2016), quienes demostraron la presencia de *Brucella* spp. en heces de vacas y cabras en México. Como resultado de procesos de deflación e infiltración, este material puede contaminar la tierra de pastura al utilizar el suelo como reservorio. Por su parte, Li et al. (2015) registraron un porcentaje significativo de suelo contaminado por ADN de *B. melitensis* en excretas de cabras en una zona endémica de brucelosis en Pakistán. Sin embargo, tanto Hutchinson et al. (2005) como Li et al. (2017) realizaron sus aislamientos en suelo urbano y suburbano, y manejaron como factor de riesgo la cercanía a un mercado de venta de animales y un área de sacrificio.

En contraste, el tipo de suelo analizado en este estudio fue agrícola en su totalidad, donde es común observar el paseo itinerante de hatos de cabras. Estas malas prácticas agropecuarias son el factor de riesgo principal, conforme a lo sugerido por Cruz Aviña et al. (2021a, 2022). Se ha registrado una supervivencia para *B. abortus* de hasta 100 días como bioaerosol, así como su empleo como arma biológica por su amplio potencial de infección (Kuzdas y Morse 1954, Whatmore y Foster 2021). En este sentido, las características climáticas comunes de esta zona (tolvaneras y remolinos durante casi todo el año) hacen que la formación de bioaerosoles sea altamente factible (Cruz-Aviña et al. 2021b).

Por su parte Franz et al. (1997) evidenciaron que *Brucella* spp. sobrevive en el suelo y el polvo durante semanas. Por ejemplo, *Brucella abortus* sobrevive en fetos abortados hasta 135 días en invierno y más de dos meses en verano (WOAH 2016). Si los fetos están a la sombra, su supervivencia llega hasta seis meses (Corbel y Wray 1975). Asimismo, *B. abortus* puede sobrevivir hasta 66 días en suelo húmedo cuando la humedad aumenta a 90 % (Nicoletti 2001). Por el contrario, la luz del sol y altas temperaturas provocan un efecto negativo sobre la supervivencia de *B. abortus* en el ambiente suelo (Jones et al. 2010).

En nuestro experimento, *Brucella melitensis* M16 y *B. abortus* S19 sobrevivieron hasta 120 días en promedio a 20 °C, lo que supera lo expuesto por Nicoletti (2001). Esto indica que las condiciones ambientales de la región en estudio desempeñaron un papel importante, ya que se trata de un desierto semifrío con bajas temperaturas y clima seco, por lo que reúne las condiciones ambientales ideales para la persistencia de *Brucella* (Cruz-Aviña et al. 2022) De igual manera, la prevalencia de *Brucella* en el suelo es uno de los factores de riesgo para su propagación a animales silvestres (i.e., anfibios, reptiles, roedores, cánidos, etc.) y para la interfaz ganado-fauna silvestre-humano y medio ambiente (agua natural) según refieren Cruz-Aviña et al. (2021a, b, 2022).

El ADN bacteriano es liberado activamente en el medio de las células vivas o pasivamente en el medio de las células muertas (Whatmore y Foster 2021). Se registra autólisis de las células bacterianas y liberación de contenidos intracelulares, incluido el ADN (Palmen y Hellingwerf 1995, 1997). El ADN bacteriano persiste en el suelo durante un largo periodo cuya duración depende de la disponibilidad de enzimas de degradación y el tipo de suelo (DeSalle et al. 1992, Smith et al. 2018).

En el suelo, las moléculas de ADN se adsorben y los coloides minerales permiten o impiden su degradación enzimática, particularmente por ADNasas (Romanowski et al. 1991). Los suelos analizados en esta investigación son de origen volcánico, cineríticos y muy arenosos (Solonchak), lo que facilita la deflación e infiltración. Adicionalmente (como se mencionó antes), la zona es un desierto semifrío con temperaturas invernales de hasta -8°C , lo que favorece la supervivencia de *B. melitensis* en el lugar. De forma similar, los cationes divalentes promueven la adsorción de ADN.

En el presente estudio, la arena, el pH y la materia orgánica que se encontraron en el suelo estuvieron asociados positivamente con la prevalencia de *Brucella* spp., y las muestras obtenidas en el sitio de estudio correspondieron a suelos formados por arena. Según lo establecido por Lorenz y Wackernagel (1994), los suelos arenosos están compuestos principalmente por arena, es decir, fragmentos de rocas y minerales. Estos suelos presentan una textura granular, son secos, tienen un drenaje rápido y suelen ser poco fértiles. En contraste, los limos tienen partículas con tamaños que fluctúan entre 0.002 y 0.05 mm, mientras que las arcillas cuentan con partículas de tamaño ≤ 0.002 mm. Por lo tanto, la arena puede ser hasta 100 veces mayor en tamaño que los limos y las arcillas, lo que facilita su capacidad de infiltración, tal como señalan también Levy-Booth et al. (2007).

Los suelos ácidos adsorben una mayor proporción de ADN que los alcalinos (Stotzky 2000); sin embargo, *Brucella* spp. prefiere los ambientes alcalinos para su sobrevivencia, ya que en el medio ácido no persiste (Cruz-Aviña et al. 2021a). En este estudio, la sobrevivencia de *Brucella* spp. in vitro fue de hasta 120 días en muestras compuestas de suelo arenoso salino (Cruz-Aviña et al. 2021b, 2022).

Asimismo, se ha establecido que un suelo alcalino es aquel que contiene azufre, calcio, magnesio, manganeso y sodio en mayor proporción o en concentraciones mayores que otros compuestos (FAO 2020). En este estudio, los elementos óxido de sodio (Na_2O), óxido de magnesio (MgO), trióxido de azufre (SO_3) y óxido de

hierro III (Fe_2O_3) en suelo no mostraron asociación con la prevalencia de *B. melitensis*, en tanto que la concentración de óxido de silicio IV (SiO_2) en el ambiente favoreció su persistencia, al igual que cantidades moderadas de óxido de calcio (CaO) y óxido de aluminio (Al_2O_3 ; Fig. 5). Esto contrasta con lo expuesto por Tsuzuki et al. (1994), quienes enfatizaron el papel de la inducción de citotoxicidad y roturas de ADN por cromato (VI), cadmio (II) y mercurio (II) en células resistentes, así como por peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

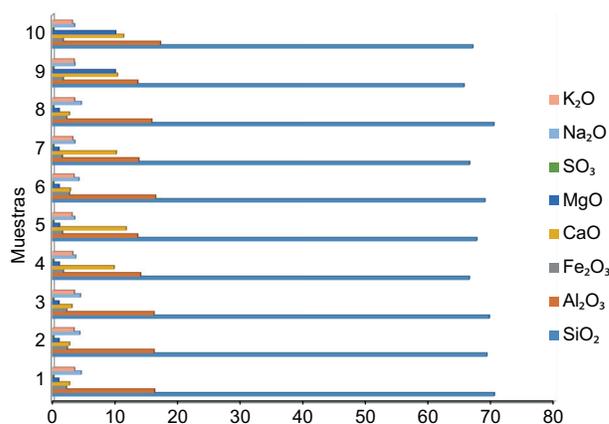


Fig. 5. Composición de óxidos básicos (%) detectados en las muestras de suelo agrícola de la comunidad Emilio Portes Gil, Puebla, México.

En la caracterización física y química del suelo en este estudio no se detectaron metales pesados; sin embargo, la presencia de SO_3 puede vincularse con lluvia ácida o actividad volcánica reciente (hay varios volcanes cercanos al área de estudio y una zona de humeros a 15 km), al igual que la de CaO , también asociado con actividad volcánica reciente. De igual importancia son los resultados de Trevors (1996), quien sugiere que la presencia de magnesio (Mg) y calcio (Ca) en suelo disminuye la eficiencia de adsorción del ADN bacteriano, ya que los cationes de sodio y magnesio entran en competencia y reducen dicha eficiencia (Nguyen y Chen 2007).

En el presente estudio, los elementos del suelo como nitrógeno (N), fósforo (P), hierro (Fe), cobre (Cu) y níquel (Ni) no mostraron resultados positivos o detectables en las pruebas para su asociación potencial con la prevalencia de *B. melitensis*; sin embargo, en algunas comunidades los productores suelen aplicar estiércol de ganado y excretas de aves (que consiguen con facilidad, ya que en la zona existen granjas intensivas de estos animales) como

fertilizantes. En la nutrición de estos animales con alimentos balanceados se agregan dosis de cobre, selenio y zinc que se bioacumulan; por lo tanto, las heces pueden provocar contaminación del suelo por metales pesados (Martín et al. 2021).

El suelo contaminado con metales como níquel, cadmio y cromo degrada el ADN y aumenta el porcentaje de ADNasas (Schmidt 1996). Por otro lado, de acuerdo con la prueba de sobrevivencia realizada en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CICM-BUAP), el suelo agrícola de la comunidad Emilio Portes Gil resultó fuertemente positivo para *B. melitensis* (cepa vacunal) y potencialmente viable para *B. abortus* (cepa vacunal) hasta por 120 días. Esta información concuerda con lo registrado anteriormente por Cruz Aviña et al. (2021a, b, 2022) para una zona cercana (el municipio de Guadalupe Victoria) en la que se ha señalado un problema zoonótico importante por *B. melitensis*; éste ha traspasado los compartimientos ecológicos de la interfaz (ganado-humano-fauna silvestre) y medio ambiente (agua natural de los lagos cráter), volviéndose un problema complejo (es decir *B. melitensis* está presente tanto en las personas de manera crónica y aguda, como en el ganado caprino, la fauna silvestre (peces, anfibios, reptiles y mamíferos pequeños) y el agua de lagos, suelo y aire (bioaerosol) de la región de Guadalupe Victoria, bajo el concepto integrador “una sola salud”, que enfatiza la interdependencia entre la salud humana, la sanidad animal y la salud ambiental, promoviendo un enfoque global basado en la colaboración multidisciplinaria (Beveridge y Koval 1981, FAO 2020, Cruz-Aviña et al. 2022). Por ello, en el futuro se esperan propuestas de estudios y experimentos con un enfoque integral y multidisciplinario. Respecto del suelo de la región de estudio, éste se caracterizó como Solonchak, es decir, salino (hiperhalino) y franco-arenoso. Este suelo soporta gran estabilidad de ADN bacteriano (hasta dos meses), como describieron Romanowski et al. (1993).

Por lo anterior, las posibilidades de sobrevivencia y estabilidad del ADN en la comunidad de Emilio Portes Gil son muy altas debido a este tipo de suelo y las bajas temperaturas, en concordancia con lo reportado por Selenska y Klingmüller (1992). Estos autores destacan también características positivas y asociaciones complejas con la microbiota autóctona, lo cual resulta interesante, ya que en este estudio se encontró un mayor porcentaje de actinomicetos, seguidos por organismos mesofílicos y, en menor porcentaje, hongos, lo cual nos da una idea de la

complejidad de esta rizosfera. En contraparte y de manera alternativa, Ahmed et al. (2017) proponen en su estudio, como factor de riesgo principal, la escasa distancia (< 1 km) del mercado de animales vivos y de los mataderos (rastros de venta de carne), donde los animales infectados por *Brucella* spp. contaminan al ganado sano, utilizando como reservorio al sustrato suelo (y la formación de bioaerosoles), como han destacado también Musallam et al. (2015).

Es válido mencionar que la ausencia de polimorfismo genético de las especies de *Brucella* dificulta su identificación, ya sea por electroforesis, amplificación aleatoria de ADN o PCR-PF (Cloeckert et al. 2000). A diferencia de lo que sucede con otras bacterias patógenas, la identificación de las especies de *Brucella* no se logra mediante la secuenciación directa del ARNr 16S (Moreno et al. 1990) ni con la amplificación de la región del ADN ribosómico situada entre 16S y 23S (Cloeckert et al. 2000). Una de las técnicas más eficientes para la diferenciación entre especies consiste en aprovechar la secuencia de inserción en el cromosoma IS711, generando diferentes tamaños de amplificación según la especie. De esta forma se puede diferenciar *B. melitensis* del resto de las especies de *Brucella* con un rango de 1024-1030 pb (Moreno et al. 1990).

En este estudio se optó por la amplificación de la región *bp26* (Omp28) con resultados satisfactorios. En correspondencia, se utilizó PCR-PF para amplificar el gen *bp26/IS711* (Cloeckert et al. 2000), que codifica para la proteína BP26 (Omp28), un antígeno inmunodominante en la infección de *Brucella* en fauna silvestre y humanos. Esto reafirma que existe un problema zoonótico en la región. De acuerdo con la secuencia de genes en el ARNr 16S, el género *Brucella* está categorizado como una proteobacteria (α -2) cercana filogenéticamente a los grupos *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Rhizobium* y *Rhodobacteraceae* (Moreno et al. 1990).

Es importante destacar que se utilizó un enfoque polifásico para incorporar las detecciones microbiológicas estándar; no obstante, el aislamiento y resiembra del patógeno sigue siendo la prueba de oro confirmatoria en el estudio de la brucelosis (Godfroid 2002, Godfroid et al. 2010, 2011), al igual que técnicas moleculares confirmatorias (basadas en PCR-PF) para examinar los efectos de las diferentes muestras del suelo.

Asimismo, es necesario aclarar que el impacto de la gestión del uso de la tierra, así como las buenas prácticas y regímenes de cultivo sobre las estructuras y comunidades microbianas de los suelos activos, no fueron consideradas en este estudio.

Autores como Suzuki et al. (1998) reconocen el sesgo en métodos basados en PCR-PF en algunos estudios; sin embargo, las comparaciones relativas entre comunidades microbianas basadas en estos métodos se han aplicado rutinariamente como pruebas confirmatorias para el estudio de la diversidad microbiana dentro de entornos complejos, superando de esta forma los sesgos resultantes de la baja tasa de cultivo de la mayoría de los microorganismos encontrados en suelos (Escalante-Lozada et al. 2004). Sin embargo, en este estudio el aislamiento de las muestras de suelo con el medio selectivo *Brucella*-BUAP fue del 100 % respecto de su primoaislamiento, del 68.9 % en cuanto a su purificación y del 57 % con relación a su detección por PCR-PF.

La presencia de *B. melitensis* en suelos agrícolas de México activa las alarmas en el territorio nacional, ya que se le considera como una de las especies más nocivas para la salud humana (Theron y Thantsha 2014) y su capacidad de colonización en otros organismos es notable, por ejemplo, en peces, anfibios, lacertilios y ratones de campo (Cruz-Aviña et al. 2020, 2021a, 2022, Mazlina et al. 2021). Según la Organización Mundial de la Salud la brucelosis es responsable de más enfermedades, miseria y pérdidas económicas que cualquier otra enfermedad animal conocida que afecte a los humanos (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012; SEMARNAT 2013). Esta enfermedad ejemplifica la falta de interacción entre los sectores de salud pública y veterinaria, que la ha convertido en una de las zoonosis más frecuentes en el mundo (Cruz-Aviña et al. 2017, 2022). Su presencia en suelo agrícola, donde la interacción con los agricultores es constante, es de vital importancia para considerar la brucelosis como enfermedad prioritaria en los planes de manejo de zonas afectadas con este patógeno. Por esta razón debe destacarse que las cepas de referencia *B. abortus* S19 y *B. melitensis* M16 son parte importante de los programas gubernamentales de control y erradicación de brucelosis de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en el área de estudio. De ahí la importancia de este estudio y la utilización de estas especies de manera vacunal como controles.

CONCLUSIONES

Este es el primer registro de aislamiento de *B. melitensis* en suelos agrícolas en México. Se pudo aislar y confirmar la presencia de este microorganismo en suelo de una región endémica para brucelosis en Puebla.

Se determinó la presencia de *B. melitensis* con una eficacia del 100 % en el primoaislamiento, 69.8 % en el proceso de resiembra y purificación del ADN bacteriano, y 57 % en pruebas confirmatorias por PCR-PF.

AGRADECIMIENTOS

Este es un homenaje póstumo a la primera autora, Elsa Castañeda, quien falleció durante el proceso de revisión del presente manuscrito, y dedicó muchos esfuerzos a esclarecer la incidencia de *Brucella* en el sistema suelo como ecosistema. Del mismo modo, los autores agradecen la retroalimentación recibida por parte de los habitantes de la comunidad de estudio (Emilio Portes Gil, Puebla), y de igual manera agradecen a las autoridades sanitarias que facilitaron información relevante. Un especial reconocimiento a los revisores anónimos, por sus recomendaciones y sugerencias. Este trabajo forma parte de un proyecto de colaboración entre el segundo autor y los cuerpos académicos de la BUAP: Patogenicidad Bacteriana CA-309 y Producción Animal CAPA-11.

REFERENCIAS

- Aguilar X.F., Nymo I.H., Beckmen K., Dresvyanikova S., Egorova I. y Kutz S. (2022). Brucellosis in the Arctic and northern regions. En: Arctic one health (Tryland M., Ed.). Springer, Alemania, 227-267. https://doi.org/10.1007/978-3-030-87853-5_10
- Ahmed R., Muhammad K., Rabbani M., Khan M.S., Anjum A.A., Muhammad J., Ahmed J., Muhammad K., Rabbani M., Khan M.S., Anjum A.A. y Muhammad J. (2017). Risk factors associated with the prevalence of soil borne *Brucella* species detected by metagenomics approach in Punjab, Pakistan. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 27 (6), 1888-1895.
- Almuneef M., Memish Z.A., Balkhy H.H., Alalem H. y Abutaleb A. (2004). Ventilator-associated pneumonia in a pediatric intensive care unit in Saudi Arabia: A 30-month prospective surveillance. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 25 (9), 753-758. <https://doi.org/10.1086/502472>
- Alton G.G., Jones M., García-Carrillo C. y Trenchi D.M.V.A. (1972). *Brucella melitensis* Rev-1 and *Brucella abortus* vaccines in goats: Immunity. *American Journal of Veterinary Research* 33 (1), 1747-1756.
- Alton G.G., Jones L.M. y Pietz D. (1976). Técnicas de laboratorio en la brucelosis. 2da ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, 175 pp.

- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. y Verger J.M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. Institute National de la Recherche Agronomique, París, Francia, 192 pp.
- Beveridge T.J. y Koval S.F. (1981). Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Applied and Environmental Microbiology* 42 (2), 325-335. <https://doi.org/10.1128/aem.42.2.325-335>
- Blum S.A., Lorenz M.G. y Wackernagel W. (1997). Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *Systematic and Applied Microbiology* 20 (4), 513-521. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(97\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(97)00148-8)
- Bouyoucos G.J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal* 54 (5), 464-465. <https://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>
- Chen C.Y., Nace G.W. e Irwin P.L. (2003). A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* 55 (2), 475-479. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00194-5)
- Cloekaert A., Salih-Alj Debarh H., Vizcaíno N., Saman E., Dubray G. y Zygmunt M.S. (1996). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* *bp26* gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *Federation European Medical Society Microbiology Letters* 140, 139-144. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08327.x>
- Cloekaert A., Grayon M. y Grepinet O. (2000). An IS711 element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7 (1), 835-839. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.5.835-839.2000>
- Corbel M.J. y Wray C. (1975). The effect of natural infection with *Salmonella urbana* on the serological status of cattle in relation to tests for brucellosis. *British Veterinary Journal* 131 (3), 324-334. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)35289-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)35289-2)
- Corbel M.J. (2006). Brucellosis in humans and animals. World Health Organization, Ginebra, Suiza, 89 pp.
- Cruz-Aviña J. R., Castañeda-Roldán E.I., Álvarez-González C.A., Nieves-Rodríguez K.N. y Peña-Marín E.S. (2020). Aislamiento de *Brucella melitensis* en el charal *Poblana letholepis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) del lago cráter La Preciosa en el centro de México. *Hidrobiológica* 30 (2), 163-171. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n2/cruz>
- Cruz-Aviña J.R., Frometa A.E.N., Roldán E.I.C., Díaz-Larrea J., Núñez-García L.G. y Cabrera R. (2021a). Detección y aislamiento de *Brucella* spp., en lagos Maars, Puebla, México. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research* 4 (4), 5001-5016. <https://doi.org/10.34188/bjaerv4n4-015>
- Cruz-Aviña J.R., Alfonso-González C.A., Peña-Marín E.S., Castañeda-Roldán E.I. y Barrios-Quiroz G. (2021b). Aislamiento y detección de *Brucella* sp. (Proteobacteria) en *Sceloporus megalepidurus* (lagartija espinosa corredora de vientre blanco) de la cuenca oriental, Puebla, México. *Revista Latinoamericana de Herpetología* 4 (1), 56-88. <https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2021.1.172>
- Cruz-Aviña J.R., Roldán E.I.C., Caso L.R., Díaz-Larrea J. y Cabrera R. (2022). Percepción y calidad de vida ambiental en dos comunidades rurales con brucellosis de Puebla, México. *Brazilian Journal of Health Review* 5 (1), 3721-3735. <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n1-320>
- Dadar M., Shahali Y., Fakhri Y. y Godfroid J. (2021). The global epidemiology of *Brucella* infections in terrestrial wildlife: A meta-analysis. *Transboundary and Emerging Diseases* 68 (2), 715-729. <https://doi.org/10.1111/tbed.13735>
- DeSalle R., Gatesy J., Wheeler W. y Grimaldi D. (1992). DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* 257 (5078), 1933-1936. <https://doi.org/10.1126/science.1411508>
- Díaz-Romeau R. y Hunter A. (1978). Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal e investigación en invernadero. Editorial Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica, 68 pp.
- Dominati E., Patterson M. y Mackay A. (2010). A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics* 69 (9), 1858-1868. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2010.05.002>
- Eisenberg T., Hamann H. P., Kaim U., Schlez K., Seeger H., Schauerte N., Melzer F., Tomaso H., Scholz H.C., Koylass M.S., Whatmore A.M. y Zschöck M. (2012). Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied and environmental microbiology* 78 (10), 3753-3755. <https://doi.org/10.1128/AEM.07509-11>
- Escalante-Lozada A., Lagarda G.G., Jiménez A.M. y Zapata F.B. (2004). Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia* 38 (6), 583-592.
- FAO (2020). Portal de suelos de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, París, Francia [en línea]. <http://www.fao.org/soils-portal/about/definiciones/es/> 10/3/2024
- Franz D.R., Jahrling P.B., Friedlander A.M., McClain D.J., Hoover D.L., Bryne W.R., Pavlin J.A., Christopher G.W. y Eitzen E.M. (1997). Clinical recognition

- and management of patients exposed to biological warfare agents. *Journal of American Medical Association* 278 (4), 399-411. <https://doi.org/10.1001/jama.1997.03550050061035>
- García-Carrillo C. (1987). La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. Organización Mundial de Sanidad Animal, París, Francia, 303 pp.
- Godfroid J. (2002). Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties* 21 (4), 277-286. <https://doi.org/10.20506/rst.21.2.1333>
- Godfroid J., Nielsen K. y Saegerman C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal* 51(1), 296-305. <https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.296>
- Godfroid J., Scholz H.C., Barbier T., Nicolas C., Wattiau P., Fretin D. y Letesson J.J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine* 102 (2), 118-131. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.007>
- Godfroid J. (2018). *Brucella* spp. at the wildlife-livestock interface: An evolutionary trajectory through a livestock-to-wildlife “host jump”? *Veterinary Sciences* 5 (3), 81. <https://doi.org/10.3390/vetsci5030081>
- Hayakawa M., Yoshida Y. e Iimura Y. (2004). Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology* 96 (3), 973-981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02230.x>
- Hubalek Z., Scholz H.C., Sedlacek I., Melzer F., Sanogo Y.O. y Nesvadbova J. (2007). Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7 (1), 679-87. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0143>
- Hutchison M.L., Walters L.D., Avery S.M., Munro F. y Moore A. (2005). Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (5), 1231-1236. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.1231-1236.2005>
- INEGI (2022). Sistema para la consulta de información censal 2020. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México [en línea]. <https://gaia.inegi.org.mx/scince2020/6/09/2023>
- ISO (1993). ISO 6887:1993. Microbiology: General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. International Standardization Organization, Ginebra, Suiza [en línea]. <https://www.iso.org/standard/13409.html> 10/3/2024
- Jackson M. (1964). Análisis químico de suelos. Omega, Barcelona, España, 662 pp.
- Janowicz A., De Massis F., Ancora M., Camma C., Patavino C., Battisti A., Prior K., Harmsen D., Scholz H., Zilli K., Giannatale D.E. y Garofolo G. (2018). Core genome multilocus sequence typing and single nucleotide polymorphism analysis in the epidemiology of *Brucella melitensis* infections. *Journal of Clinical Microbiology* 56 (3), e00517-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00517-18>
- Jones J.D., Treanor J.J., Wallen R.L. y White P.J. (2010). Timing of parturition events in Yellowstone bison *Bison bison*: Implications for bison conservation and brucellosis transmission risk to cattle. *Wildlife Biology* 16, 333-339. <https://doi.org/10.2981/09-082>
- Krieg N. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology: The Proteobacteria; the alpha, beta, delta and epsilon proteobacteria. 2da ed. Springer, Nueva York, EUA, 1388 pp.
- Kuzdas C. y Morse E. (1954). The survival of *Brucella abortus*, U.S.D.A strain 2308, under controlled conditions in nature. *College of Veterinary Medicine* 44 (2), 216-28.
- Levy-Booth D.J., Campbell R.G., Gulden R.H., Hart M.M., Powell J.R., Klironomos J.N., Pauls K.P., Swanton C.J., Trevors J.T. y Dunfield K.E. (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry* 39 (1), 2977-2991. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020>
- Li M., Fu Q. L., Zhang Q., Achal V. y Kawasaki S. (2015). Bio-grout based on microbially induced sand solidification by means of asparaginase activity. *Scientific Reports* 5 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep16128>
- Lorenz M.G. y Wackernagel W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiology Reviews* 58 (4), 563-602. <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.563-602>
- Lunge A.G. y Patil A. S. (2012). Characterization of efficient chitinolytic enzyme producing *Trichoderma* species: A tool for better antagonistic approach. *International Journal of Environmental Science and Technology* 1 (5), 377-385.
- MacFaddin J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3a ed. Jones and Bartlett, Filadelfia, EUA, 912 pp.
- Martín J., Barja I., Rodríguez-Ruiz G., Recio P. y García L.V. (2021). Soil pollution by heavy metals correlates with levels of faecal glucocorticoid metabolites of a fossorial amphisbaenian reptile. *Conservation Physiology* 9 (1), coab085. <https://doi.org/10.1093/conphys/coab085>
- Maturin L.J. y Peeler J.T. (2001). Aerobic plate count. En: Food and Drug Administration bacteriological analytical manual (Merker R.L., Ed.). AOAC International, Gaithersburg, EUA, 48-83.

- Mazlina M., Khairani-Bejo S., Hazilawati H., Shaqinah N.N. y Zamri-Saad M. (2021). Antigenic distribution, pathological changes, antibody response and serological detection in non-pregnant goats following experimental infection by *Brucella melitensis*. *Transboundary and Emerging Diseases* 68 (4), 2028-2038. <https://doi.org/10.1111/tbed.13850>
- Morales-Estrada A.I., Hernández-Castro R., López-Merino A., Singh-Bedi J. y Contreras-Rodríguez A. (2016). Isolation, identification, and antimicrobial susceptibility of *Brucella* spp., cultured from cows and goats' manure in Mexico. *Archivos de Medicina Veterinaria* 48 (2), 231-235. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2016000200014>
- Moreno E., Stackebrandt E., Dorsch M., Wolters J., Busch M. y Mayer H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of Bacteriology* 172 (7), 3569-3576. <https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3569-3576>
- Musallam I.I., Abo-Shehadeh M.N. y Guitian J. (2015). Knowledge, attitudes, and practices associated with brucellosis in livestock owners in Jordan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93 (1), 1148-1155. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0294>
- Nelson D.W. y Bremner J.G. (1972). Preservation of soil samples for inorganic nitrogen analyses 1. *Agronomy Journal* 64, 196-199.
- Nguyen T.H. y Chen K.L. (2007). Role of divalent cations in plasmid DNA adsorption to natural organic matter-coated silica surface. *Environmental Science and Technology*, 41 (15), 5370-5375. <https://doi.org/10.1021/es070425m>
- Nicoletti P. (2001). Control, eradication, and prevention. En: Madkour's brucellosis (Madkour M.M., Ed.). Springer, Nueva York, EUA, 280-285.
- Occhialini A., Hofreuter D., Ufermann C. M., al Dahouk S. y Köhler S. (2022). The retrospective on atypical *Brucella* species leads to novel definitions. *Microorganisms* 10 (4), 813. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040813>
- Ollé-Goig J.E. y Canela-Soler J. (1987). An outbreak of *Brucella melitensis* infection by airborne transmission among laboratory workers. *American Journal of Public Health* 77 (3), 335-338. <https://doi.org/10.2105/ajph.77.3.335>
- Olsen S.R., Cole C.V. y Watanabe F.S. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circular No. 939. United States Department of Agriculture (USDA), Government Printing Office, Washington DC, EUA, 22 pp.
- Ortega González M., Rodríguez Martínez C. y Zhurbenko R. (2013). Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 51 (1), 111-121.
- Palmen R. y Hellingwerf K.J. (1995). *Acinetobacter calcoaceticus* liberates chromosomal DNA during induction of competence by cell lysis. *Current Microbiology* 30 (4), 7-10. <https://doi.org/10.1007/BF00294516>
- Palmen R. y Hellingwerf K.J. (1997). Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus*. A review. *Gene* 192 (3), 179-190. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00042-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00042-5)
- Pepper I.L. y Gerba C.P. (2005). Environmental microbiology. A laboratory manual. 2a ed. Elsevier, Nueva York, EUA, 209 pp.
- Quintana J.O., Blandón J., Flores A. y Mayorga E. (1983). Manual de fertilidad para los suelos de Nicaragua. Editorial Primer Territorio Indígena Libre de América, Managua, Nicaragua, 60 pp.
- Ramos-Ramírez L.D.C., Saldaña-Ahuactzi Z., Morales-Lara L., Martínez-Laguna Y. y Castañeda-Roldán E.I. (2020). Isolation and identification of two *Brucella* species from a volcanic lake in Mexico. *Current Microbiology* 77 (1), 3565-3572. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02184-z>
- Rhoades J.D. (1982). Cation exchange capacity. En: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties (A.L. Miller R.H. y D.R. Keeney, Eds.). American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, EUA, 149-157.
- Romanowski G., Lorenz M.G. y Wackernagel W. (1991). Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (4), 1057-1061. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00106.x>
- Romanowski G., Lorenz M. y Wackernagel W. (1993). Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm-adsorption, DNAase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *Molecular Ecology* 2 (4), 171-181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00106.x>
- Sambrook J. y Russell D.W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EUA, 2100 pp.
- Schmidt W. (1996). Influence of chromium (III) on root associated Fe (III) reductase in *Plantago lanceolata* L. *Journal of Experimental Botany* 47 (5), 805-810. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.6.805>
- Scholz H., Hubalek Z. Z., Nesvadbova J. y Tomaso H. (2008). Isolation of *Brucella microti* of soil. *Emerging Infectious Diseases* 14 (8), 1316-1317. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080286>
- Schoonover J.E. y Crim J.F. (2015). An introduction to soil concepts and the role of soils in watershed

- management. *Journal of Contemporary Water Research and Education* 154 (1), 21-47. <https://doi.org/10.1111/j.1936-704x.2015.03186.x>
- Schuppler M., Mertans F., Schön G. y Göbel U.B. (1995). Molecular characterization of no cardio form actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis. *Microbiology* 141 (3), 513-521. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-2-513>
- Selenska S. y Klingmüller W. (1992). Direct recovery and molecular analysis of DNA and RNA from soil. *Microbial Releases* 1 (1), 41-46.
- SEMARNAT (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. Diario Oficial de la Federación, 31 de diciembre.
- SEMARNAT (2013). Norma Oficial Mexicana NOM 138 SEMARNAT/SSA1-2012. Que establece los límites máximos de permisibles para hidrocarburos en el suelo, lineamientos para su muestreo en la caracterización y especificaciones para la biorremediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. Diario Oficial de la Federación, 10 de septiembre.
- Smith E.J., Glicería E., Shi L. y Tech V. (2018). Small bones from dried mammal museum specimens as a reliable source of DNA. *Biotechniques* 30 (1), 732-736. <https://doi.org/10.2144/01304bm04>
- Stotzky G. (2000). Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *Journal of Environmental Quality* 29 (3), 691-705. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900030003x>
- Suzuki M., Rappé M. S. y Giovannoni S. J. (1998). Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11), 4522-4529. <https://doi.org/10.1128/aem.64.11.4522-4529.1998>
- Theron J. y Thantsha M.S. (2014). *Brucella*. Characteristics. En: *Encyclopedia of food microbiology*. 2a ed. (Batt C.A. y Tortorello M.L., Eds.). Academic Press, Nueva York, EUA, 335-339. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00049-5>
- Trevors J. (1996). DNA in soil: Adsorption, genetic transformation, molecular evolution and genetic microchip. *Antonie van Leeuwenhoek* 70 (4), 1-10. <https://doi.org/10.1007/BF00393564>
- Tsuzuki K., Sugiyama M. y Haramaki N. (1994). DNA single-strand breaks, and cytotoxicity induced by chromate (VI), cadmium (II), and mercury (II) in hydrogen peroxide-resistant cell lines. *Environmental Health Perspectives* 102 (3), 341. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s3341>
- Ugalde R.A. (1999). Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes and Infection* 1 (14), 1211-1219. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)00240-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)00240-3)
- Van Donsel D.J., Geldreich E.E. y Clarke N.A. (1967). Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to storm-water pollution. *Applied Microbiology* 15 (6), 1362-1370. <https://doi.org/10.1128/am.15.6.1362-1370.1967>
- Velasco J., Bengoechea J.A., Brandenburg K., Lindner B., Seydel U., González D., Zahringer U., Moreno E. y Moriyon I. (2000). *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infection and Immunity* 68 (6), 3210-3218. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3210-3218.2000>
- Walkley A.J. y Black I.A. (1934). Estimation of soil organic carbon by the chromic acid titration method. *Soil Science* 37 (1), 29-38.
- Wattam A.R., Williams K.P., Snyder E.E., Almeida N.F., Jr Shukla M., Dickerman A.W., Crasta O.R., Kenyon R., Lu J., Shallom J.M., Yoo H., Ficht T.A., Tsoilis R.M., Munk C., Tapia R., Han C.S., Detter J.C., Bruce D., Brettin T.S., Sobral B.W., Boyle S.M. y Setubal J.C. (2009). Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *Journal of Bacteriology* 191 (11), 3569-3579. <https://doi.org/10.1128/jb.01767-08>
- Westerman R.L. (1990). Soil testing and plant analysis. Soil Science Society of America Book Series. Madison, Wisconsin, EUA, 784 pp. <https://doi.org/10.2136/sssabookser3.3ed>
- Whatmore A.M. y Foster J.T. (2021). Emerging diversity and ongoing expansion of the genus *Brucella*. *Infection, Genetics and Evolution* 92 (1), 104865. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104865>
- White J.D. y Ross P.S. (2011). Maar-diatreme volcanoes: A review. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 201 (1-4), 1-29. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2011.01.010>
- WOAH (2016). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). World Organization for Animal Health, San Diego, California, EUA [en línea]. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm 10/3/2024

Yuan T.L. (1958). Determination of exchangeable hydrogen in soils by a titration method. *Soil Science* 88 (3), 164-167.

Zakharova V.Z. (1956). Stability of *Brucella bovis* in Ulyanov region soils [en ruso]. *Ul'yanovsk Agricultural Institute Ul'yanovskiy sel'skokhoz* 4 (1), 329-336.