CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No. 133 30 de Julio del 2005

Por Ricardo Cedeño, M.Sc.
InvestigadorMicrobiología

Caracterización de Comunidades Bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE)

INTRODUCCION

El uso de las técnicas microbiológicas tradicionales no es eficiente para evaluar comunidades bacterianas en muestras ambientales ya que la proporción de células bacterianas cultivables en medios convencionales esta en el orden de 0.1% al 10% de la población total. Por estos motivos, los métodos moleculares estan reemplazando a los métodos tradicionales para el estudio y análisis de comunidades bacterianas.

La electroforesis de geles con gradiente denaturante (DGGE) es una técnica molecular introducida en la ecología microbiana por Muyzer (1993) y ha sido adaptada como una herramienta para determinar la diversidad microbiana en muestras ambientales (Schaefer, 2001). El DGGE se basa en el análisis de la información genética de la bacteria. El DNA es extraído de las muestras y amplificado por PCR con primers 16S rDNA bacteriano.

El presente estudio caracteriza las comunidades bacterianas con la técnica del DGGE. Los perfiles generados son analizados como índices de diversidad para estudiar la dinámica de las comunidades bacterianas en sistemas de cultivo de semi-extensivo e intensivos de camarón durante un ciclo de producción.

METODOLOGIA

El estudio se realizó en dos piscinas abiertas de cultivo semi-intensivo (5 y 3.5 ha) y en una piscina de 0.25 ha de cultivo intensivo bajo invernadero en la zona de Palmar-Península de Santa Elena. La recolección de muestras de agua y sedimento fue realizada durante 17 semanas. Para la extracción de DNA total se uso el método descrito por Smalla et al. (1993) con ligeras modificaciones incluyendo un paso para la purificación del DNA obtenido en el caso del sedimento (PROMEGA-Wizard® PCR Preps DNA Purification System). La amplificación por PCR se realizó por el método descrito por Schaefer et al., (2001).

Los iniciadores empleados fueron el 518R (5´-ATTACCGCGGCTGCTGG-3´), y PRBA338F-GC (5´CGCCCGCCGCGCGCGGC GGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCC TACGGGAGGCAGCAG-3´) complementarios de la región conservada 16S rRNA bacteriano. Para la electroforesis se empleó un equipo C.B.S Scientific. Co con geles de poliacrilamida al 6% y un gradiente químico lineal de 40-60% de denaturante. Electroforesis a 60ºC, por 10 min a 20 voltios y 5h a 150 voltios. La tinción de los geles se realizó con nitrato de plata ($AgNO_3$), y las imagenes fueron analizadas con el programa "Gene Profiler" (versión 4.05) y "Adobe Photo Shop" (versión 7.0).

Índices de diversidad: Los indices de diversidad calculados fueron:

*-Riqueza de especies (S):*Se define como el número de diferentes organismos presentes en una muestra (número de bandas presentes en DGGE). No toma en cuenta la proporción y distribución de cada especie en la comunidad. Se calcula con la siguiente ecuación:

S= # de bandas detectadas

*Indice de Shannon–Weaver:*Esta medida se calcula en base a las bandas de los perfiles obtenidos del DGGE, toma en consideración el número y la intensidad relativa de las bandas en una línea individual (Koizumi, 2003). Se calcula con la siguiente ecuación:

$H` = - \sum Pi. Ln\ Pi$, donde Pi es la intensidad relativa de las bandas en un perfil.

Igualdad u homogeneidad (evenness): Se define como una medida que expresa que tan similar es la abundancia de diferentes especies. Se calcula a partir del índice de riqueza de especies (S) y el índice de Shannon-Weaver (H). Se calcula con la siguiente ecuación:

$E = H / Ln (S)$

RESULTADOS

Los Indices de diversidad calculados durante el ciclo de cultivo son presentados como promedios en la Tabla#1. La riqueza de Especies (S) y el Indice de Shannon-Weaver (H) fueron superiores

Fundación CENAIM – ESPOL-Teléfonos:593-4-2269494.Fax:593-4-2269492.ssonnen@cenaim.espol.edu.ec.www.cenaim.espol.edu.ec

Por Ricardo Cedeño, M.Sc.
InvestigadorMicrobiología

CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No. 133 30 de Julio del 2005

en las muestras de agua con respecto al sedimento para ambos sistemas.

En tanto los valores obtenidos para el Índice de Homogeneidad de especies (E) en nuestro estudio, reveló valores más cercanos a 1 en las muestras de sedimento para ambos sistemas en comparación con las muestras de agua (Tabla#1).

Análisis	Índices de diversidad	Valores Promedio			
		Sistema Intensivo		Sistema Semi-intensivo	
		Agua	Sedimento	Agua	Sedimento
DGGE	Riqueza de Especies (S)	16.65	13.12	19.21	15.99
	Shannon Weaver (H´)	2.105	2.069	2.395	2.261
	Evenness (E)	0.7617	0.8082	0.8177	0.8255

Tabla#1 Indices de diversidad promedio obtenidos para las muestras de agua y sedimento en cada uno de los sistemas semi-intensivo e intensivo.

Al parecer las comunidades microbianas están distribuidas más uniformemente en los sedimentos de las piscinas de cultivo, esto podría deberse a que, en el sedimento, por ser un medio menos cambiante que el agua de cultivo los microorganismos pueden llegar a adaptarse más fácilmente y cumplir un rol funcional dentro del sistema.

Las variaciones en todos los Índices a través del tiempo en este estudio reflejan la dinámica de las comunidades bacterianas influenciado probablemente por variaciones ambientales del sistema. Las diferentes especies bacterianas de la comunidad pueden adaptarse a estos cambios y nuevas condiciones ambientales. Por esta razon, la composición de la comunidad bacteriana cambia gradualmente con la aparición y desaparición de especies bacterianas en el tiempo (Schauer, 2003; Riemann & Middelboe, 2002).

CONCLUSIONES

- La técnica del DGGE demostró ser una herramienta para el estudio de la diversidad bacteriana en diferentes ambientes de nuestro estudio
- Las condiciones ambientales a las que esta sometido cada uno de los sistemas de cultivo, influye sobre la diversidad de las comunidades bacterianas lo que se refleja en los Índices de diversidad calculados.
- Las comunidades bacterianas en agua y sedimento mostraron en general una diversidad más alta en el sistema semi-intensivo en comparación al sistema intensivo, explicado probablemente por el hecho de ser estos sistemas en general menos controlados y por lo tanto más susceptibles de variaciones.
- Los índices de diversidad mas bajos en el sistema intensivo, pueden deberse a un efecto del sistema tipo invernadero sobre la temperatura a la que estaba sometido el cultivo, pues temperaturas elevadas ejercerían una presión selectiva sobre las especies bacterianas, donde solo las especies capaces de adaptarse podrían persistir y prosperar en el tiempo.