

Trabajo práctico 1: Ecología microbiana

Las bacterias y las arqueas presentan una increíble diversidad metabólica que excede ampliamente la encontrada en organismos superiores. Los procariotas mantienen nuestro mundo reciclando los elementos minerales necesarios para la vida. Dos pioneros de los estudios de estos procesos fueron: Serguei Winogradsky (1856-1953) y Martinus Willem Beijerinck (1851-1931). En contraste con estudios realizados con cepas puras, estos dos microbiólogos estudiaron la interacción de diferentes tipos de microorganismos en comunidades mixtas provenientes del suelo.

La columna de Winogradsky permite reproducir un ecosistema natural. En una primera instancia, los microorganismos están mezclados, pero al estabilizarse y exponerse a la luz, los diferentes tipos microbianos proliferan y ocupan distintas zonas donde las condiciones ambientales favorecen sus actividades específicas. Esto permite analizar cómo diferentes microorganismos realizan sus roles interdependientes: la actividad de un microorganismo permite el crecimiento de otro y viceversa. Estas características, sumadas a que es un sistema auto reciclante y al uso de la luz como fuente de energía, indican que la columna de Winogradsky es un excelente modelo de ecología microbiana.

Por otro lado, la columna de Winogradsky puede ser utilizada para establecer cultivos de enriquecimiento de diferentes tipos microbianos. Por ejemplo para el caso de bacterias fotosintéticas al menos cuatro grupos pueden ser encontrados: cianobacterias (antes conocidas como azul-verdosas), verdes sulfurosas, púrpuras sulfurosas y púrpuras no sulfurosas.

La manera más difundida hasta hace unos años de identificar los microorganismos presentes en un ambiente era cultivarlos en diferentes medios, a fin de poder aislar la mayor cantidad posible de grupos microbianos. Sin embargo, un gran porcentaje de los microorganismos de un ambiente no puede ser cultivado en laboratorio, por lo que haciendo análisis por métodos culturales se pierde mucha información sobre la composición microbiana de un ecosistema determinado.

Si bien los estudios fisiológicos y genéticos de los microorganismos cultivados continúan siendo necesarios para interpretar la información obtenida de las secuencias de DNA, la posibilidad de amplificar genes correspondientes a la subunidad ribosómica 16S o a diferentes enzimas o incluso genomas enteros ha permitido un análisis mucho más detallado y completo de las comunidades microbianas. Los productos amplificados por PCR se secuencian y las secuencias obtenidas son analizadas en bases de datos. Se logra así un conocimiento mucho más completo de la composición microbiana de un ambiente.

En este TP se analizará por medios culturales y no culturales la presencia de diferentes microorganismos (arquea/bacteria) y de un grupo metabólico (reductores de sulfato) en las muestras de suelo.

Objetivos

- Columna de Winogradsky. Observar e interpretar el desarrollo del ecosistema que se establece dentro de la columna
- Identificar la presencia de microorganismos reductores de sulfato utilizando medios de enriquecimiento.

- Utilizar técnicas independientes de cultivo para identificar la presencia de microorganismos, bacterias o arqueas, en muestras ambientales.

Procedimientos

A partir de las muestras de suelo se realizarán las siguientes actividades:

1. Armado de la Columna de Winogradsky
2. Inoculación de medios de cultivo de enriquecimiento para reductoras de compuestos de azufre
3. Extracción de ADN para identificación de diversidad a través de amplificación por PCR.

1. Columna de Winogradsky

Una parte de la muestra de tierra fangosa (100 g) se mezcla con cada una de las siguientes sales: CaCO_3 , CaSO_4 y CaHPO_4 en una proporción de 1% de cada una. A esta preparación se coloca igual proporción de papel de diario como fuente de celulosa y se agrega en los recipientes en que se armarán las columnas. El llenado debe hacerse despacio evitando la formación de burbujas de aire. Luego se agrega otra porción de muestra sin agregados. Existen diferentes proporciones tierra:agua:aire para el armado de la columna, se aconseja dejar al menos 1/6 parte de aire. Se recomienda tapar la boca para evitar tanto el depósito de polvo como la evaporación. Se debe girar periódicamente para evitar zonas sin exposición a la luz. A fin de seguir el proceso completo desde el principio, se deben realizar observaciones macroscópicas periódicas y mantener un registro de las mismas.

Para realizar un enriquecimiento en bacterias fotosintéticas, se preparará una columna y será sometida a luz constante durante todo el período. Por otra parte, para enriquecer en microorganismos oxidadores/reductores de compuestos de azufre se agregarán diferentes concentraciones de sales conteniendo sulfato.

Clave para identificación de potenciales microorganismos

Zona	Color	
Aeróbica	Verde	Algas eucariotas o cianobacterias
	Rojo/Marrón	Cianobacterias o tiobacilos
	Rojo/púrpura	Bacterias púrpuras no sulfúreas
	Blanco	Bacterias oxidadoras de azufre
Anaeróbica	Rojo/púrpura	Bacterias púrpuras sulfúreas
	Verde	Bacterias verdes sulfúreas
	Negro	Reductoras de sulfato

Gas en la columna de agua es probablemente O_2 de la fotosíntesis oxigénica

Gas en la zona anaeróbica es probablemente CH_4 de la metanogénesis

Información adicional

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/anisamples/microbiology/winogradsky.html>

www.en.wikipedia.org/wiki/Winogradsky_column

serc.carleton.edu/resources/2577.html

www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms/winogradsky.html

helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/winograd.htm

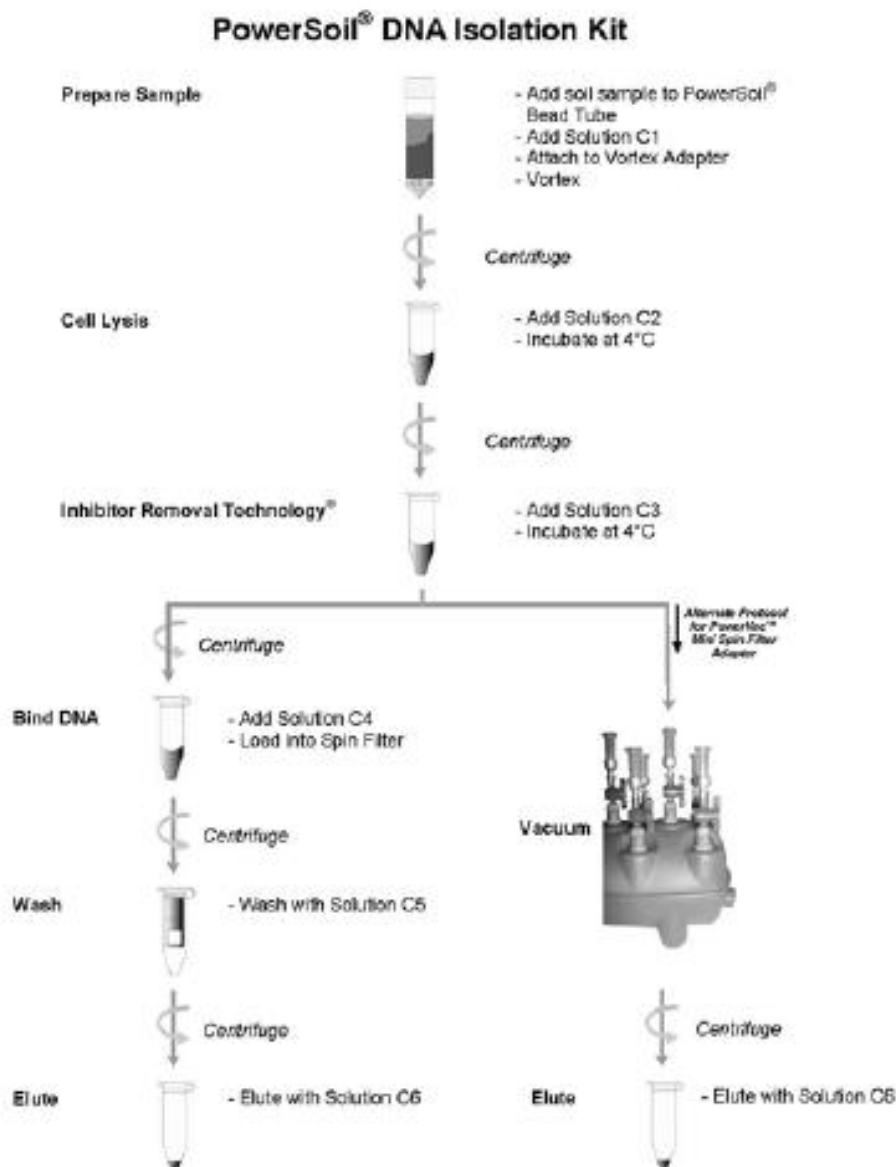
Brock – Biología de Microorganismos

2. Inoculación de medios de cultivo de enriquecimiento para oxidadoras/reductoras de compuestos de azufre

Se pesarán 0.2 g de tierra y se agregarán a tubos conteniendo 5 ml de medio de cultivo de enriquecimiento para bacterias reductoras del azufre (ver anexo de recetas). Se incubarán a 30°C hasta observar crecimiento. Una vez crecidos, los cultivos se repicarán a medio fresco para asegurar el enriquecimiento en los microorganismos deseados. Una alícuota de estos cultivos se utilizará en los ensayos de PCR.

3. Extracción de ADN de muestras ambientales

Para realizar esta parte se utilizara el kit PowerSoil DNA isolation kit de MOBIO Laboratories, USA . El siguiente esquema representa los pasos a seguir (manual disponible en:<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5c00f8e4-c9f5-4544-94fa-653a5b2a6373&lang=en>)



Protocolo para las PCR

Se utilizarán los siguientes cebadores específicos:

21F y 1492R para el gen 16S ARNr de arqueas.

F 43Eco y R 1387Eco para el gen 16S ARNr de bacterias

ME1F y ME2R para el gen de la subunidad alfa de la metil coenzima M reductasa de arqueas metanógenas

DSR1F y DSR4R para el gen de la sulfito reductasa disimilatoria de bacterias sulfato reductoras

Como templado se utilizará el ADN extraído de las muestras ambientales así como también los cultivos obtenidos en los medios de enriquecimiento.

Como control positivo se utilizarán cultivos puros de arqueas y bacterias.

Para preparar los templados que se utilizarán como control positivo se procederá de la siguiente manera: Se toma con la punta de un tip una colonia aislada del microorganismo que corresponda (arquea o bacteria) y se resuspende en 50 µl de agua estéril; se hierve 5 minutos y de esta suspensión celular se toman 5 µl por reacción.

Se seguirá el siguiente protocolo para las reacciones:

	Templado µl	Buffer 10X µl	dNTP's 10mM µl	MgCl ₂ 50mM µl	H ₂ O µl	Primers 10µM µl F R	Taq Pol µl
1	--	2.5	1.25	1.5	16.45	0.7 0.7	0.5
2	5	2.5	1.25	1.5	12.85	0.7 0.7	0.5

Tubo 1: Control negativo SIN templado

Tubos 2 en adelante: Controles positivos y muestras a analizar

Cada grupo realizará las reacciones para uno de los controles positivos que se definan.

Programa de PCR

1- 10 min 94°C

2- 1 min 95°C

3- 1 min 55°C (hibridación o « annealing »)

4- 1 min 30 seg 72°C (polimerización)

Repetir 30 ciclos de 2 a 4

5- 5 min 72°C

Los cebadores ME1 y ME2 requieren 50°C de temperatura de annealing.

Los fragmentos amplificados se separarán en un gel de agarosa 1.5% mediante electroforesis horizontal.

Anexo: recetas de las soluciones necesarias

Buffer de electroforesis (TBE 10x):

Tris- Borato pH8 0,9 M

EDTA 0,020 M

Gel de agarosa 1,5 %: pesar 1,5 gramos de agarosa por cada 100 ml de buffer TBE 1X; calentar hasta que se disuelva; antes de que se enfríe agregar SybrSafe (10µl/100ml de agarosa). Volcar en la cuba de electroforesis y dejar que gelifique.

Correr a voltaje constante, 100 Volts. Visualizar las bandas en transiluminador de luz azul.

Medio de cultivo para enriquecimiento de reductoras de sulfato

Lactato de sodio	4 ml/l
Extracto de levadura	1 g/l
Acido ascórbico	0.1 g/l
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.2 g/l
K ₂ HPO ₄ anhidro	0.01 g/l
NaCl	10 g/l
Fe(SO) ₄ (NH ₄) ₂ .6 H ₂ O	0.1 g/l
Agar	15 g/l

Calentar suavemente para disolver. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH. Autoclavar. Fraccionar en tubos y cubrir con vaselina para mantener la anaerobiosis. Inocular con ansa de punción.