

Diferenciación rápida de especies del *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* y *Rummeliibacillus* aisladas de miel mediante PCR-RFLP

Ana C. López^{1,2} y Adriana M. Alippi^{1,3*}

¹ Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, calle 60 y 119, s/n, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina. ² CCT La Plata - CONICET; ⁴ Cátedra de Microbiología-Facultad de Ciencias Exactas - UNLP. ³ Investigadora CIC (Prov. Bs. As.) * E-mail: alippi@biol.unlp.edu.ar

INTRODUCCION

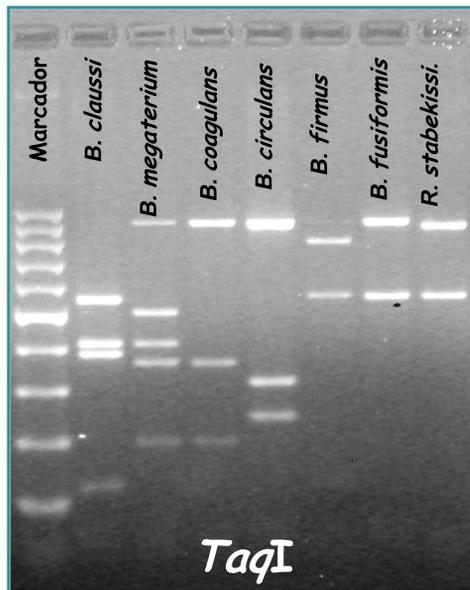
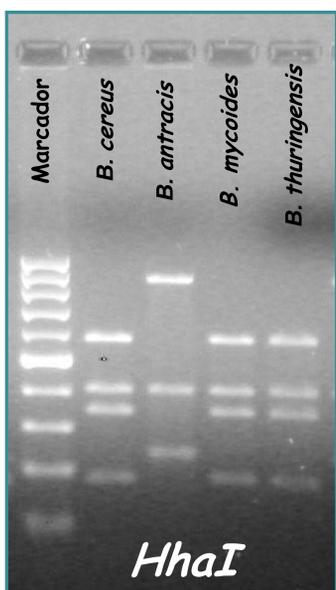
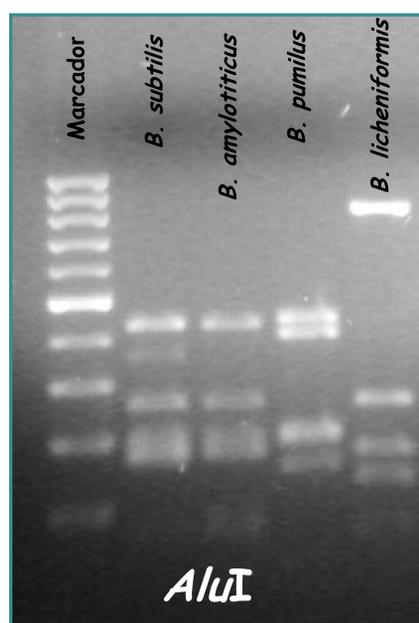
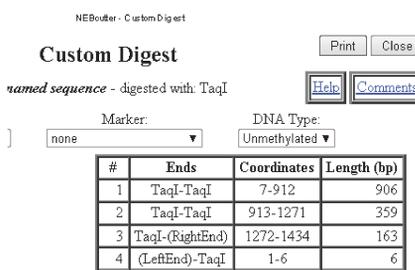
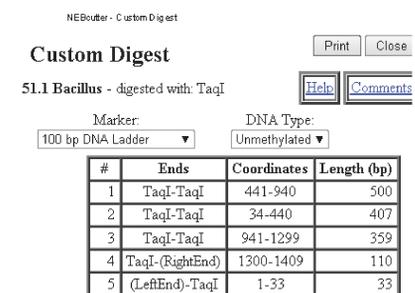
Las bacterias mesófilas del género *Bacillus* y otros géneros relacionados son las especies esporuladas que aparecen con mayor frecuencia en muestras de miel. Una misma muestra puede contener más de una especie de este grupo, por lo que el empleo de medios de cultivo semi-selectivos y diferenciales y pruebas microbiológicas posteriores para llegar a una correcta identificación resulta complicada y laboriosa. Por otra parte, si bien la secuenciación completa del gen 16S rDNA permite la identificación de las distintas especies bacterianas presentes en una muestra, secuenciaciones parciales en el caso de especies estrechamente relacionadas pueden resultar en una identificación errónea. El estudio de los polimorfismos por restricción de la longitud de los fragmentos de ADN generados por la digestión de enzimas endonucleasas en combinación con PCR (PCR-RFLP) permite detectar diferencias entre las secuencias de alelos.

OBJETIVO

Elaborar un esquema de identificación rápida para diferenciar 32 especies de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* y *Rummeliibacillus* citadas en miel mediante el análisis de los distintos perfiles de restricción.

RESULTADOS

Cortes *in silico* generados por la endonucleasa *TaqI*



Patrones de restricción generados por *AluI*, *HhaI* y *TaqI* para diferenciar especies citadas en miel. Se identificaron 107 cepas aisladas de miel como pertenecientes a 21 especies diferentes

MATERIALES Y METODOS

A. Análisis *in silico* de secuencias tipo

Endonucleasas

AluI AG^{*}CT
HaeIII GG^{*}CC
HinI G^{*}ANTC
HhaI GCG^{*}C
RsaI GT^{*}AC
TaqI T^{*}CGA



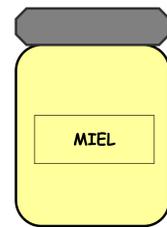
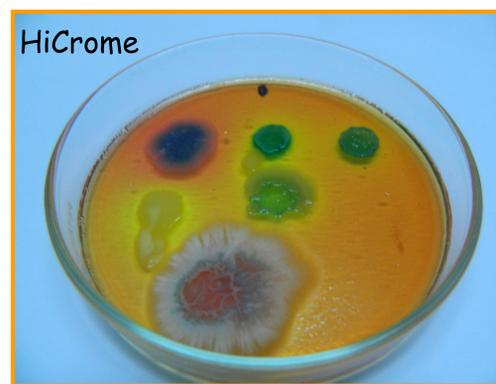
Gen 16S rRNA de 32 especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* y *Rummeliibacillus* (Genbank)

Software nc2.neb.com/NEBcutter2

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	(LeftEnd)-HhaI	1-559	559
2	HhaI-(RightEnd)	1092-1486	395
3	HhaI-HhaI	746-1091	346
4	HhaI-HhaI	564-745	182
5	HhaI-HhaI	560-561	2
6	HhaI-HhaI	562-563	2



B. Análisis de cepas aisladas de miel



AISLAMIENTOS

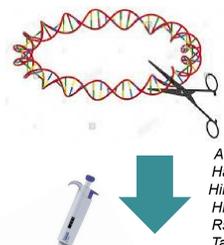


Extracción de ADN

Amplificación del gen 16S rADN



Digestión con endonucleasas



AluI AG^{*}CT
HaeIII GG^{*}CC
HinI G^{*}ANTC
HhaI GCG^{*}C
RsaI GT^{*}AC
TaqI T^{*}CGA

Electroforesis horizontal

CONCLUSIONES

- Los polimorfismos observados por la variación en 4 sitios de reconocimiento permitió seleccionar una combinación de 3 endonucleasas para diferenciar patrones únicos para cada especie.
- El método descrito resultó rápido y efectivo para identificar especies de *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* y *Rummeliibacillus* que han sido citadas en miel.