CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No 128 15 de Mayo del 2005

Por Ricardo Cedeño, M.Sc.
InvestigadorMicrobiología

El uso del DGGE como Herramienta Molecular para el estudio y Caracterización Bacteriana

Introducción.

Los métodos tradicionales de cultivo bacteriano se han caracterizado por ser sencillos, económicos y relativamente rápidos, sin embargo, la proporción de células bacterianas cultivables en medios convencionales es apenas de 0.1 a 10% de la población total, y consecuentemente se obtiene una visión incompleta de la diversidad bacteriana en la muestra. Por estos motivos los métodos moleculares estan reemplazando métodos tradicionales para el estudio y análisis de comunidades bacterianas.

Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares son rápidas y proveen un perfil de la diversidad genética de una comunidad bacteriana. Entre los métodos moléculares se pueden destacar las siguientes técnicas: reasociación del DNA (ácido desoxiribonucleico), hibridización del DNA, clonación y secuenciación del DNA y otros métodos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) tales como DGGE (Electroforesis de geles con gradiente denaturante), TGGE (Electroforesis de geles con gradiente de temperatura), RISA (Análisis de los espacios intergénicos ribosomales), ARISA (Análisis de los espacios intergénicos ribosomales automatizados), entre otros.

DGGE.

La electroforesis en geles con gradiente denaturante (**DGGE**), es una técnica que se desarrolló para detectar mutaciones puntuales en las secuencias del DNA. Actualmente esta técnica ha sido adaptada y permite analizar comunidades bacterianas presentes en los diferentes medios incluyendo los medios acuáticos. El DGGE basa su análisis en la información genética de la bacteria sin cultivar. El método requiere la extracción de DNA y posterior amplificación por PCR con iniciadores específicos (primers) para un fragmento del 16S rDNA bacteriano. Posteriormente la electroforesis de los productos amplificados en geles de poliacrilamida con gradiente denaturante permite separar los fragmentos de DNA que son de un mismo tamaño pero de diferente secuencia (Fig. #1).

Estos perfiles se caracterizan por el número, posición (ausencia o presencia de bandas particulares) e intensidad relativa de las bandas, donde cada banda representa una especie diferente. Este método no sólo permite la identificación de las bacterias, sino también la cuantificación relativa de las mismas en la muestra. Los perfiles pueden ser utilizados en métodos estadísticos para determinar dominancia, frecuencia, proporciones relativas, entre otros indicadores de diversidad de la comunidad bacteriana. Estos indicadores pueden ser utilizados en estudios de dinámica poblacional y permiten observar cambios ecológicos o ambientales.

Trabajos en CENAIM

Actualmente en el CENAIM se contempla el uso del DGGE como herramienta para caracterizar las comunidades bacterianas presentes en sistemas de engorde de camarón. Uno de los estudios, se realizó sobre piscinas semi-intensivas e intensivas durante un ciclo de cultivo, el trabajo consideraba el uso de las técnicas tradicionales de microbiología y paralelamente el uso del DGGE como herramienta molecular para caracterizar las comunidades bacterianas, este tipo de información, permite la generación de Indices de diversidad que nos darán una mejor visión del comportamiento y evolución a través del tiempo de las comunidades bacterianas presentes.

Otro de los proyectos en desarrollo, considera el uso de la técnica de DGGE para detectar la presencia de bacterias probióticas suministradas a través del alimento, se pretende además, estudiar el efecto que ejerce su uso sobre la microbiota bacteriana presente en el agua, suelo y en los animales de las piscinas de cultivo.

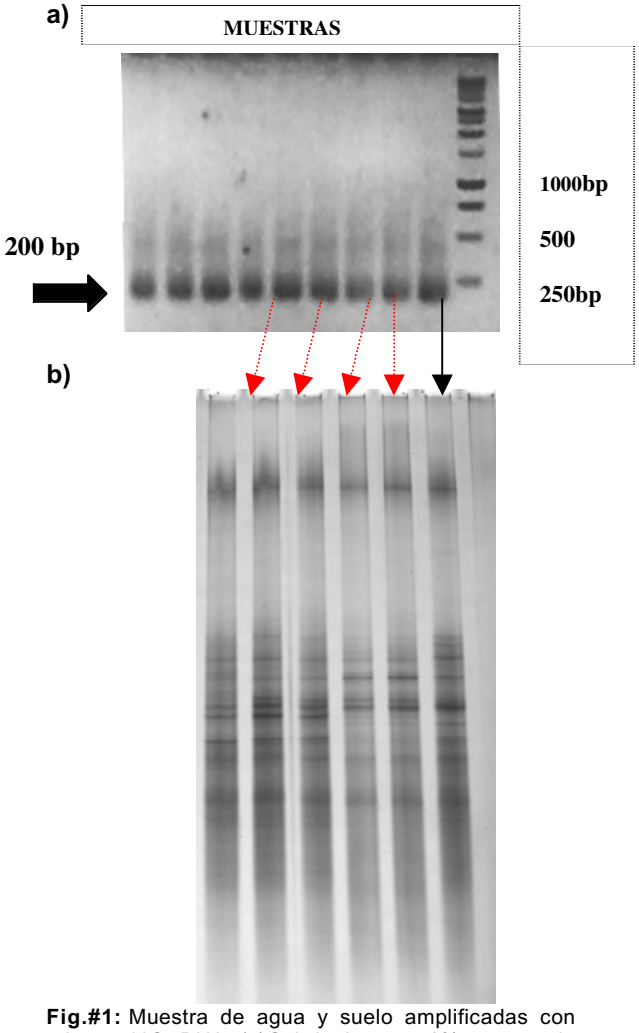

Fig.#1: Muestra de agua y suelo amplificadas con primers 16S rDNA; (a)Gel de Agarosa 2%, mostrando la talla de los fragmentos, (b) Gel de gradiente, permite separar las bandas en base a su secuencia.