

Marcadores moleculares RFLP rRNA 23s para la identificación de especies del género *Bacillus*

Molecular markers RFLP rRNA 23s for the identification of species of the genus *Bacillus*

María Antonieta Quispe-Ricalde^{1*}, Paola Elorrieta-Mamani¹, José Luis Sierra-Herrera²

¹ Departamento de Biología, Escuela Profesional de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Av. La Cultura, 733, Cusco, Perú

² Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

*Autor correspondiente: María Antonieta Quispe-Ricalde, antonieta.quispe@unsaac.edu.pe

RESUMEN

El género *Bacillus* es taxonómico y filogenéticamente complejo, y para definir la pertenencia a este género se necesita la secuencia del gen rRNA 16S y la capacidad de formar esporas en condiciones aeróbicas; sin embargo, estos datos no son suficientes por lo que se han descrito varios marcadores genéticos los que actualmente son utilizados. En el presente trabajo se realiza una búsqueda de sitios de restricción en secuencias del gen rRNA 23S de 31 cepas de distintas especies del género y que han sido obtenidas del banco de datos de libre acceso, lo cual ha permitido definir patrones de corte de cada enzima, patrones que se aplicaron a los datos experimentales de amplificación del gen rRNA 23S seguido de RFLP de 8 cepas del género *Bacillus*. Con la metodología planteada se puede hacer una aproximación a la separación en grupos de especies dentro del género *Bacillus*. La identificación de marcadores moleculares incrementa los datos necesarios para continuar con la formación de subgrupos dentro del género, o la definición de la pertenencia al género *Bacillus*.

Palabras clave: *Bacillus*, rRNA 23S, RFLP.

ABSTRACT

The genus *Bacillus* is taxonomically and phylogenetically complex, and to define membership in this genus the 16S rRNA gene sequence and the ability to form spores under aerobic conditions are needed; However, these data are not sufficient, which is why several genetic markers have been described and are currently used. In the present work, a search for restriction sites is carried out in sequences of the 23S rRNA gene of 31 strains of different species of the genus and that have been obtained from the free access data bank, which has made it possible to define cutting patterns of each enzyme. patterns that were applied to the experimental data of amplification of the 23S rRNA gene followed by RFLP of 8 strains of the genus *Bacillus*. With the proposed methodology, an approach can be made to the separation into groups of species within the genus *Bacillus*. The identification of molecular markers increases the data necessary to continue with the formation of subgroups within the genus, or the definition of membership in the genus *Bacillus*.

Key words: coliforms, *Bacillus*, rRNA 23S, RFLP.

INTRODUCCIÓN

El género *Bacillus* comprende bacterias aeróbicas y anaeróbicas formadoras de esporas, son de forma bacilar, cuya especie tipo es *Bacillus subtilis* (Harwood, 1992). Este género alberga especies de importancia para el hombre desde el punto de vista de la salud, como también desde el punto de vista de su utilidad en biotecnología. Las especies más importantes son *Bacillus anthracis*, agente causal del ántrax, y *Bacillus cereus* responsable de muchas intoxicaciones alimentarias. En biotecnología es importante *Bacillus thuringiensis* utilizado en pesticidas para la agricultura y *Bacillus subtilis* que es productora de enzimas de uso industrial.

Taxonómica y filogenéticamente el género *Bacillus* es un grupo heterogéneo en el que se han descrito hasta 51 especies definidas en base a la secuencia del gen rRNA 16S (Ash, 1991) y a la capacidad de formar de esporas en condiciones aeróbicas. Las especies del género han sido separados en 5 grupos o clusters para unos autores mientras que otros proponen la existencia de 6 grupos (Lui, 2013), esto indica que debe de haber una reclasificación de muchas especies que están dentro del género, y para poder realizar esta reclasificación es necesario definir patrones genotípicos y fenotípicos.

La publicación de datos genéticos y su libre disponibilidad, permiten su uso en estudios que conduzcan a encontrar características genéticas, que contribuyan a restringir su uso para la definición de una especie del género *Bacillus*, entre ellos están los marcadores moleculares de determinadas partes del genoma. El gen rRNA 23S se ha utilizado de forma limitada para identificar a especies bacterianas y no hay datos de su uso

en la filogenia del género *Bacillus*. Por esta razón en el presente estudio se realizaron análisis comparativos de secuencias del gen rRNA 23S, y dentro de esta secuencia se realiza la búsqueda de marcadores moleculares de utilidad, se trata de ubicar sitios de restricción conservados como marcadores y así poder diferenciar a las distintas especies del género *Bacillus*. El gen rRNA 23S puede otorgar datos que contribuyan a su clasificación a diferentes niveles filogenéticos. Para comprobar la utilidad de algunos marcadores moleculares identificados en el gen rRNA 23S, estos han sido aplicados de forma práctica a aislamientos de cepas a partir de muestras ambientales.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas. Ocho cepas del género *Bacillus* se seleccionaron del banco de cepas del laboratorio de genética y biotecnología microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Estas cepas fueron aisladas a partir de aguas de procesamiento de la industria de curtiembre artesanal ubicada en el distrito de Sicuani (Canchis, Cusco), para el proceso de cultivo y mantenimiento en el laboratorio, se siguió lo indicado por Ramírez y Benítez 2013. Las cepas que se analizaron tienen los siguientes códigos: Cr-8, Cr-11, Cr-14, Cr-18, Cr-20, Cr-23, Cr-24, Cr-30.

Extracción y cuantificación de ADN. El ADN fue extraído a partir de 5 ml de cultivo con el kit Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega Biotech), se siguieron las

indicaciones del fabricante en todo el procedimiento. Se cuantificó el ADN extraído por espectrofotometría (Denovix), donde se utiliza 2 μ l de cada muestra, de igual forma para observar la integridad del ADN extraído, se realizó electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en tampón TAE (Tris 0.1M, ácido acético, EDTA M).

Amplificación del gen rRNA 23S. La amplificación del gen rRNA 23S se realizó con los cebadores 1023V (5'GCGTAAAYAGCTCACT3') y 504R (5'SWGTTCGRVAWGGGA3'), de acuerdo a la metodología descrita por Arahal *et al.*, 2002; se preparó la mezcla de reacción de PCR con concentraciones finales de tampón de la enzima a 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 200 μ M, cada cebador 10 μ mol, taq polimerasa 0.5 U y ADN 5 μ g. A 23 μ l de la mezcla de reacción de PCR se agregó 2 μ l de ADN correspondiente a cada cepa. Se utilizó agua como control de la reacción de PCR. Los ciclos de amplificación son 45 segundos de desnaturalización a 94°C, seguido de 45 segundos a 56°C que es la temperatura de hibridación de los cebadores y 1 minuto para el paso de elongación a 72°C, con una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos y una elongación final a 72°C por 7 minutos.

Reacciones de digestión con enzimas de restricción. El polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), fue realizado utilizando las enzimas Hind III, Sac I, Hae III y Rsa I, utilizando las condiciones recomendadas por los fabricantes. Para cada reacción se utilizó 170 μ g totales del producto de PCR, tampón 1X y de enzima se utilizó 1U en cada reacción, en un volumen final de 17 μ l. Las reacciones se incubaron a 37°C en baño maría durante 12 horas.

Electroforesis en geles de agarosa y determinación de los tamaños de los productos de digestión. Para la visualización de la amplificación del fragmento del gen rRNA 23s se utilizó 1% de agarosa en tampón TAE 1X, a 90 voltios constantes por 1 hora. Los fragmentos producidos por las enzimas de restricción fueron separados en geles de agarosa al 1.5%, a 90 voltios constantes por 1.5 horas. La digitalización de las imágenes de los geles se realizó en el fotodocumentador GelDoc (Biorad) y el análisis de los fragmentos amplificados y el cálculo del tamaño de los fragmentos de digestión por las enzimas de restricción fue realizado en el software *Imagen* (BioRad).

Secuencias del gen rRNA 23S. Las secuencias del gen rRNA 23s utilizadas en este trabajo corresponden a secuencias del banco de genes publicadas en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), se utilizaron secuencias del gen completo rRNA 23S.

Análisis de restricción teórico. para el análisis se utilizó el programa MEGA 7.0 (Felsenstein, 1985; Tamura *et al.*, 2007), primero se realiza el alineamiento de las secuencias rRNA 23S descargadas del banco de genes, se ubica la posición del cebador sentido y anti-sentido con el objetivo de restringir al fragmento de amplificación del gen rRNA 23S. En las secuencias se ubica los sitios de restricción que corresponden a las enzimas HindIII (A/AGCTT), SacI (GAGCT/C), HaeIII (GG/CC), RsaI (GT/AC) y se calcula los tamaños de los fragmentos que producen. Se construyen una tabla de cortes y en base a esta información se construye los mapas de restricción teóricos de las secuencias de las diferentes especies del género *Bacillus*. Todas las posiciones que contienen intervalos o posiciones en blanco fueron eliminadas.

RESULTADOS

Utilizando los cebadores 1023V y 504R se amplificó un fragmento de 1927 pb (Fig. 1), el cual se somete a la digestión con las enzimas de restricción. Los cortes producidos fueron resueltos en geles de agarosa y se determinó el tamaño de los mismos, cuando los cortes de cada cepa fueron de tamaño muy cercano, que indica que puede tratarse el mismo tamaño de fragmento, se realiza un promedio y calcula la desviación estándar, con este procedimiento obtenemos los patrones de corte consenso. Cabe indicar que en los geles de agarosa no se pueden ver los fragmentos menores a 50 pb, por lo que estos fragmentos no son considerados en el análisis, así mismo en la medición del tamaño del fragmento se considera un rango de error de 50 pb, producto del límite de resolución que puede discriminar un gel de agarosa al 1.5% (Quispe, 2003).

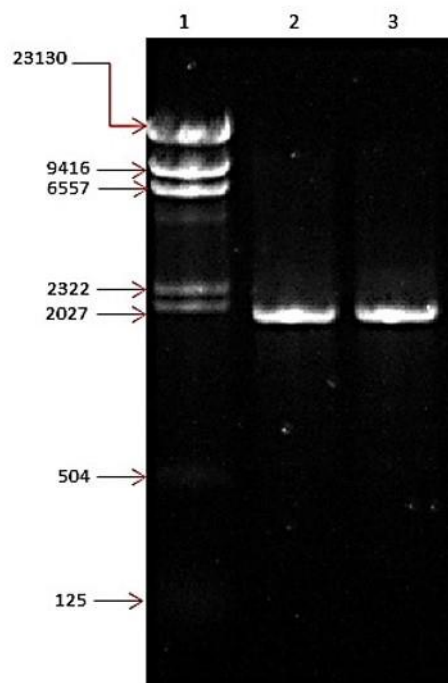


Figura 1. Producto de amplificación del gen rRNA 23S. 1: marcador de tamaño molecular, 2 y 3: producto de 1027 pb del gen rRNA 23S.

RFLP con la enzima de restricción SACI. La enzima de restricción SacI no realiza cortes en el fragmento de amplificación, por lo que el fragmento de amplificación del gen ARNr 23S permanece intacto. Los resultados de la digestión con esta enzima se muestran en la figura 2.

RFLP con la enzima de restricción HindIII. La enzima no tiene las secuencias palindrómicas en el fragmento amplificado del gen rRNA 23S, y no genera ningún corte todas las cepas en estudio (Fig. 3).

RFLP con la enzima de restricción HaeIII. La enzima realiza 4 cortes en el fragmento amplificado del gen rRNA 23S, generando 5 fragmentos en todas las cepas en estudio (Fig. 4). En base a estos se construye un patrón de corte consenso para las 8 cepas analizadas y que está representado por 586.84pb, 504.96 pb, 403.44pb, 268.62 pb, 160.22 pb (Tabla 1).

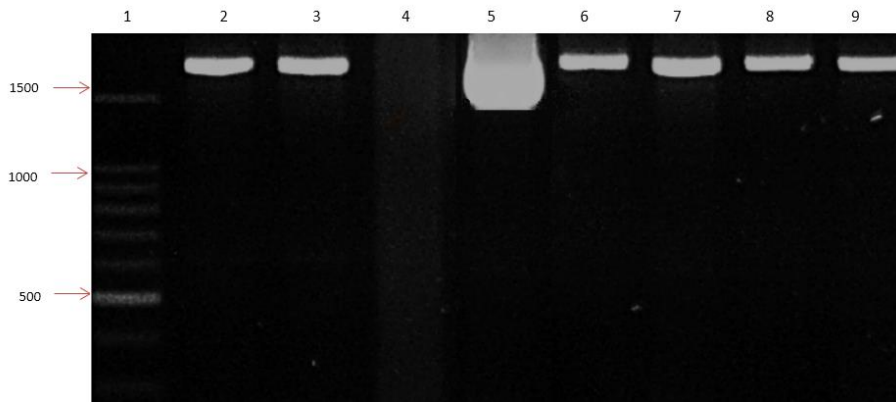


Figura 2. RFLP con la enzima de restricción *SacI*. 1: Marcador de tamaño molecular de 100pb; 2: cepa Cr-8; 3: cepa Cr-11; 4: cepa Cr-14; 5: cepa Cr-18; 6: cepa Cr-20; 7: cepa Cr-23; 8: cepa Cr-24; 9: cepa Cr-30.

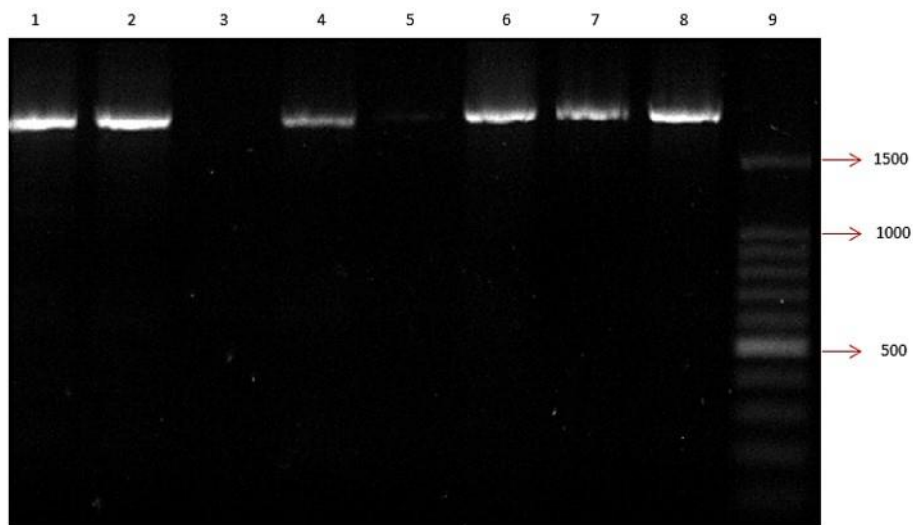


Figura 3. RFLP con la enzima de restricción *HindIII*. 1: cepa Cr-8; 2: cepa Cr-11; 3: cepa Cr-14; 4: cepa Cr-18; 5: cepa Cr-20; 6: cepa Cr-23; 7: cepa Cr-24; 8: cepa Cr-30; 9: Marcador de tamaño molecular de 100pb.

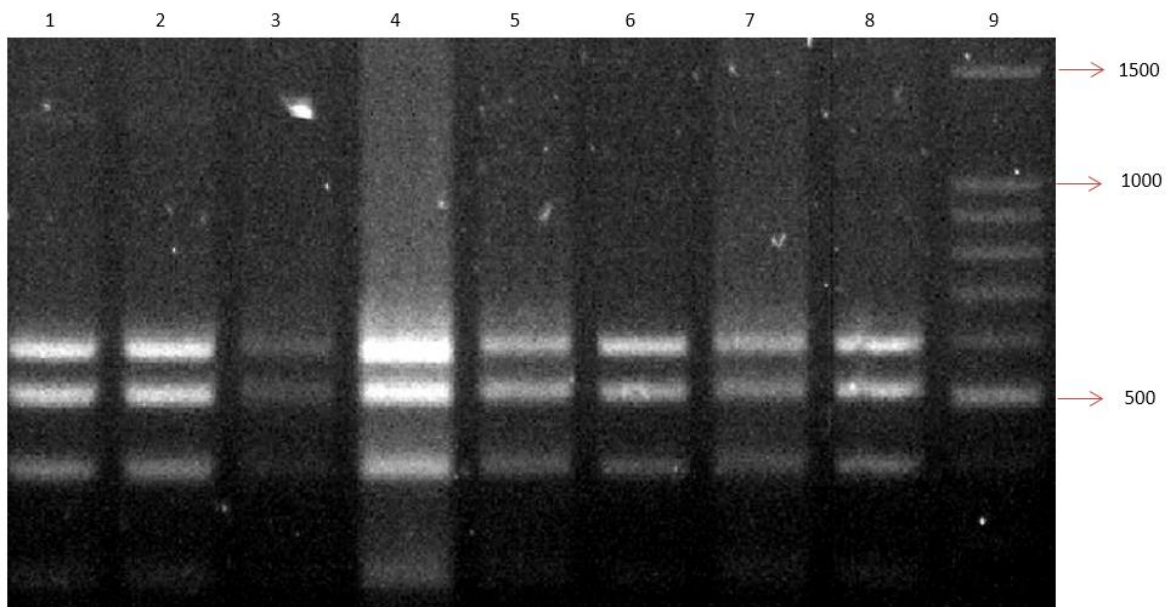


Figura 4. Resultados de RFLP con la enzima *HaeIII*. 1: cepa Cr-8; 2: cepa Cr-11; 3: cepa Cr-14; 4: cepa Cr-18; 5: cepa Cr-20; 6: cepa Cr-23; 7: cepa Cr-24; 8: cepa Cr-30; 9: Marcador de tamaño molecular de 100pb.

Tabla 1. Fragmentos de restricción generados con la enzima *HaeIII*. Se muestran los tamaños en pares de bases (pb) de los fragmentos visibles en el gel de agarosa al 1.5%.

N°	muestra	Tamaño molecular de los amplicones en pb					
1	Cr-8	578.18	500.00	396.54	262.46	162.34	
2	Cr-11	578.18	500.00	396.54	265.55	160.40	
3	Cr-14	595.56	503.59	407.95	262.96	160.40	
4	Cr-18	578.18	503.59	402.63	265.55	159.46	
5	Cr-20	591.15	507.20	405.28	268.18	159.49	
6	Cr-23	586.79	507.20	402.63	262.96	158.83	
7	Cr-24	595.56	510.86	410.65	290.77	160.40	
8	Cr-30	591.15	507.20	405.28	265.55	160.40	
Media +/- SD		586.84+/-7.7	504.96+/-3.8	403.44+/-5	268.62+/-9	160.22+/-1	

Tabla 2. Fragmentos de restricción generados con la enzima *RsaI*. Se muestran los tamaños en pares de bases (pb) de los fragmentos visibles en el gel de agarosa al 1.5%.

N°	muestra	Tamaño molecular de los amplicones en pb					
1	Cr-8	480.48	423.38	318.86	269.90	208.50	130.15
2	Cr-11	471.08	415.39	325.53	266.47	210.73	141.62
3	Cr-14	475.87	420.74	318.86	266.96	212.54	135.57
4	Cr-18	472.34	412.33	319.45	265.55	210.73	138.00
5	Cr-20	477.67	415.39	325.54	268.18	209.74	141.62
6	Cr-23	471.08	415.39	325.53	266.47	208.50	137.59
7	Cr-24	469.45	422.13	315.87	265.77	208.50	141.62
8	Cr-30	466.47	411.47	318.86	267.11	206.31	137.59
Media +/- SD		473+/-4.6	417+/-4.5	321+/-3.9	267.1+/-1.4	209.44+/-1.9	137.97+/-3.9

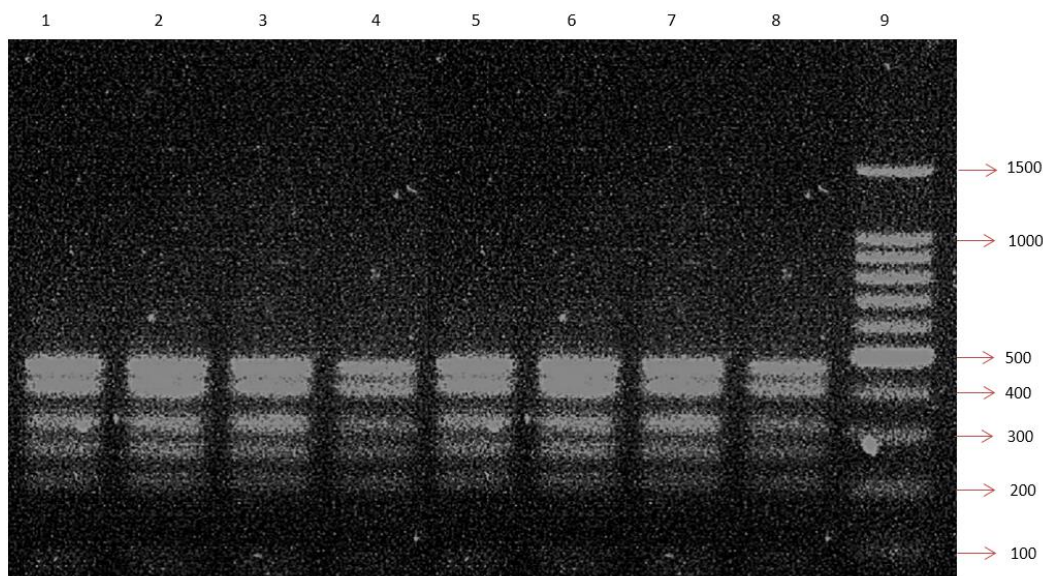


Figura 5: Resultados de RFLP con la enzima de restricción *RsaI*. 1: cepa Cr-8; 2: cepa Cr-11; 3: cepa Cr-14; 4: cepa Cr-18; 5: cepa Cr-20; 6: cepa Cr-23; 7: cepa Cr-24; 8: cepa Cr-30; 9: Marcador de tamaño molecular de 100pb.

RFLP con la enzima de restricción *RsaI*. La enzima realiza 5 cortes produciendo 6 fragmentos cuyos tamaños van desde 137 pb hasta 473 pb (Fig. 5), en la tabla 2 se encuentran el cálculo de los tamaños de los fragmentos. Esta enzima otorga un patrón de corte más complejo y como se puede ver en la figura 5, las cepas en estudio poseen el mismo patrón de corte, por tanto, no existe polimorfismo en este punto de restricción para las cepas estudiadas.

Se han utilizado 4 enzimas de restricción para cortar el fragmento del gen rRNA 23s, y en todos los casos los patrones de corte de las enzimas es el mismo para las 8 cepas analizadas, por lo que es posible que se traten de la misma especie. Estas cepas pertenecen al género *Bacillus*, identidad que fue determinada por homología de la secuencia del gen rRNA 16S,

información corresponde al banco de cepas del laboratorio de Genética y Biotecnología Microbiana.

Análisis teóricos de los perfiles de restricción de especies del género *Bacillus*. La tabla 3 contiene la relación de secuencias del gen rRNA 23S de cepas utilizadas en este estudio, todas ellas pertenecen al banco de genes del NCBI. Cabe indicar que la búsqueda incluye secuencias completas del gen rRNA 23S. Como se indicó antes el producto de amplificación del fragmento del gen rRNA 23S de las cepas Cr-8, Cr-11, Cr-14, Cr-18, Cr-20, Cr-23, Cr-24 y Cr-30 tienen un mismo patrón para las enzimas *HindIII*, *HaeIII* y *RsaI*, por lo que en las figuras 6, 7 y 8 se agrupan todas ellas con el código CR y de esta forma facilitar el análisis comparativo.

La enzima SacI no tiene sitio de restricción en el fragmento analizado en las 31 secuencias descargadas, y lo mismo ocurre en las reacciones de digestión con esta enzima en las 8 cepas del género *Bacillus*. Por lo tanto, esta enzima no ayuda a discriminar a las especies de este género.

La enzima HindIII no tiene sitio de restricción en las 8 cepas CR y tampoco lo tiene en las especies *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. pseudofirmus*, *B. cellulolyticus*, *B. antrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. stearothermophilus*, *B. infantis* y *B. pumilus* (Fig. 6). Esta enzima tiene un solo sitio de restricción en el fragmento del gen rRNA 23S y genera dos fragmentos de corte de 492 pb y 1435 pb en las especies *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. toyonensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* (Fig. 6). Esta enzima realiza una buena discriminación, por lo se puede indicar que las cepas CR pertenecen al primer grupo donde no se encuentra sitio de restricción. El género *Bacillus* es complejo desde el punto de vista bioquímico y genético, alberga a muchas especies con características distintas por lo que su filogenia y clasificación aún está en estudio, Bhandari (2013) divide a las especies de *Bacillus* en dos clados, el clado *subtilis* y el clado *cereus*, tomando en cuenta los resultados de restricción se puede indicar que las cepas CR pertenecen al clado *subtilis*, y descartamos la semejanza con las especies que tienen un sitio de restricción. Este análisis ayuda a acotar la similitud de las cepas CR a un grupo de cepas que no tienen sitio de corte.

La enzima HaeIII produce un patrón de cortes más complejo y está representado en la figura 7, se han establecido 6 patrones de corte en las 31 secuencias del NCBI analizadas, el primer patrón consiste en 5 fragmentos de 600 pb, 512 pb,

398 pb, 269 pb y 148 pb y lo presentan las especies *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. toyonensis*, *B. subtilis*, *B. cellulolyticus*, *B. antrophaeus*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. licheniformis*, *B. infantis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. pumilus*, cabe indicar que este patrón tiene la mayoría de las especies analizadas. El segundo patrón consiste en los fragmentos de 600 pb, 378 pb, 289 pb, 148 pb, 299 pb, 202pb y 11 pb; en este patrón lo más resaltante es que no existe el fragmento de 512 pb presente en el primer patrón, y lo presentan accesiones de *B. megaterium*. Cabe indicar que no tomamos en cuenta los fragmentos pequeños porque no es posible visualizarlos en los geles de agarosa. El tercer patrón lo conforman fragmentos de 600 pb, 512 pb, 271 pb, 148 pb, 257 pb, 127 pb y 12 pb; en este patrón lo más resaltante es la ausencia del fragmento de 398 del primer patrón, y *B. coagulans* es la única especie que sigue este patrón, sin embargo, solo se analizó 1 cepa de esta especie. El cuarto patrón de corte es el conjunto de fragmentos de 600 pb, 512 pb y 815 pb y lo presenta la especie *B. pseudofirmus*. El quinto patrón lo representan el conjunto de fragmentos de 600 pb, 546 pb, 269 pb, 201 pb y 311 pb; en este patrón no está el fragmento de 398 pb presente en el primer patrón, y lo presenta la especie *B. clausii*. El sexto patrón lo conforman fragmentos de 600 pb, 512 pb, 269 pb, 160 pb, 238 pb y 148 pb, y a diferencia del primer patrón no presenta el fragmento de 398 pb y lo presenta solo la especie *B. stearothermophilus*. Pasando a los cortes obtenidos en las cepas CR, la enzima HaeIII produce 5 fragmentos de 578.18 pb, 500 pb, 396.54 pb, 262.46 pb y 162.34 pb; si realizamos la comparación de cortes y fragmentos producidos, las cepas CR cumplen el primer patrón de corte, por lo que estarían relacionadas con las especies que lo presentan.

Tabla 3. Relación de secuencias del gen rRNA 23S de cepas del género *Bacillus* reportadas en el NCBI. Se incluye el código de la cepa y el número de acceso en el NCBI. nd: no hay dato.

Organismo	Cepa	Número de acceso
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	M4-96	KU302815.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FZB42	NR076480
<i>Bacillus anthracis</i>	Sterne	AF267877
<i>Bacillus anthracis</i>	Ames	NR076205.1
<i>Bacillus anthracis</i>	Sterne	S43426.1
<i>Bacillus mycooides</i>	DSM 2048	AJ310097.1
<i>Bacillus mycooides</i>	nd	AF267884.1
<i>Bacillus megaterium</i>	QM B1551	NR076736.1
<i>Bacillus megaterium</i>	NCT-2	CP032527.2
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581	JJMH1000054.1
<i>Bacillus toyonensis</i>	BCT-7112	NR121962.1
<i>Bacillus coagulans</i>	nd	NR03179.1
<i>Bacillus subtilis</i>	68	NR103037.1
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	OF4	NR103029.1
<i>Bacillus cellulolyticus</i>	N-4	NR096818.1
<i>Bacillus antrophaeus</i>	1942	NR076784.1
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	KBAB4	NR076551.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i>	NVH 391-98	NR076523.1
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	NR076345.1
<i>Bacillus clausii</i>	KSM-K16	NR 076255.1
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	nd	X01387.1
<i>Bacillus infantis</i>	NRRL B-14911	NR 121950.1
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	NR 076204.1
<i>Bacillus cereus</i>	nd	AJ310101.1
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14893	AJ310099.1
<i>Bacillus cereus</i>	LMG 6923	AJ310096.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	nd	X89895.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	LMG 7138	AJ310738.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	VCRC B-17	MG745386.1
<i>Bacillus pumilus</i>	TUAT1	AP014928
<i>Bacillus pumilus</i>	SAFR-032	NE 076533.1

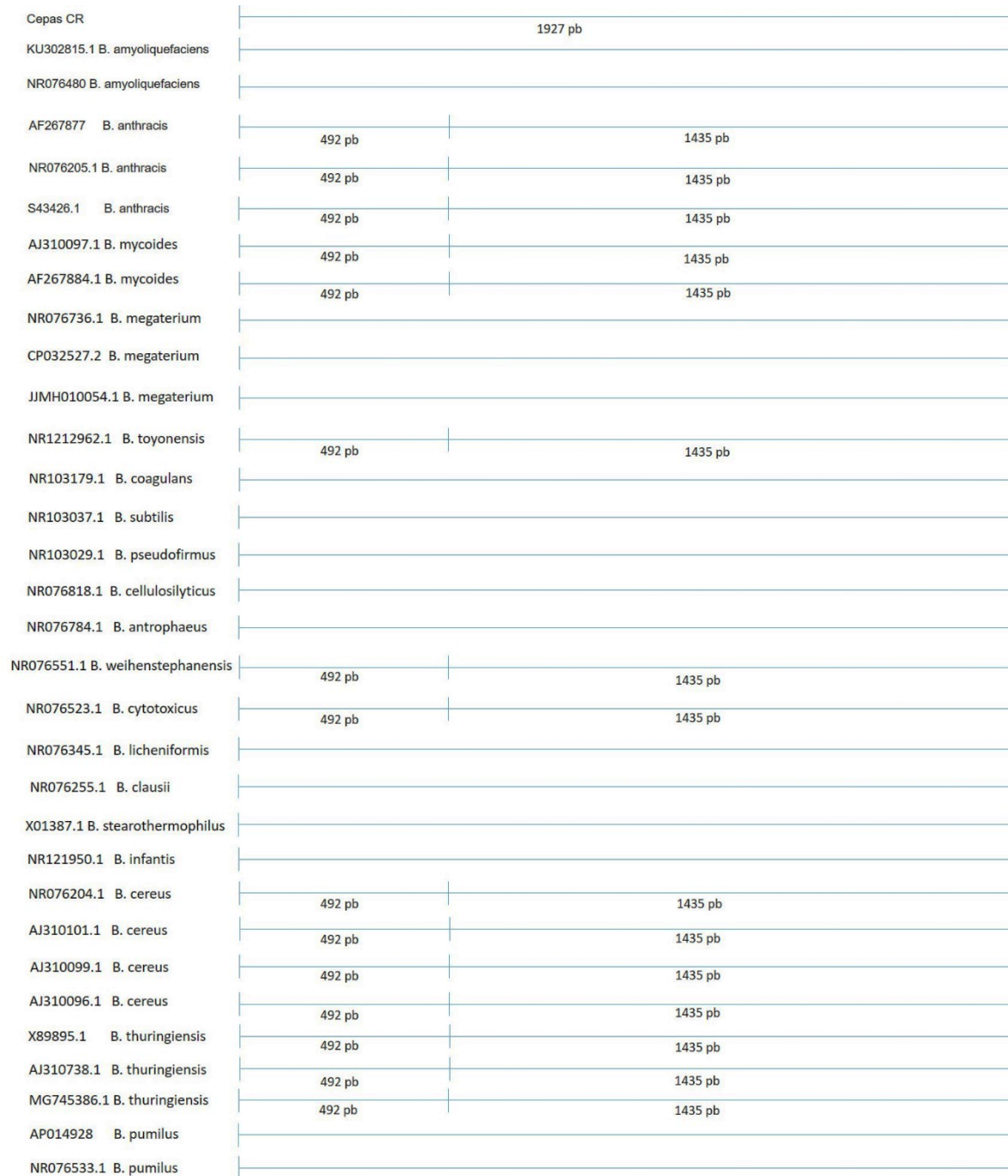


Figura 6. Diagrama de los puntos de restricción de la enzima *Hind III* en las secuencias del gen *rRNA 23S* de 1927 pb. Cepas CR indican las cepas utilizadas en este estudio y sometidas a digestión con la enzima *Hind III*. En cada secuencia analizada indica el código de acceso seguido de la especie.

La enzima *RsaI* también produce un patrón de cortes complejo en las secuencias de las 31 accesiones analizadas (Fig. 8). El primer patrón discrimina 5 fragmentos de 467pb, 411pb, 323pb, 269pb, 209pb y lo presentan las especies *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. toyonensis*, *B. subtilis*, *B. antrophaeus*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. liqueniformis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. pumilus*. El segundo patrón lo forman fragmentos de 467 pb, 411 pb, 323 pb, 269 pb, 149pb, 41 pb, 80pb, 85pb, 33pb, 9pb, y 60pb; se consideran todos los fragmentos de las secuencias, pero los fragmentos pequeños menores a 60 pb no se podrán ver en los geles de agarosa. Lo resaltante del segundo patrón es la

falta del fragmento de 209 pb, y este patrón se observó en 2 cepas *B. megaterium*, la tercera secuencia de *B. megaterium* no es completa, *B. coagulans*, *B. pseudofirmus* y *B. infantis*. El tercer patrón de corte produce fragmentos de 323pb, 269pb, 149pb, 41pb, 85pb, 33pb, 9pb, 75pb, y 60 pb; este patrón también está ausente el fragmento de 209pb, presente en el primer patrón, y solo lo presenta *B. cellulosilyticus*. El cuarto patrón de corte produce fragmentos de 552pb, 411pb, 323pb, 269pb, 209 pb, 41pb, 89pb y 33pb; y lo presenta *B. clausii*. El quinto patrón de corte resuelve los fragmentos de 500pb, 467pb, 323pb, 269pb, 209pb, 41pb, 85pb y 33pb; este patrón de corte presenta la especie *B. stearophilus*. Los cortes con la enzima

RsaI que se observaron en los geles de agarosa y que corresponden a las cepas CR son de 473pb, 417pb, 321pb, 267.1pb, 209pb y 137.9pb, ninguno de los cinco patrones de corte resueltos de forma teórica, se corresponden con lo observado en los geles; sin embargo, haciendo una homología entre los tamaños producidos, las cepas del estudio se asemejan más al primer patrón.

Realizando un descarte tomando en cuenta la presencia o ausencia de algunos fragmentos, se deducen algunos candidatos a los que podrían corresponder la identidad de las cepas CR, y estas son *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*. Todas estas especies pertenecen al clado de *B. subtilis*, por lo tanto, las cepas CR pertenecen a este clado.

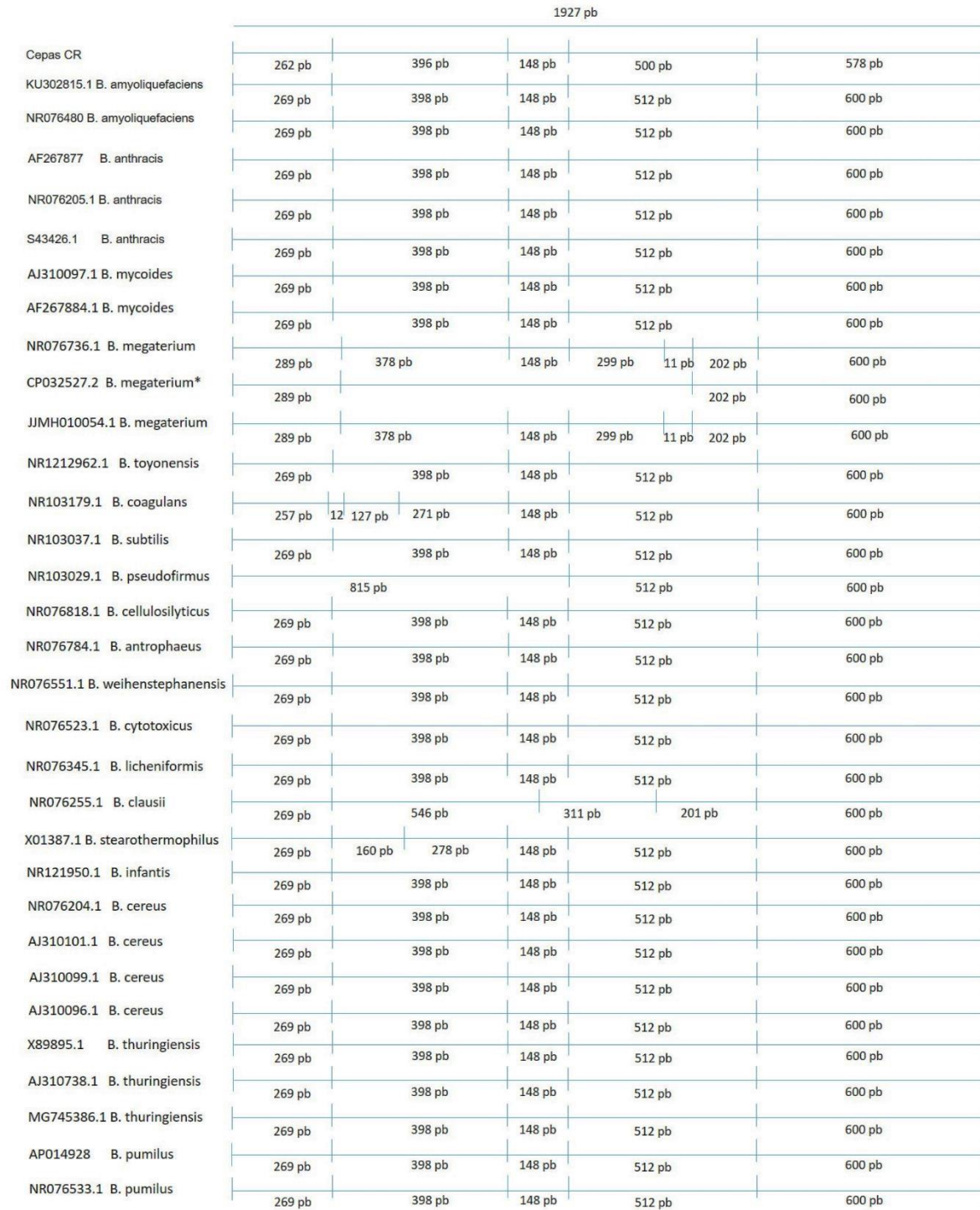


Figura 7. Diagrama de los puntos de restricción de la enzima Hae III en las secuencias del gen rRNA 23S de 1927 pb. Cepas CR indican las cepas utilizadas en este estudio y sometidas a digestión con la enzima Hae III. En cada secuencia analizada indica el código de acceso seguido de la especie.

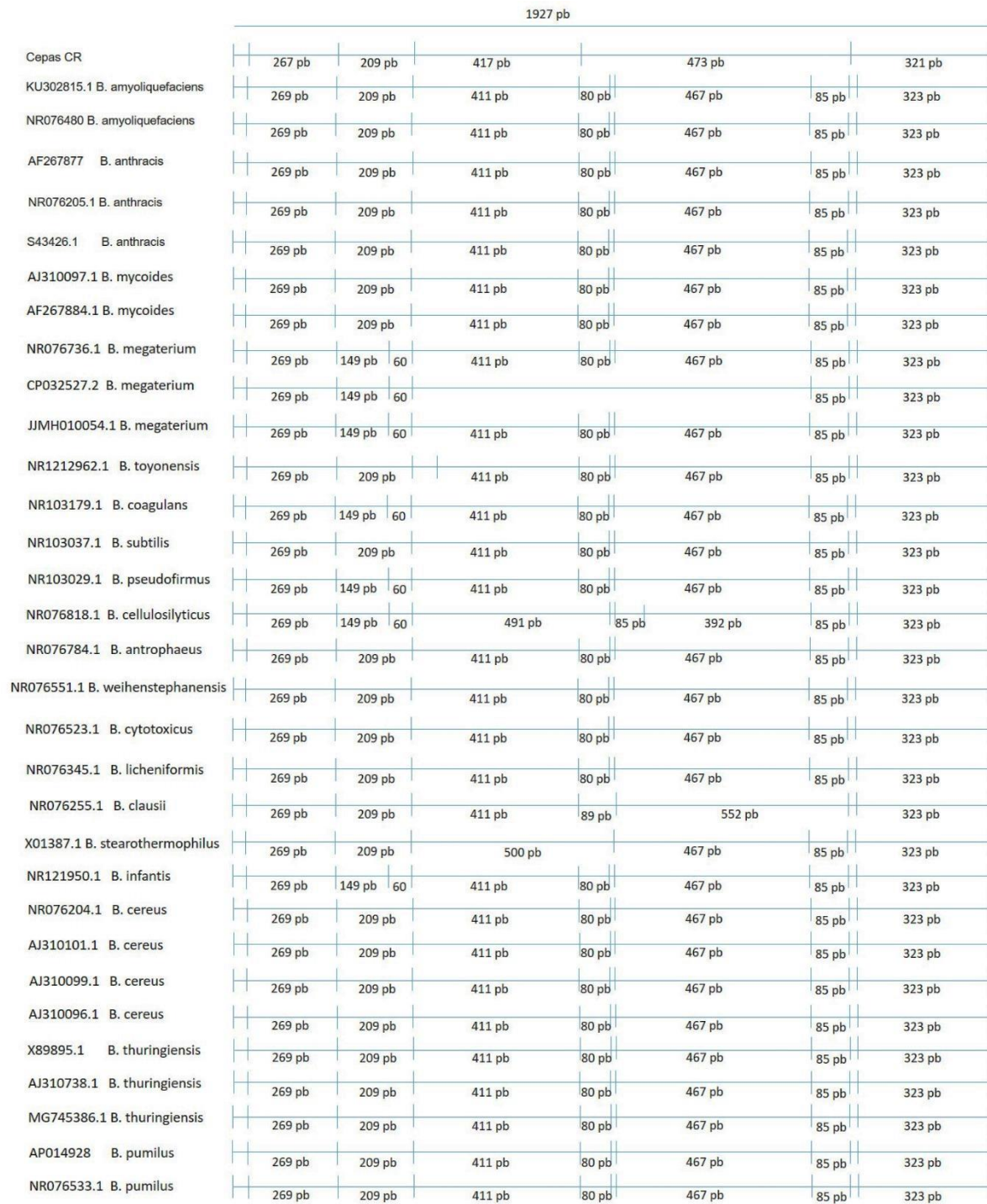


Figura 8. Diagrama de los puntos de restricción de la enzima *RsaI* en las secuencias del gen *rRNA 23S* de 1927 pb. Cepas CR indican las cepas utilizadas en este estudio y sometidas a digestión con la enzima *RsaI*. En cada secuencia analizada indica el código de acceso seguido de la especie.

DISCUSIÓN

Son varios los trabajos de análisis de marcadores moleculares para determinar la pertenencia al género *Bacillus*, y que además se soportan para proponer la reorganización del género, debido a la falta de una adecuada clasificación que ha permitido haya subclasificaciones de especies en el género, que en varios casos resultan repetitivos o con falta de características que las mantengan en su clasificación (Fritze, 2004; Loga & De vos, 2009). Una de estas clasificaciones, después de un análisis filogenético define la división de las especies en dos clados, el

clado de *B. subtilis* y el clado de *B. cereus*, lo resaltante de esta división es que el clado de *B. cereus* contiene varias especies de importancia clínica, lo cual debería de tomarse en cuenta como característica fenotípica que da soporte a esta separación. Las 8 cepas analizadas dentro del marco de los fragmentos de restricción originados por las respectivas enzimas, indica que las cepas podrían pertenecer al clado de *B. subtilis*, más aún porque se trata de bacterias que han sido obtenidas a partir de residuos de la industria de curtiembre, es decir son muestras ambientales. Después de realizar la aproximación a las identidades por comparación de los patrones de corte,

concluimos en que solo puede aproximar al subgrupo clado de *B. subtilis*, con un grupo de especies posibles, la mejora de estos resultados estaría relacionado al uso de más enzimas de restricción y la búsqueda de nuevos patrones moleculares. Sin duda la secuenciación del gen rRNA 23S conjuntamente con el gen rRNA 16S y otros marcadores moleculares como secuencias de proteínas concatenadas (Bhandari, 2013; Zouzheng, 2009.) deben ir en conjunto para determinar la identidad de los aislamientos de cepas de *Bacillus* tanto a nivel clínico como de aislados ambientales, sin embargo, en aquellas regiones del mundo donde la tecnología moderna no está al alcance, la definición de algunos marcadores moleculares ya sea RFLP u otro, son un soporte para poder realizar estudios de aislamiento e identificación bacteriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. & Collins, M.D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl Microbiol* Pp13, 202-206.
- Arahal, D.R., Ludwig, W., Schleife, K.H. & Ventosa, A. (2002). Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 241-249.
- Bhandari, V., Ahmad, N.Z., Shah, H.N. & Gupta, R.S. (2013). Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clados in molecular terms and proposal to limit de placement of new species into the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2712-2726.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology* 94, 1245-1248.
- Harwood, C.R. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trend Biotechnol* 10, 247-256.
- Lui, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., & Shao, Z. (2013). Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS ONE* 8(11): e80097.
- Loga, N.A. & De Vos. (2009). Genus *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Edited by De Vos P, Garrity GM, Joes D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Williams BL. New York: Springer. pp 21-128
- Quispe – Ricalde, M.A. (2003). RAPD y su aplicación al diseño de cebadores para la amplificación de especies de *Leishmania*. Tesis de maestría. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú
- Ramírez A. & Benítez, N. (2013). Tolerancia y reducción de Cr(VI) por *Bacillus cereus* B1, aislado de aguas residuales de una Curtiembre. *Revista de Ciencias*. P.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Zouzheng, E. (2009). Diversity of halóphilas Microorganism in Jiangsu Sal and poliphasic study. Huazhong University.

Presentado: 01/02/2024

Aceptado: 12/03/2024

Publicado: 18/03/2024