

Selección de marcadores housekeeping para la identificación de *Pseudomonas* spp. en alimentos

Tabla R., Simões F., Alvarenga N., Rodríguez-Pinilla J.

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura, Badajoz, España; ² Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras, Portugal.

 rafael.tabla@juntaex.es



INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más diversos, e incluye especies implicadas en el deterioro de alimentos en una amplia variedad de matrices. La identificación a nivel de especie dentro de este género constituye un desafío reconocido debido al alto grado de heterogeneidad genética y a la frecuente descripción de nuevas especies. El gen 16S rRNA —marco estándar para la clasificación bacteriana— proporciona una resolución insuficiente para discriminar especies estrechamente relacionadas de *Pseudomonas*. Por ello, se propone el uso de genes constitutivos (housekeeping) como alternativas más discriminatorias.

MATERIALES & MÉTODOS

1

 **Muestreo**

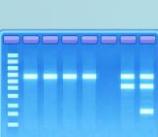
15 quesos de leche de oveja procedentes de 7 queserías de Extremadura (España).

2

 **Aislamiento bacteriano**

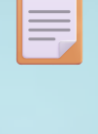
Recuentos en agar cetrimida. 54 aislados presuntivos de *Pseudomonas* spp.

3

 **Amplificación PCR**

Genes housekeeping (*gyrB*, *rpoB* y *rpoD*). Especificidad en gel de agarosa.

4

 **Secuenciación Sanger**

Los amplicones se secuenciaron con cebador forward o reverse.

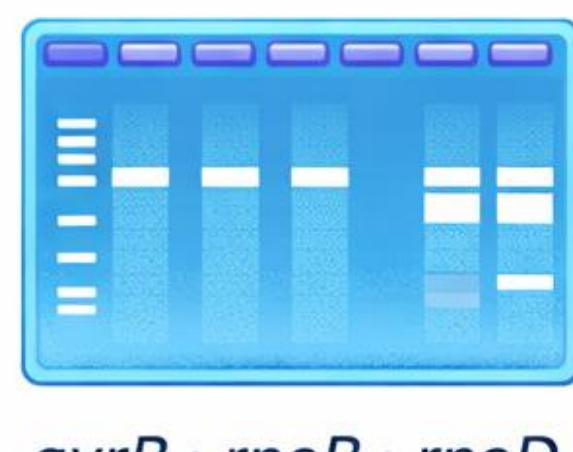
5

 **Análisis taxonómico**

BLAST frente a genomas representativos de NCBI ($\geq 97\%$ identidad, qcov $\geq 95\%$).

 Muestra alimentaria

 Aislamiento bacteriano

 *gyrB* • *rpoB* • *rpoD*

 Secuenciación

 Asignación taxonómica

OBJETIVO



Evaluar el rendimiento de tres marcadores de genes housekeeping (*gyrB*, *rpoB*, *rpoD*) comúnmente utilizados para la identificación de *Pseudomonas* spp., considerando tanto criterios técnicos —éxito de amplificación y especificidad— como la resolución taxonómica, utilizando una colección de aislados asociados a corteza de queso.

CRITERIOS PARA SELECCIÓN DE MARCADORES

La selección de un marcador constitutivo para la identificación de *Pseudomonas* implica equilibrar criterios que compiten entre sí. Ningún marcador optimiza simultáneamente todas las dimensiones:

 **Rendimiento técnico**

– Tasa de éxito de amplificación

– Especificidad de cebadores (banda única vs. múltiple)

– Calidad y cobertura de secuenciación

 **Resolución taxonómica**

– Distancia interespecífica vs. intraespecífica

– Confianza en la asignación de especie ($\Delta\%$ ID)

– Consistencia entre taxones relacionados

RESULTADOS

- rpoB* y *rpoD* mostraron las tasas de éxito de amplificación más altas
- rpoD* mostró un 100% de especificidad en todos los casos analizados.
- rpoB* mostró múltiples productos de amplificación en una proporción relevante de los aislados.
- Las identificaciones de alta confianza variaron notablemente entre los distintos loci
- Algunos taxones estrechamente relacionados no pudieron resolverse mediante ningún marcador individual.

Fig. 1 — Rendimiento de los marcadores

Marcador	Amplificación	Especificidad	Discriminación
<i>gyrB</i>	~94% Alta eficiencia	Alta Banda única	Buena Identificación coherente
<i>rpoB</i>	~98% Alta eficiencia	Baja Múltiples bandas en muchos casos	Moderada Casos no resueltos
<i>rpoD</i>	~98% Alta eficiencia	Alta Banda única	Moderada Casos no resueltos en especies cercanas

DISCUSIÓN

El rendimiento de los marcadores en la identificación de *Pseudomonas* refleja la interacción entre factores técnicos y biológicos. Un marcador técnicamente fiable —aquel que amplifica de forma consistente y produce bandas únicas y limpias— no proporciona necesariamente asignaciones de especie inequívocas en todos los linajes. Esta desconexión entre la eficiencia técnica y la resolución taxonómica es una consideración clave al seleccionar marcadores para la identificación de rutina en microbiología de alimentos.

CONCLUSIONES

- 1

Alta amplificación en los tres marcadores; diferencias marcadas en especificidad entre loci.
- 2

Los marcadores difirieron tanto en rendimiento técnico como en resolución taxonómica.
- 3

Las diferencias observadas ponen de manifiesto la necesidad de evaluar múltiples criterios de forma conjunta.