

**Identificación de bacterias *Pseudomonas* en alimentos utilizando técnicas moleculares.**

CIN2017A10173

Colegio Indoamericano, S.C.

Daniela Mejía Santana

Fátima Velasco Vargas

Biól. Ana Lilia Trejo Moreno

Ciencia Biológicas, Químicas y de la Salud

Biología

Experimental

Tlalnepantla de Baz a 17 de febrero del 2017

## ÍNDICE

Resumen ejecutivo. ....	1.
Resumen .....	3.
Abstract .....	4.
Introducción. ....	5.
Fundamentación teórica. ....	7.
Metodología. ....	8.
Resultados.....	8.
Conclusiones. ....	11.
Aparato crítico.....	12.

## **RESUMEN EJECUTIVO**

### **Identificación de bacterias *Pseudomonas* en alimentos utilizando técnicas moleculares.**

#### **Planteamiento del problema.**

Los métodos de identificación tradicionales pueden llegar a ser tardados y posiblemente no del todo precisas, en cambio, las recientes técnicas de biología molecular han permitido a los científicos identificar especies y cepas sin necesidad de utilizar las técnicas bioquímicas, por medio del análisis de la secuencia de genes. Estas nuevas tecnologías permiten la obtención más rápida y precisa de información molecular de relevancia para el estudio de cepas de interés.

#### **Hipótesis.**

La secuenciación del DNA que codifica para el RNAr 16S será suficiente para identificar hasta la categoría de especie a las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de algunos alimentos.

#### **Justificación.**

Para poder saber qué tipos de bacterias género *Pseudomonas* se encuentran en los alimentos, existen diferentes tipos de métodos de identificación, unos de los más rápidos y precisos es la PCR (Reacción en Cadena Polimerasa) y la detección de secuencia del DNA.

#### **Objetivo general.**

Identificar vía la secuenciación del DNA que codifica para el RNAr 16S, las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de la superficie de algunos frutos y vegetales.

## Metodología de investigación.

En caldo LB se cultivaron alimentos en descomposición seleccionados por los alumnos, posteriormente se tomaron muestras de los cultivos del caldo LB y se colocaron en placas de agar cetrimida para la selección de bacterias de género *Pseudomonas*. Se obtuvo el DNA bacteriano genómico a través de la lisis celular, se amplificó por medio de PCR del gen RNAr 16S de las bacterias aisladas. Finalmente se secuenciaron los fragmentos del DNA para la identificación por medio del análisis *in silico* con BLAST.

## Resultados.

A partir de los alimentos seleccionados, se aislaron cepas utilizando el agar cetrimida el cual es selectivo y permite solamente el crecimiento de las bacterias del género *Pseudomonas*. El análisis posterior de un fragmento del gen que codifica para el RNAr 16S de estas bacterias, amplificado por la técnica de PCR, secuenciado por el método de Sanger y comparado *in silico* con las secuencias de múltiples bases de datos con el programa BLAST indica que tres de las bacterias aisladas pertenecen a la especie *P. putida* (obtenidas desde chayote, papaya y rábano.) y la otra a *P. aeruginosa* (aislada desde pepino).

## Conclusiones.

- ✚ El análisis del RNAr 16S bacteriano es una metodología confiable que permite identificar de manera rápida y precisa las bacterias obtenidas desde diferentes fuentes ya que no hay posibilidad de **ambigüedad** en la secuenciación de los ácidos nucleicos.
- ✚ La técnica de PCR secuenciada por el métodos de SANGER y comparado *in silico* con las secuencias de múltiples bases de datos de programa BLAST indican que 3 de las bacterias aisladas pertenecen a la especie *P. putida* (obtenidas desde chayote, papaya y rábano) y una *P. aeruginosa* (aislada desde pepino).
- ✚ A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda mantener los alimentos en óptimas condiciones de conservación, ya que durante el proceso de descomposición pueden desarrollarse especies

potencialmente patógenas, como es el caso de la *P. aeruginosa* aislada en esta investigación.

### **Referencias bibliográfica.**

-Arai, T., Enomoto S., Goto S., Otake M., Kuwahara S. (1970). *Determination of Pseudomonas aeruginosa by Biochemical Test Methods II. Acylamidase Test, a Modified Biochemical Test for the Identification of Pseudomonas aeruginosa.* Japan. J. Microbiol. Vol. 14 (4), 279-284

- Yojiro, A. et al. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int J Syst Evol Microbiol 4: 1563-89

### **Referencia electrónica.**

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> a 25 de enero del 2017.

## **RESUMEN**

La Microbiología es el estudio de un grupo amplio de seres vivos que incluye a los virus y microorganismos como bacterias, protozoarios y hongos. Existen distintos métodos de identificación de microorganismos, como la tinción diferencial, las pruebas bioquímicas, serológicas y la detección molecular, dentro de estos últimos se encuentra la Reacción en cadena de la Polimerasa o PCR y la detección de secuencia de bases del DNA. El objetivo de la presente investigación consistió en identificar a las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de la superficie de algunos frutos y vegetales, por medio de la secuenciación del DNA que codifica al RNAr 16S. Se realizaron cultivos en agar cetrimida como un medio de identificación para las bacterias del género *Pseudomonas* en los alimentos seleccionados, se extrajo y amplificó el DNA mediante PCR, finalmente se secuenció y utilizó el programa BLAST para identificar a las bacterias. Se identificaron dos especies del género *Pseudomonas*, en tres de los alimentos rábano, papaya y chayote se encontró *P. putida* y en pepino se identificó a *P. aeruginosa*. Se concluye que el análisis del RNAr 16S bacteriano es una metodología confiable que de manera rápida y precisa identifica a las bacterias ya que no existe ambigüedad en la secuenciación de los

ácidos nucleicos. Se sugiere mantener los alimentos en óptimas condiciones de conservación, para evitar el desarrollo de especies potencialmente patógenas, como es el caso de *P. aeruginosa* aislada en este estudio.

## ABSTRACT

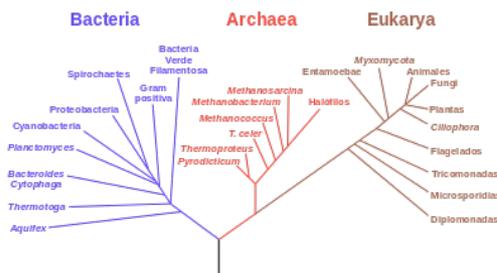
Microbiology is the study of a broad group of living beings that includes viruses and microorganisms such as bacteria, protozoa and fungi. There are different methods for identification of microorganisms, such as differential staining, biochemical tests, serological and molecular detection, among the latter reaction is chain polymerase or PCR and detection of DNA base sequence. The objective of this research consisted of identifying the bacteria of the genus *Pseudomonas* isolated from the surface of some fruits and vegetables through the sequencing of DNA which encodes 16S RNAr. Crops were cetrimide agar as a means of identification for bacteria of the genus *Pseudomonas* in selected food, was extracted and amplified DNA by PCR, finally was sequenced and the BLAST program used to identify the bacteria. We identified two species of the genus *Pseudomonas*, in three radish foods, papaya and chayote found *P. putida* and cucumber identified to *P. aeruginosa*. It is concluded that the analysis of the bacterial 16S RNAr is a reliable methodology that quickly and accurately identifies the bacteria since there is no ambiguity in the sequencing of nucleic acids. It is suggested to keep foods in optimal conservation conditions, to avoid the development of potentially pathogenic species, as in the case of *P. aeruginosa* isolated in this study.

## INTRODUCCIÓN

La microbiología es el estudio de un grupo amplio de organismos microscópicos que existen como células aisladas o asociadas donde se incluyen a virus y a los microorganismos como parásito, bacterias, protozoarios y hongos. Estos microorganismos son capaces de realizar procesos vitales como son el crecimiento y reproducción, así como la generación de energía. Los primeros microorganismos fueron observados en el siglo XVII por Antoni van Leeuwenhoek con un microscopio simple quien realizó dibujos de bacterias como el de los espermatozoides humanos, cocos, bacilos y espirilos. Los microorganismos pueden estar presentes en medios como agua, tierra, alimentos, como carbohidratos, lípidos, proteínas entre otros. (Madigan, M., 2003).

De acuerdo al Árbol de la Vida de Carl Woese, microbiólogo creador de la nueva taxonomía molecular basada en la comparación entre especies de la fracción 16s del ARN ribosomal, se proponen 3 dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*, en los que se incluye a todos los seres vivos. Los dominios *Archeae* y *Bacteria* corresponden a las células procariotas, una de cuyas características es la de carecer de membrana nuclear, estas pueden vivir en hábitats extremos, *Eukarya*, con membrana nuclear y orgánulos más desarrollados los cuales incluyen a plantas, animales, hongos, algas y protozoarios(<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidadehthtml> a 24 de noviembre del 2016).

### Árbol filogenético de la vida



Un medio dónde se encuentra una gran variedad de bacterias son los alimentos. Las bacterias presentes en los alimentos se dividen en bacterias patógenas y no patógenas. Las patógenas pueden causar daños a los organismos que los consumen, como infecciones, intoxicaciones, virosis, entre otros. Algunas de las bacterias patógenas que se pueden encontrar en los alimentos son, *Salmonella tiphy*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Pseudomonas aeuroginosa*, *Pseudomonas putidas*, entre otras (<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2013/02/04/215614.php> a 24 de noviembre del 2016).

Algunas de las bacterias más comunes en alimentos son las de género *Pseudomonas*, la cual es un bacilo flagelado, puede encontrarse en el agua, la tierra, animales o plantas. Las enfermedades producidas por esta bacteria están asociadas a su preferencia por los medios húmedos. En los seres humanos puede encontrarse en las zonas más húmedas del cuerpo, como son las axilas, los oídos y la zona alrededor del ano (<http://pseudomonaeruginosa.blogspot.mx/> a 24 de noviembre del 2016).

Para poder saber qué tipo de bacterias se encuentran en los alimentos, existen diferentes tipos de métodos de identificación de microorganismos (técnicas y procedimientos para establecer una identidad a un organismo), los métodos más utilizados son los de tinción diferencial que tiñen para poder observar la morfología de lo que se está estudiando, también están las pruebas bioquímicas y serológicas las cuales identifican el número de anticuerpos que se producen ante un virus o una bacteria, otro método de identificación son los de detección molecular, dentro de los métodos de detección molecular se encuentran la PCR (Reacción en Cadena Polimerasa) el cuál sirve para poder una gen cuántas veces se requiera, y la detección de secuencia del DNA (<https://microcosmorflores.wikispaces.com/file/.../IDENTIFICACIÓN+MICROBIA> a 15 de noviembre del 2016).

La utilización de técnicas actuales de biología molecular (PCR y secuenciación de los genes del DNAr) sirven para la identificación taxonómica de bacterias de interés como son las del género *Pseudomonas*.

### **Objetivo general.**

Identificar vía la secuenciación del DNA que codifica para el RNAr 16S, las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de la superficie de algunos frutos y vegetales.

### **Objetivos particulares.**

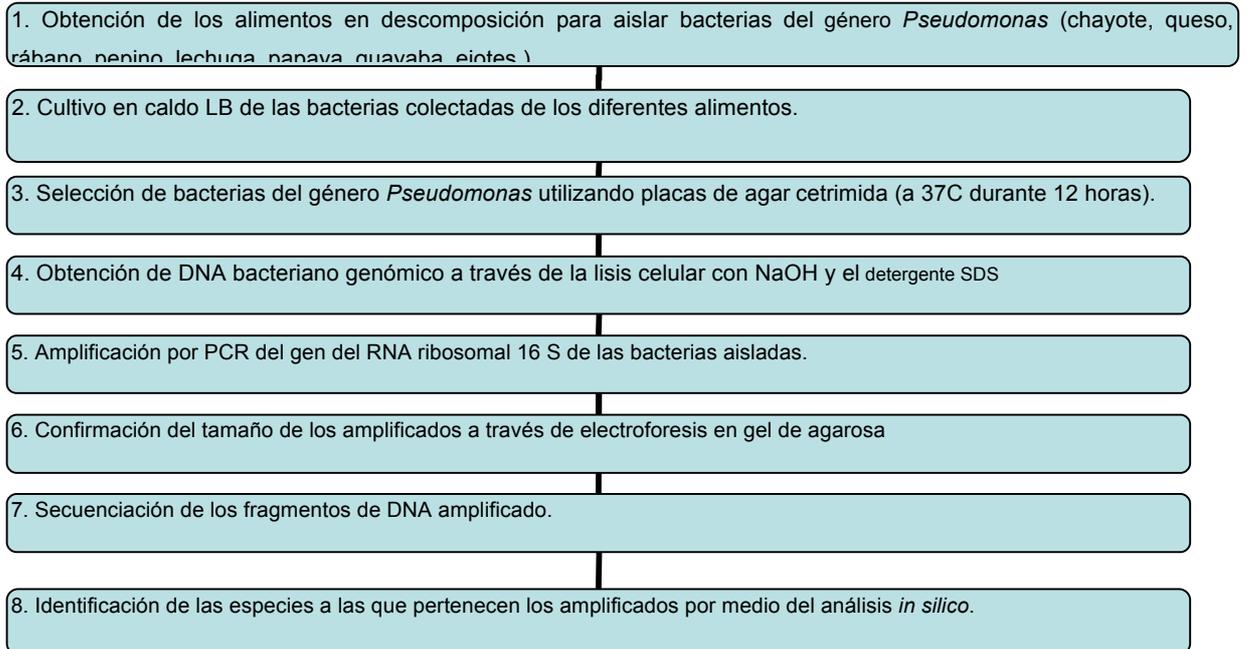
1. Aislar de papaya, rábano, chayote y pepino, bacterias del género *Pseudomonas*.
2. Extraer el ADN bacteriano lisando las células con alta temperatura y en presencia de sosa y detergente.
3. Amplificar mediante la técnica de PCR el gen que codifica para el RNAr 16S de las bacterias aisladas
4. Corroborar la amplificación del DNA a través de electroforesis en gel de agarosa.
5. Secuenciar los genes amplificados al Laboratorio de secuenciación de la FES Iztacala.
6. Realizar un análisis *in silico* con el programa BLAST en internet para conocerá qué especie pertenecen las bacterias aisladas

## **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **Hipótesis.**

La secuenciación del DNA que codifica para el RNAr 16S será suficiente para identificar hasta la categoría de especie a las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de algunos alimentos.

## METODOLOGÍA



## RESULTADOS

Se realizaron cultivos en agar cetrimida ( medio selectivo) de los alimentos pepino, rábano, guayaba, papaya, queso, ejotes, lechuga y chayote, para poder identificar a las bacteria de género *Pseudomonas*.



FIGURA 1. Cultivos en placas de agar cetrimida con crecimiento positivo de los aislados de chayote, rábano, pepino y papaya. Las cajas fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta (37°C durante 12 horas).

Después se tomaron muestras de las cepas para extraer el DNA, posteriormente, se segmentó lisando las células con alta temperatura en presencia de sosa y detergente.

Luego, aplicamos la técnica de PCR para poder duplicar los segmentos del DNA bacteriano extraídos anteriormente, aplicándole el primer adquirido.

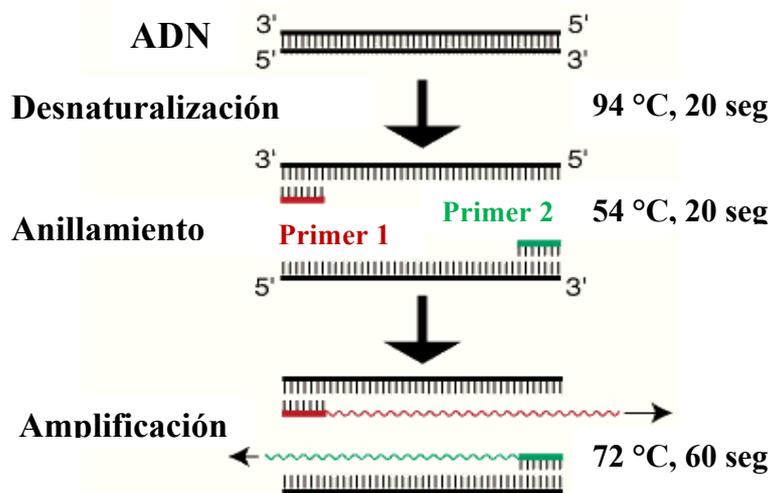


FIGURA 2. Fases en la amplificación por PCR de un fragmento de ADN. Las temperaturas y los tiempos que se mencionan corresponden a 1 de los 30 ciclos que se desarrollaron en este proyecto, de acuerdo a Liu *et al.*, 2002

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel para comprobar la amplificación del DNA.

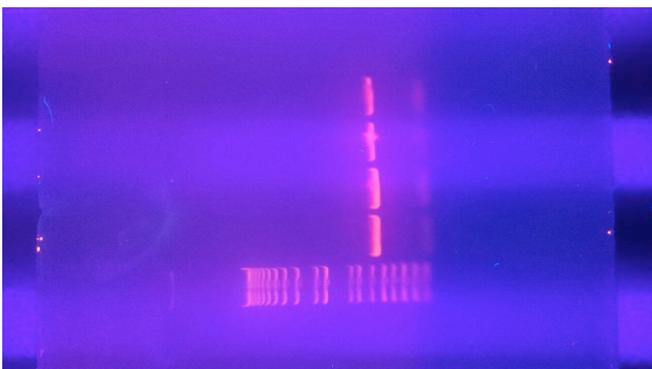


FIGURA 3. Comprobación de duplicación del DNA en gel de agarosa vistas desde un transiluminador de luz ultravioleta.

Se mandaron a secuenciar los segmentos duplicados obteniendo cómo resultados las bases nitrogenadas en cadena y gráfica.

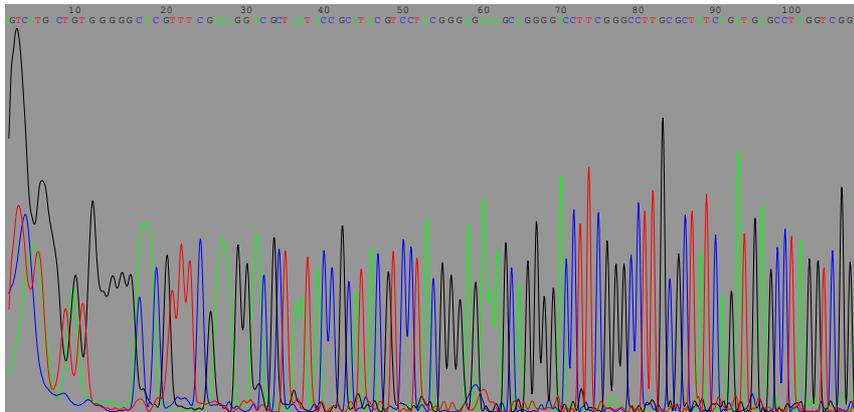


FIGURA 4. Resultados obtenidos de la secuenciación automatizada.

Por medio de las secuencias ya obtenidas, pudimos meterlas al programa informático BLAST, para así poder especificar la especie de las bacterias de género *Pseudomonas*.

```

Ps-1_PseChayote-GS-F_2016-11-29
Pseudomonas putida strain P4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AGTCAATGCTGTGGGGCACGTTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGG
GACCTTCGGGCCCTTCGCCTATCAGATGAGCCTAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACC
AAGGGCAGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGAACTGAGACACGGTCCAGACTCC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGT
GAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGACACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCCTGTTT
TGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGCTAACCTGTGCCCAGCAGCCGGTAATACAGAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCCGCGCTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGG
CTCAACCTGGAACTGCATCAAACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGGATTTCCTGTGT
AGCGG
Ps-1_PseChayote-GS-R_2016-11-29
TATGCCGCTACACAGGAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCAGTTTTGGATGCAGTCCCA
GGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCCAACCTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGGA
TTAACGCTTGACCCCTCTGATTACCAGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTATTCTGCGGTA
CGTCAAAACAGCAAGGTTAACTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCCTTACAATCCGAAGACCTT
CTTCACACAGCGGATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCAATTGTCGAATTCGCCACTGCTGCCTCCCGT
AGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTTACGGATCGTCCGCT
TGGTGGCCATTACCCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCCGAAGCCCGGAAGGT
CCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTCGAAACGTTGTC
Ps-2_PsePapaya-GS-F_2016-11-29
Pseudomonas putida partial 16S rRNA gene, isolate BD18ACC-547
TGTTCGGCTATAGGGGAACGTTTCGAAGGACGCTAATACCCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGG
AGCTTCGGGCCCTTCGCCTATCAGATGAGCCTAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACC
AGGGCAGCATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGAACTGAGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGT
AAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCCTGTTT
GACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACCTGTGCCCAGCAGCCGGTAATACAGAGGGTGCAAG
GTTAATCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCCGCGCTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGG
TCAACCTGGAACTGCATCAAACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGT
AGC
Ps-2_PsePapaya-GS-R_2016-11-29
AAATAAAGCTACACAGGAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCAGTTTTGGATGCAGTCCCA
GGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCCAACCTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGGA
TTAACGCTTGACCCCTCTGATTACCAGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTATTCTGCGGTA
CGTCAAAACAGCAAGGTTAACTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCCTTACAATCCGAAGACCTT
CTTCACACAGCGGATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCAATTGTCGAATTCGCCACTGCTGCCTCCCGT
AGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTTACGGATCGTCCGCT
TGGTGGCCATTACCCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCCGAAGCCCGGAAGGT
CCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTCGAAACGTTGTC
Ps-3_PsePapaya-GS-F_2016-11-29
Pseudomonas putida strain P11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
CTCATGCTATGGGGCACGTTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGG
TCTTCGGACCTCAGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACC
GCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAA
GAAGGCTTCGGATTGTAAGACACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCCTGTTTGA
CGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACCTGTGCCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCCGCGCTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGGCTC
AACCTGGAACTGCATCAAACTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGC
GGTGAATGTC
Ps-3_PsePapaya-GS-R_2016-11-29
AAATAAAGCTACACAGGAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCAGTTTTGGATGCAGTCCCA
GGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCCAACCTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGGA
TTAACGCTTGACCCCTCTGATTACCAGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTATTCTGCGGTA
CGTCAAAACAGCAAGGTTAACTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCCTTACAATCCGAAGACCTT
CTTCACACAGCGGATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCAATTGTCGAATTCGCCACTGCTGCCTCCCGT
AGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACAGTTACGGATCGTCCGCT
TGGTGGCCATTACCCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCCGAAGCCCGGAAGGT
CCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTCGAAACGTTGTC
Ps-4_PseRábano-GS-F_2016-11-29
Pseudomonas putida strain P11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
CTCATGCTATGGGGCACGTTTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGG
TCTTCGGACCTCAGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACC
GCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAA
GAAGGCTTCGGATTGTAAGACACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCCTGTTTGA
CGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACCTGTGCCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCCGCGCTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGGCTC
AACCTGGAACTGCATCAAACTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGC
GGTGAATGTC
Ps-4_PseRábano-GS-R_2016-11-29
CATGCCGCTAACAGGAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCAGTTTTGGATGCAGTCCCGAG
GTTGAGCCCGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGGA
TTAACGCTTGACCCCTCTGATTACCAGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTATTCTGCGGTA
GTCAAACAGCAAGGTTAACTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCCTTACAATCCGAAGACCTT
CTTCACACAGCGGATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCAATTGTCGAATTCGCCACTGCTGCCTCCCGT
CTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGGTCTCAGTTCAGTGTGACTGAACTCAATCCCTCTCAAGACCCA
GTTACGGGATCGTCCCGCTTGGTGGAGCCATTCCTAACCAACCAAGCTAATTCGACCCAGGCTCTT
CGAATACCGTAGAGTCCCGGAAGT
Ps-5_PsePepino-GS-F_2016-11-29
Pseudomonas aeruginosa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
TGGCATGGTGTGAGGGGTACGTCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGG
GGATCTTCGACCTCAGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGGCTAC
CAAGCCGACATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGAACTGAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTG
TGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCCTGTT
TTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACCTGTGCCCAGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTGCA
GGTTAATCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCCGCGCTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCGG
GGCTCAACCTGGAACTGCATCAAACTACTGAGCTAGGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCT
GTGATGGCGGTGAAATGC
Ps-5_PsePepino-GS-R_2016-11-29
AATGAAGCTAACAGGAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTCCCGAG
GTTGAGCCCGGGGATTCACATCCAACCTGCTGAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGGA
TTAACGCTTGACCCCTCTGATTACCAGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTATTCTGTTGTA
GTCAAACAGCAAGGTTAACTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCCTTACAATCCGAAGACCTT
CTTCACACAGCGGATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCAATTGTCGAATTCGCCACTGCTGCCTCCCGT
CTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGGTCTCAGTTCAGTGTGACTGAACTCAATCCCTCTCAAGACCCA
GTTACGGGATCGTCCCGCTTGGTGGAGCCATTCCTAACCAACCAAGCTAATTCGACCCAGGCTCTT
CGAATACCGTAGAGTCCCGGAAGT

```

FIGURA 3. Secuencias obtenidas de las bacterias aisladas del chayote, papaya, rábano y pepino, las bacterias aisladas pertenecen a las especies *Pseudomonas putida* (chayote, papaya y rábano) y *Pseudomonas aeruginosa* (pepino).

## **Anàlisis y discusiòn.**

Las recientes técnicas de biología molecular han permitido a los científicos identificar especies y cepas sin necesidad de utilizar las técnicas bioquímicas, por medio del análisis de la secuencia de genes que permiten la obtención más rápida y precisa de información molecular. La utilización de la PCR con fines taxonómicos se complementa con el estudio de secuencias de genes específicos. La secuencia del gen de la subunidad ribosomal 16S es un marcador molecular ampliamente utilizado en la taxonomía molecular y de su secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (Rodicio, M. y Mendoza, M., 2004).

En este trabajo se identificaron dos especies del género *Pseudomonas* por medio de la combinación de los métodos tradicionales con las nuevas tecnologías moleculares. El aislamiento de las bacterias del género *Pseudomonas* a partir de los alimentos analizados fue posible por medio del uso del medio selectivo de agar cetrimida, sin embargo este medio no permite la separación a nivel de especie por lo cual la utilización de las técnicas moleculares de aislamiento del ADN genómico, ampliación del ADN correspondiente al gen de la subunidad del RNA ribosomal 16S por PCR y el análisis posterior de la secuencia de los amplificados por métodos automatizados nos permitió conocer la identidad a nivel de especie en un tiempo muy breve las bacterias *P. aeruginosa* y *P. putida* son especies de amplia distribución en especies vegetales.

## **CONCLUSIONES**

- ✚ El análisis del RNA ribosomal 16S bacteriano es una metodología confiable que permite identificar de manera rápida y precisa las bacterias obtenidas desde diferentes fuentes ya que no hay posibilidad de ambigüedad en la secuenciación de los ácidos nucleicos.
- ✚ La técnica de PCR secuenciada por el métodos de SANGER y comparado *in silico* con las secuencias de múltiples bases de datos de programa BLAST indican que 3 de las bacterias aisladas pertenecen a la especie *P. putida* (obtenidas desde chayote, papaya y rábano) y una *P. aeruginosa* (aislada desde pepino).

- ✚ A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda mantener los alimentos en óptimas condiciones de conservación, ya que durante el proceso de descomposición pueden desarrollarse especies potencialmente patógenas, como es el caso de la *P. aeruginosa* aislada en esta investigación.

## APARATO CRÍTICO

### Referencia bibliográfica.

-Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2003). *Biología de los Microorganismos*. 10ª edición. Madrid: Prentice-Hall.

- Altschul, S. F. et al. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.

-Arai, T., Enomoto S., Goto S., Otake M., Kuwahara S. (1970). *Determination of Pseudomonas aeruginosa by Biochemical Test Methods II. Acylamidase Test, a Modified Biochemical Test for the Identification of Pseudomonas aeruginosa*. *Japan. J. Microbiol.* Vol. 14 (4), 279-284

- Hongik K., Hiroshi O., Hisatsugu W., Ju-Young P., Yojiro A., (2000). *Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence*. *Int J Syst Evol Microbiol* 4: 1563-89.

- Yojiro, A. et al. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 4: 1563-89

### Referencia electrónica.

[http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html)

[html](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html) a 24 de noviembre del 2016.

<http://pseudomonaeruginosa.blogspot.mx/> a 24 de noviembre del 2016.

<https://microcosmorflores.wikispaces.com/file/.../IDENTIFICACIÓN+MICROBIA>

[NA](https://microcosmorflores.wikispaces.com/file/.../IDENTIFICACIÓN+MICROBIA) a 15 de noviembre del 2016.

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> a 25 de enero del 2017.