

Sistemas bacterianos y sus aplicaciones

- Generalidades:

métodos cultivo independientes para el estudio de comunidades bacterianas

Ejemplos de la importancia de las comunidades microbianas a distintos niveles

Global : tierra

Interno tracto digestivo:

Rumen:

queso

vinos-vinagre

biolixiviación

Sistemas bacterianos y sus aplicaciones

En los sistemas microbianos o bacterianos existen interacciones cooperativas y competitivas.

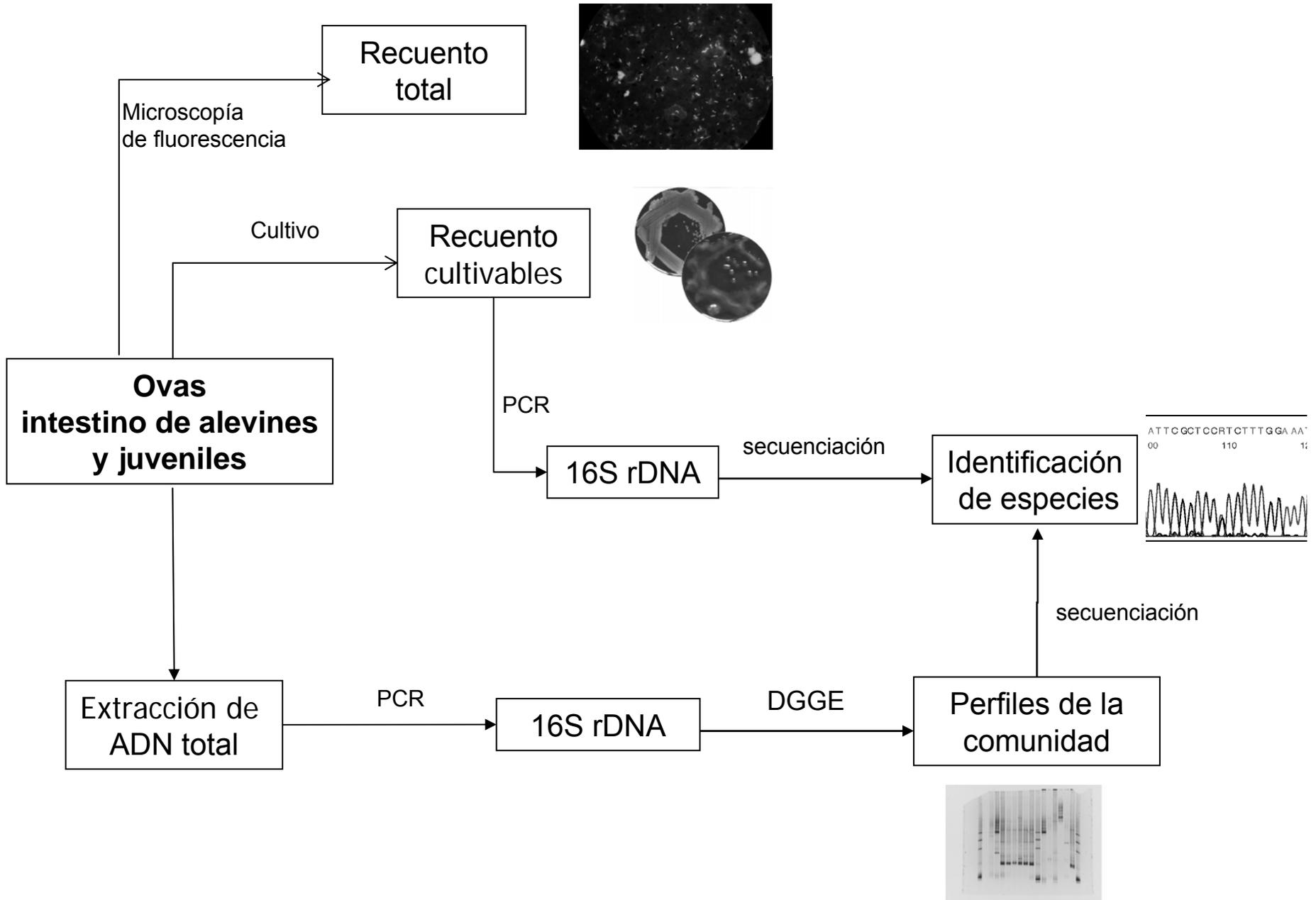
Por lo tanto el estudio de cómo es el comportamiento de un miembro, no tiene mucho sentido, sin estudiar las capacidades de los demás componentes.

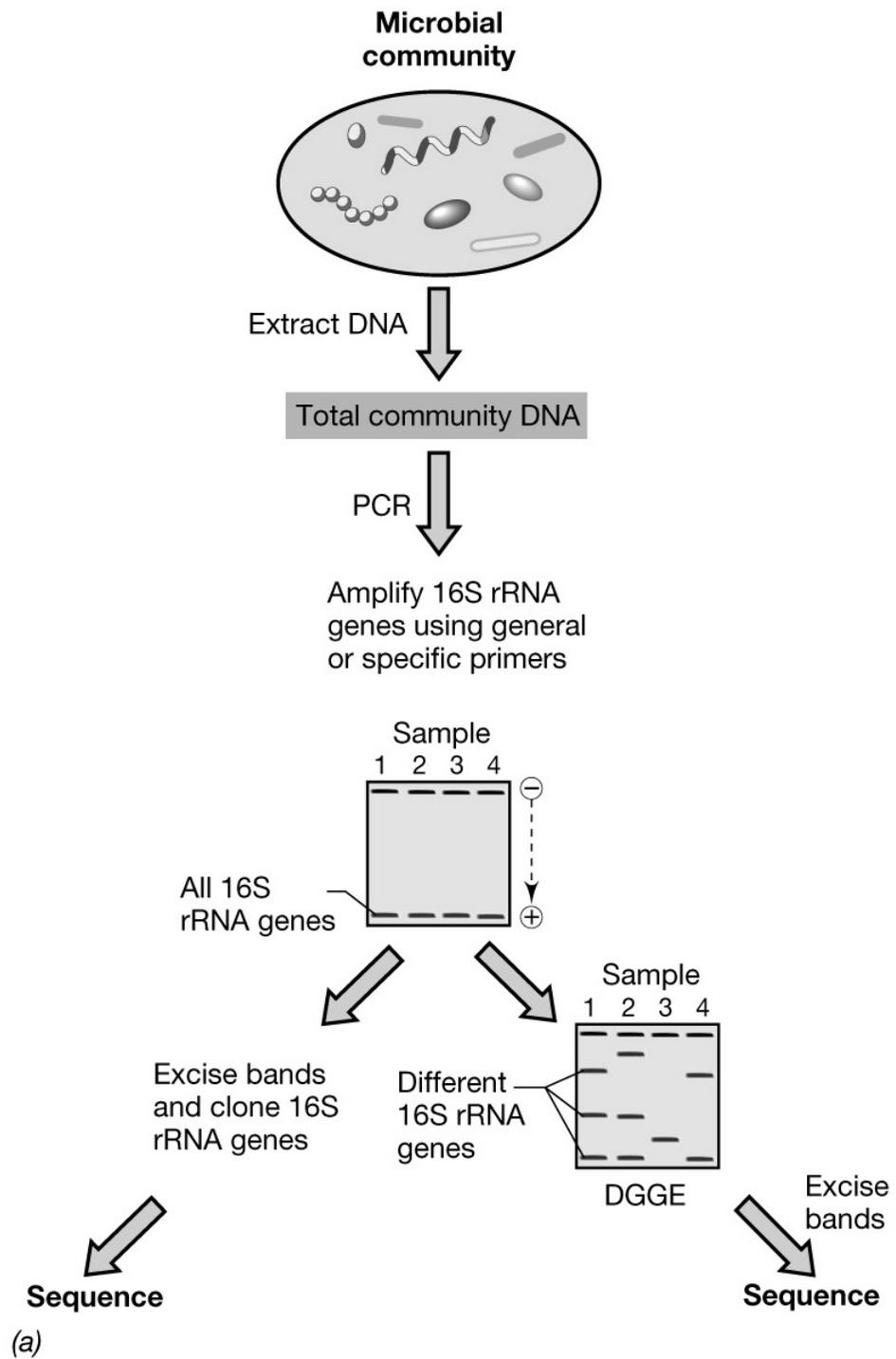
Es probable que los consorcios microbianos:

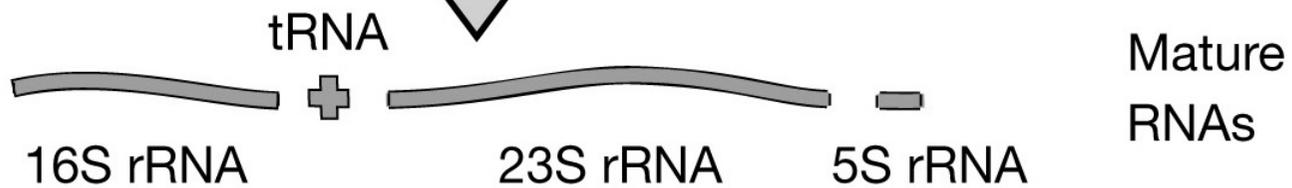
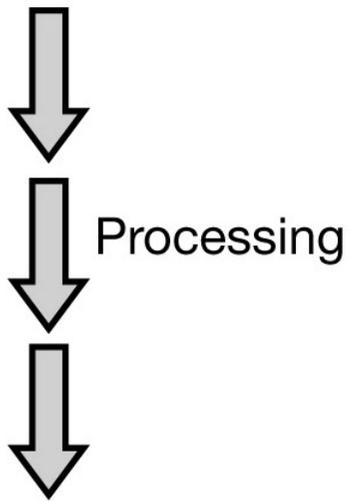
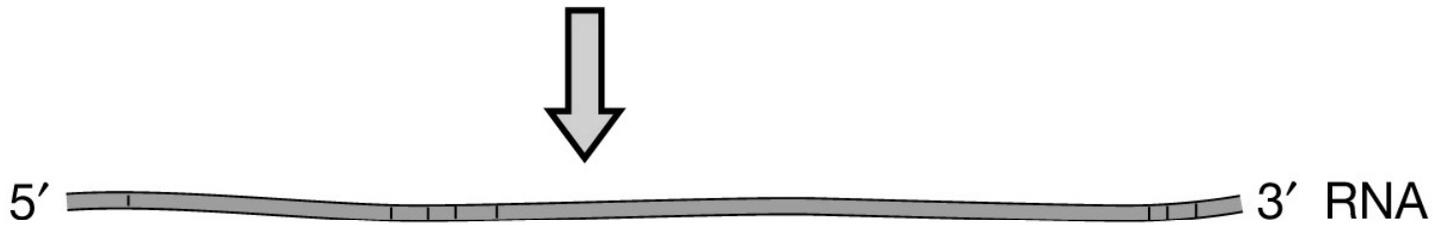
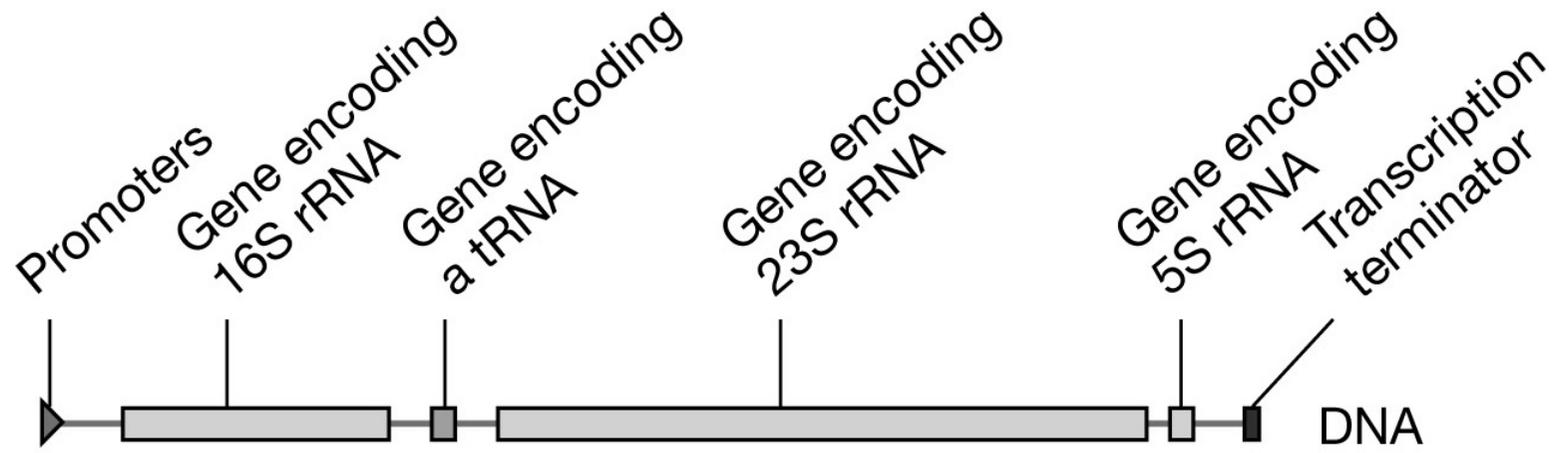
- Resultan de una optimización no alcanzada en solitario
- Presentan un grado de plasticidad importante para responder a las perturbaciones ambientales

Herramientas actuales (genómica, expresión génica) usadas en el contexto ambiental nos pueden ayudar a determinar cómo los distintos roles (funciones) están distribuidos dentro de los diferentes miembros de las poblaciones o comunidades.

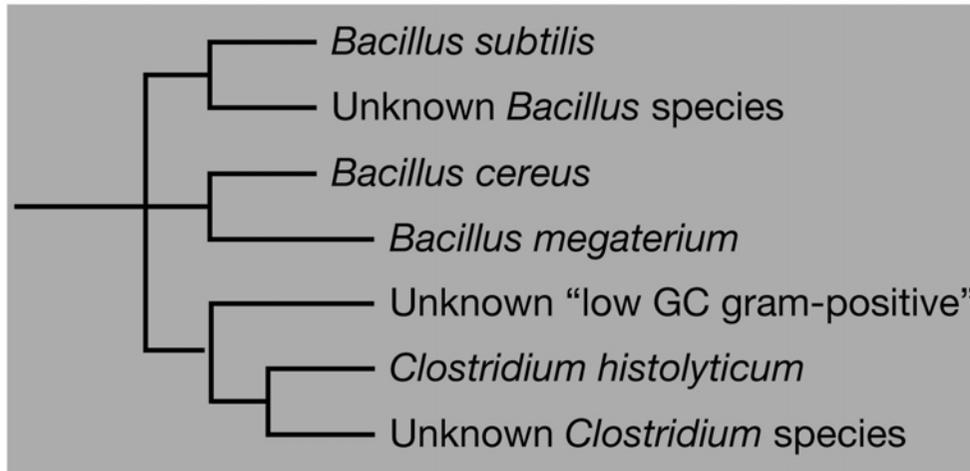
Esto nos puede ayudar a entender cómo un individuo funciona como un miembro de la comunidad.



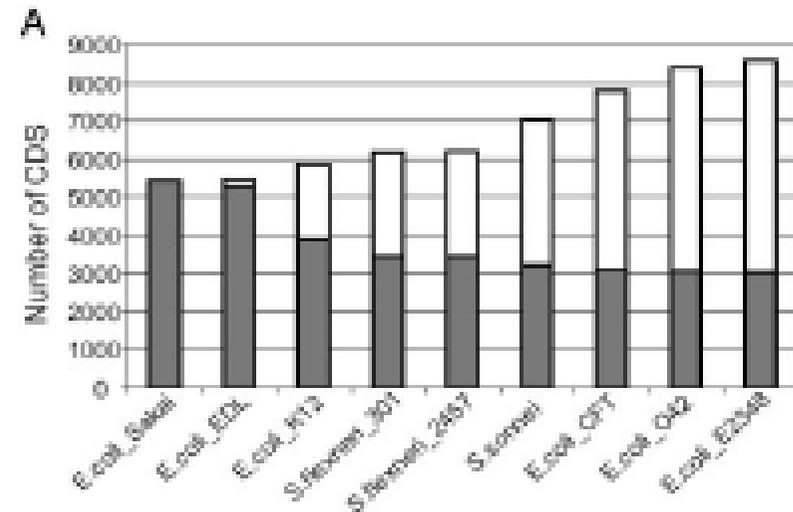




Sistemas bacterianos: Filogenia por 16S y variabilidad en Genomas



(b)



Implicancia de los sistemas microbianos en el ciclo de los elementos :Producción primaria

CO₂ es captado por las células y convertido en material orgánico (CH₂O)

Procesos de fotosíntesis por algas y bacterias

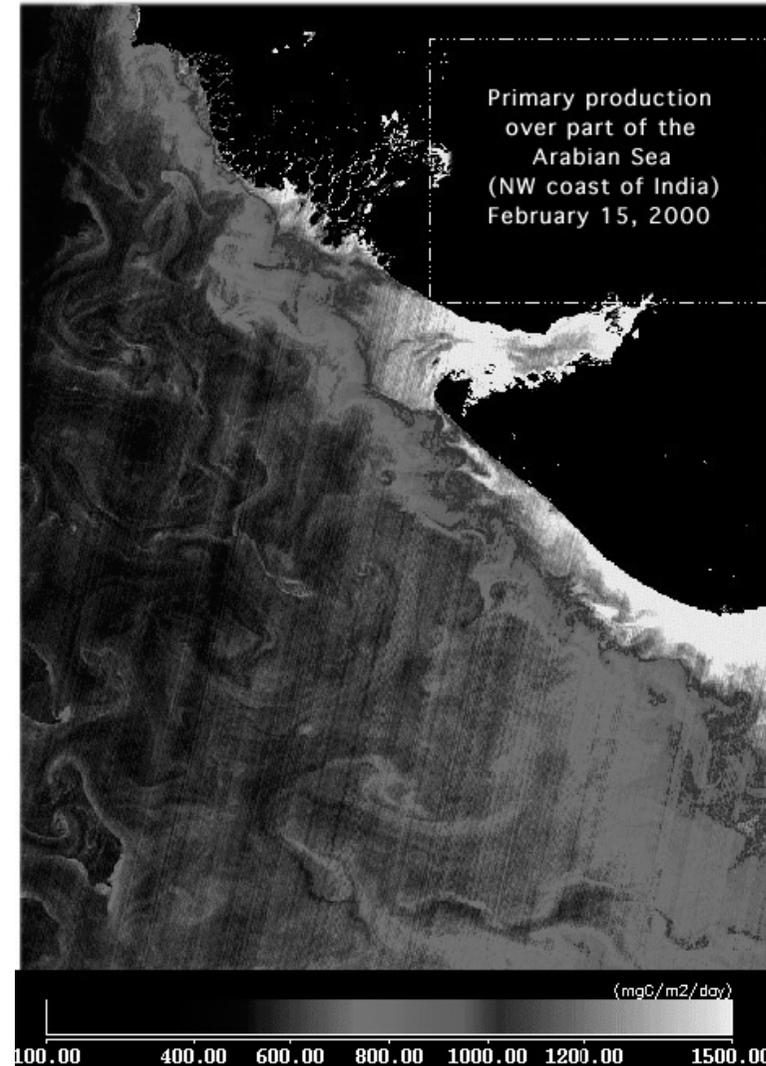
La superficie del océano puede mantener poblaciones de 10⁵ bacteria and 10⁶ virus por mL,

50% del carbono fijado en la Tierra,

base de la cadena alimentaria en los océanos.

los microorganismos son la principal biomasa del océano, (10²⁸ células)

Se distribuyen en forma diferente, de acuerdo a sus adaptaciones



Asociaciones benéficas con animales

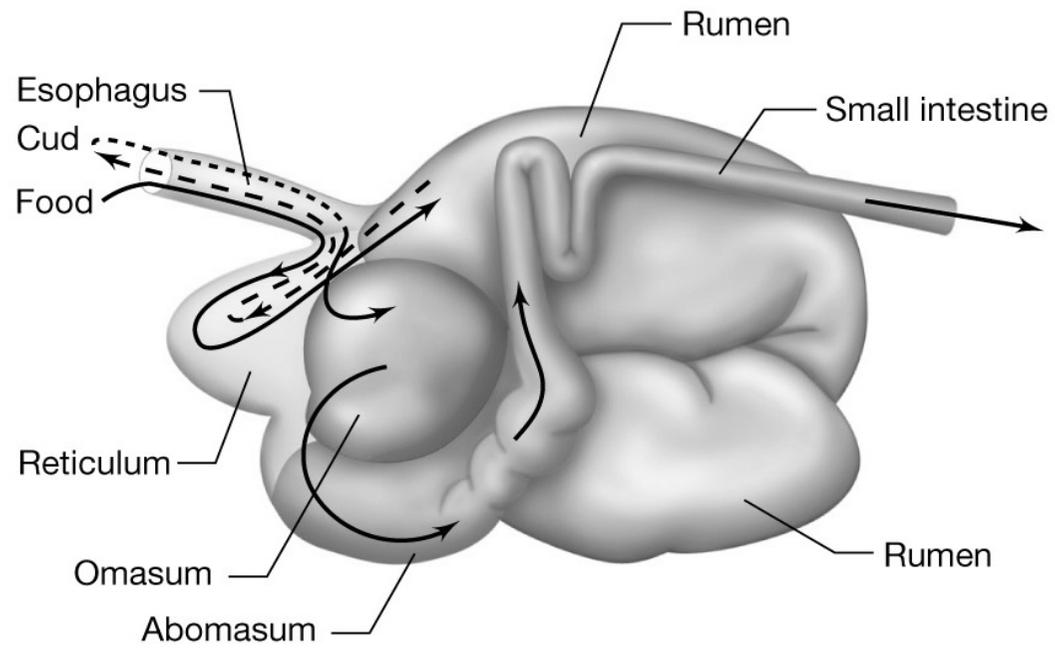


Rumiantes tienen un compartimento del tracto digestivo (rumen), en el cual habitan millones de microorganismos, con la capacidad de degradar la celulosa de las paredes vegetales.

Existen bacteria, hongos y protozoos los que dan nutrientes que la vaca puede digerir.

Son esenciales para el desarrollo normal del animal.

Rumen temperatura rango 38 – 42°C
pH rango 5.8-6.4.

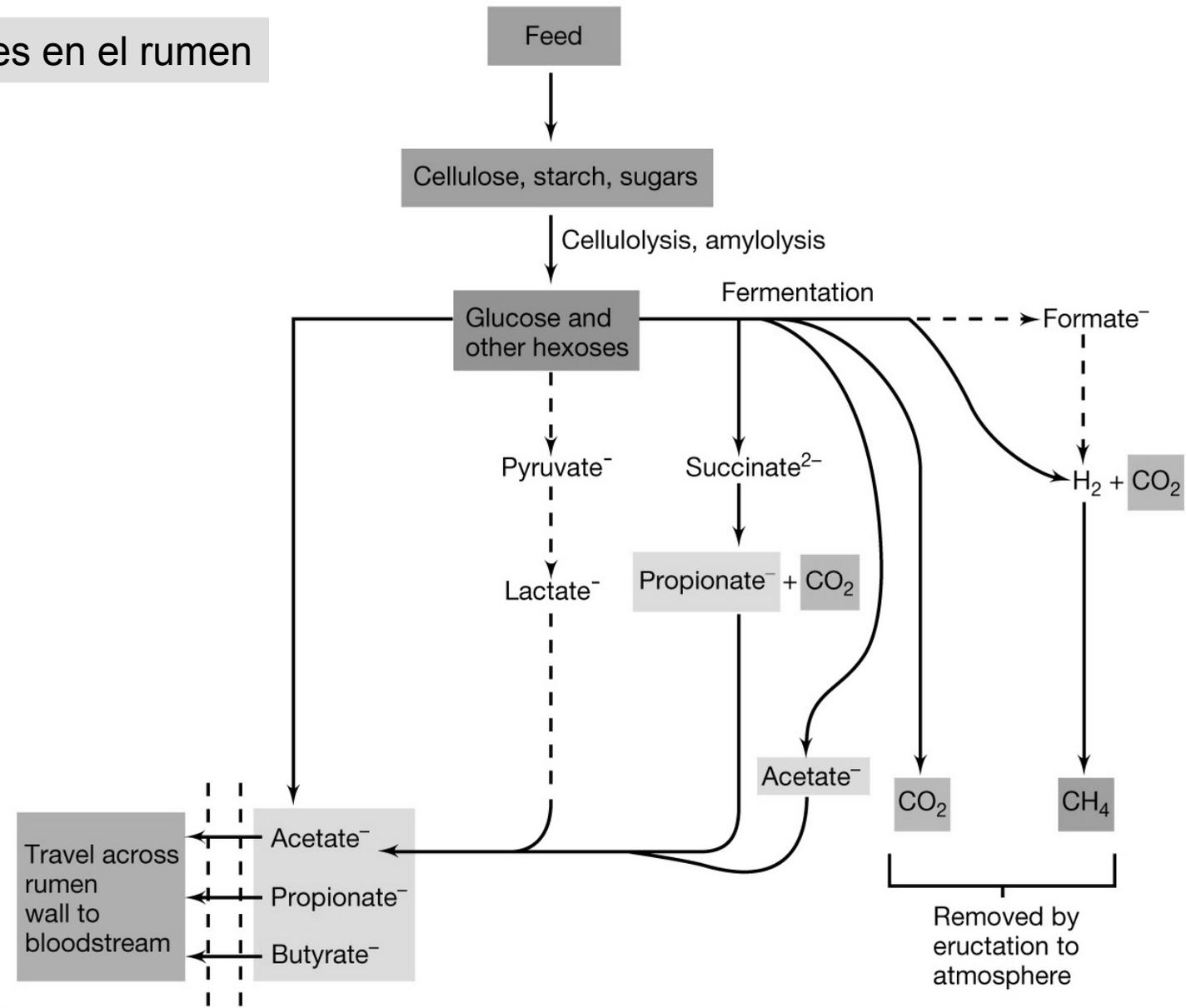


(a)



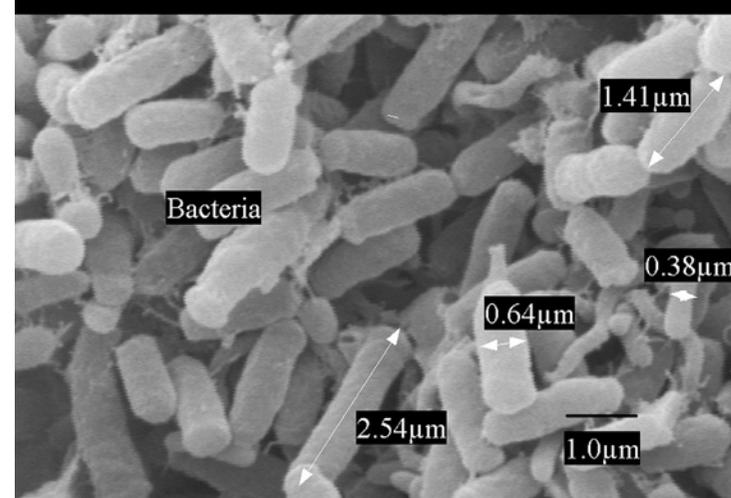
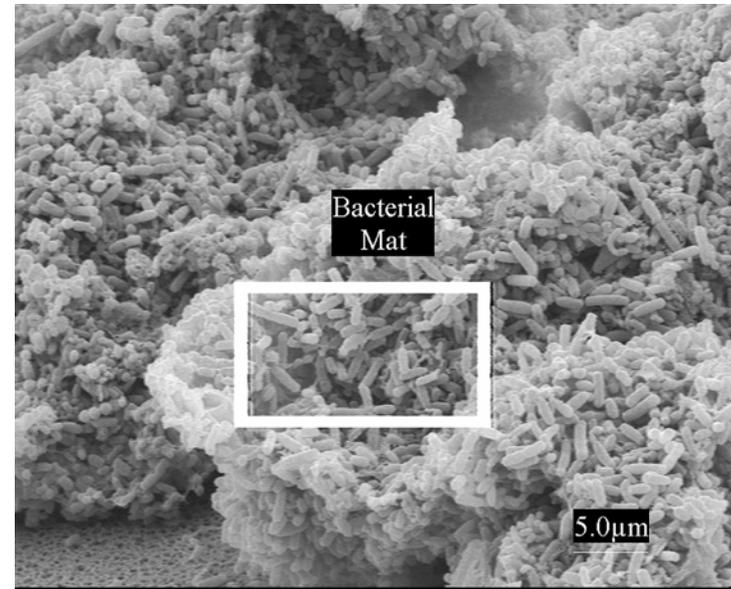
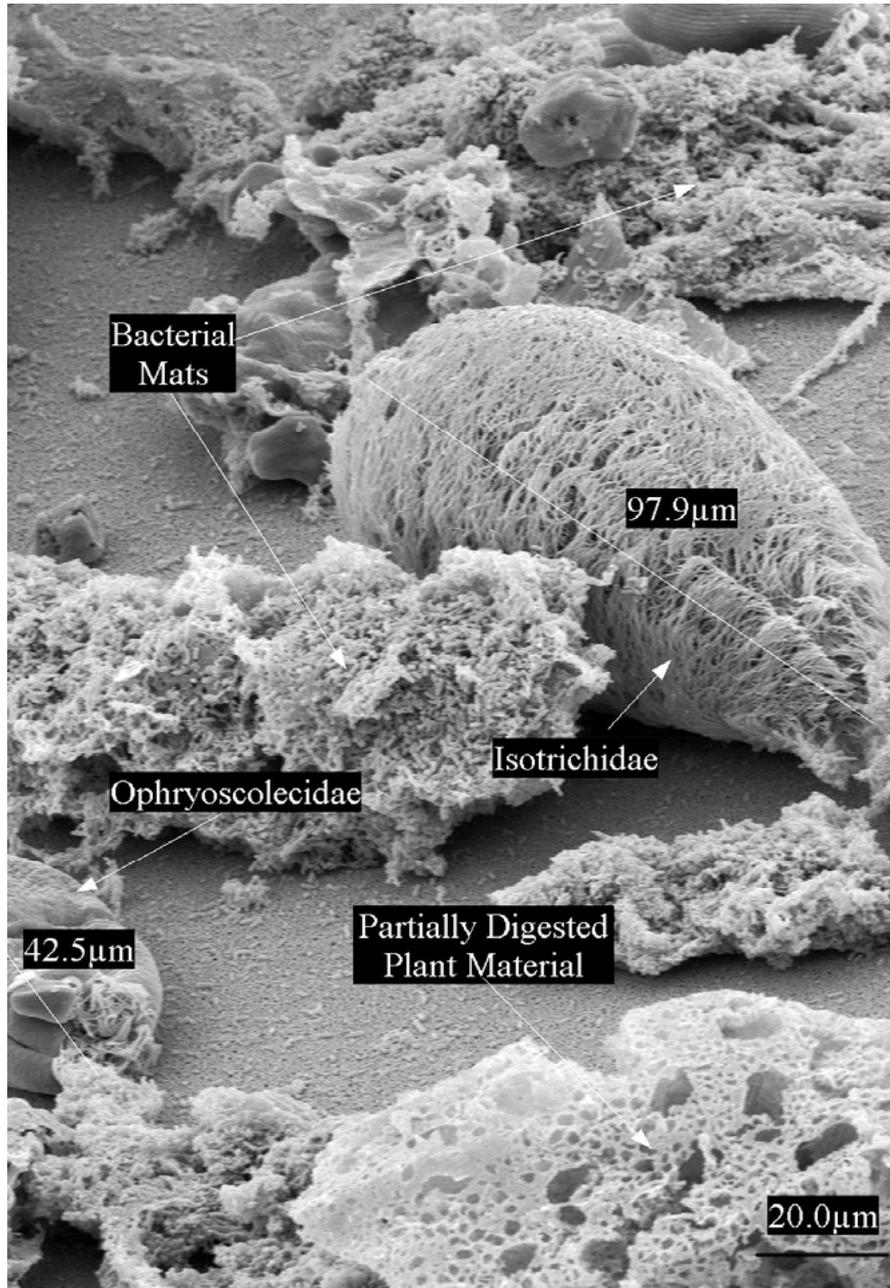
(b)

Reacciones en el rumen



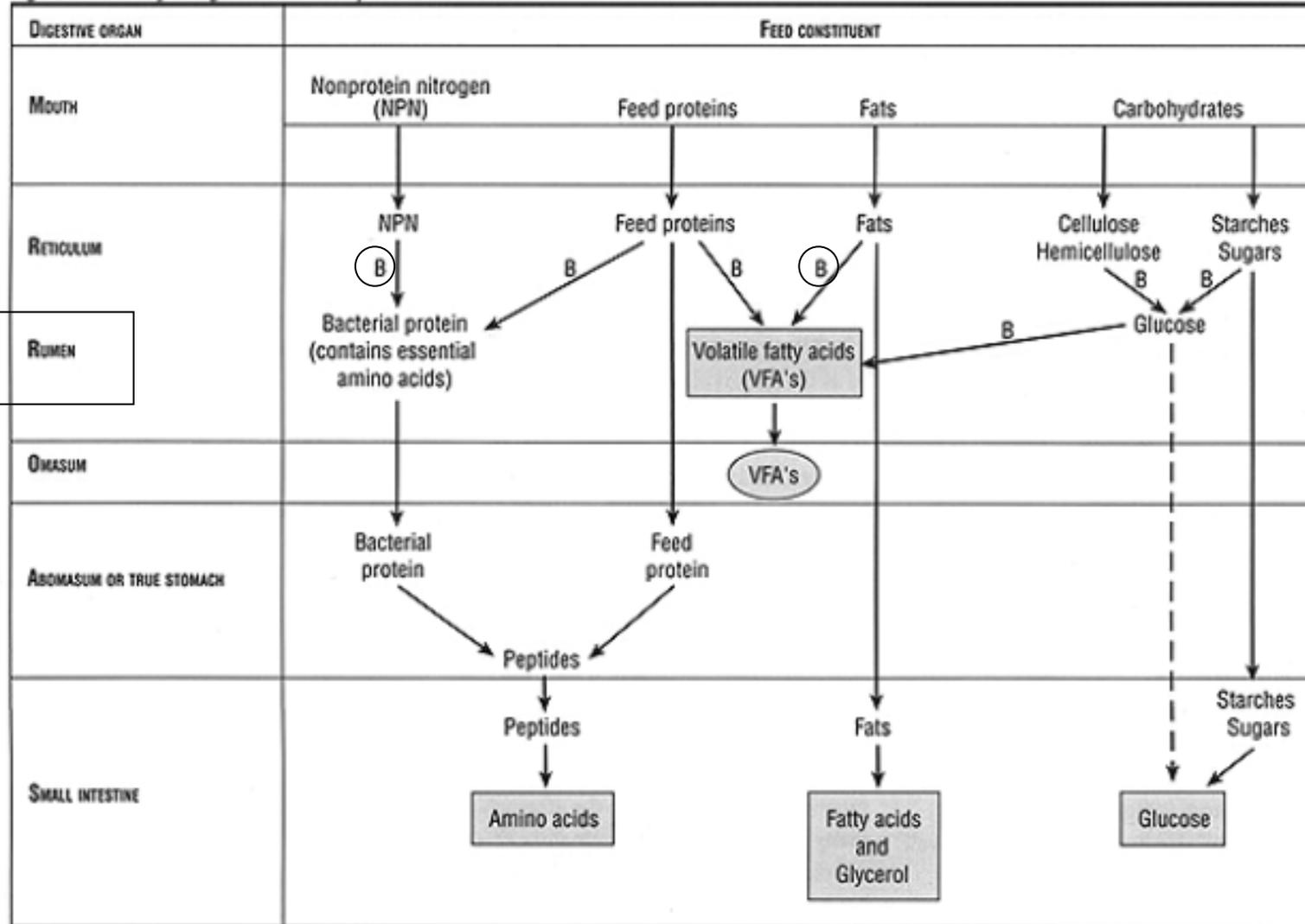
Overall stoichiometry of rumen fermentation:
 $57.5 \text{ glucose} \rightarrow 65 \text{ acetate}^- + 20 \text{ propionate}^- + 15 \text{ butyrate}^- + 60 \text{ CO}_2 + 35 \text{ CH}_4 + 25 \text{ H}_2\text{O}$

Imágenes de los Microorganismos en rumen



Digestión en rumiantes

Figure 1. Summary of digestion and absorption in the ruminant.

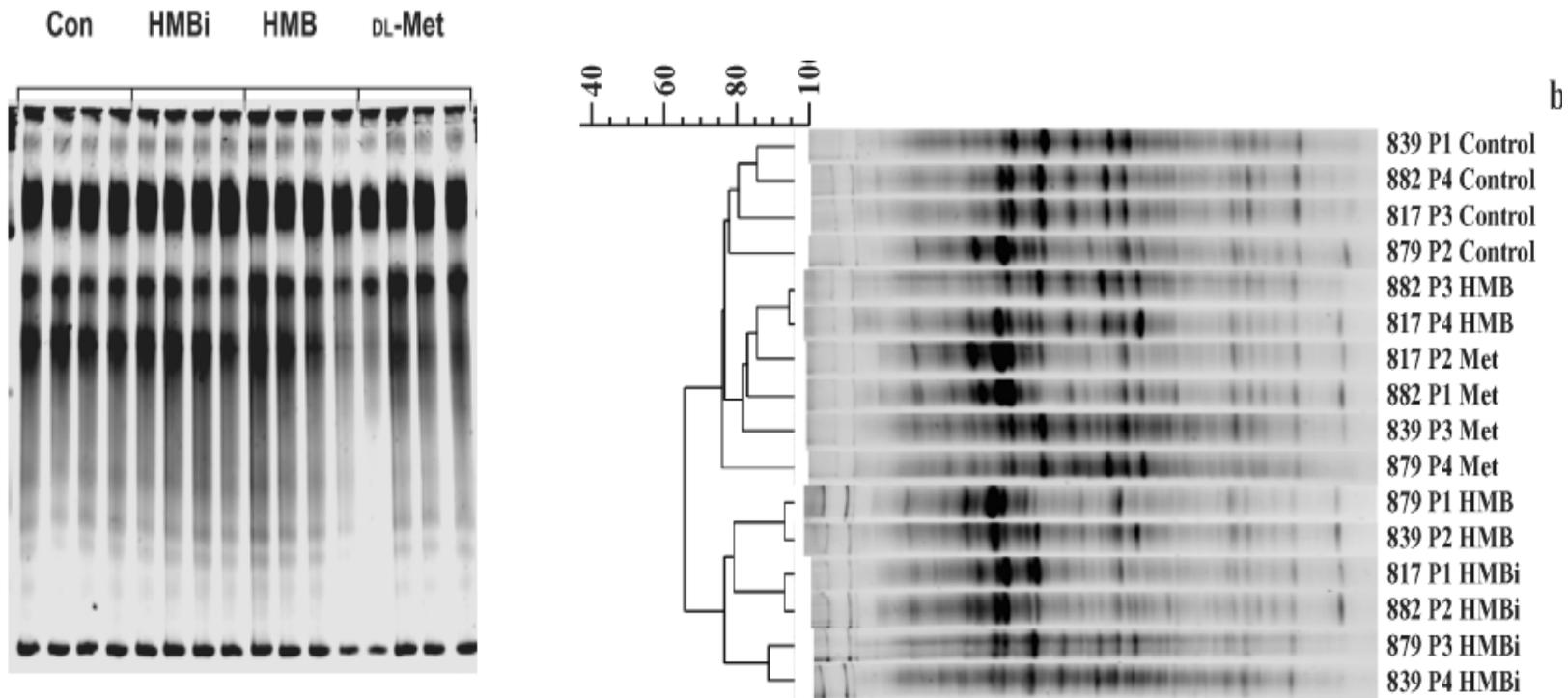


Key: ○ = some absorbed

□ = main site of absorption

B = bacterial action

Comunidades afectadas por dieta. Fuente de metionina



Alimentos



A variety of fermented foods and beverages are produced by microbes. The purpose of fermentation is to both flavor and preserve the foods.

PROCESO de ELABORACION del QUESO

- Alimento fermentado mundialmente consumido
- Existen más de 1.000 tipos de quesos artesanales en el mundo cotizados por las cualidades organolépticas que los caracterizan
- Se diferencian por el origen de la leche utilizada y por su textura
- El protocolo de elaboración es similar:

Acidificación



Coagulación



Deshidratación



Moldeo



Maduración: Desarrollo de la microbiota láctica y de las cualidades organolépticas del queso

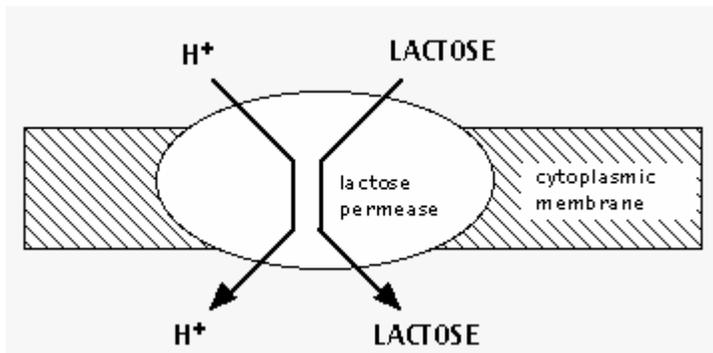
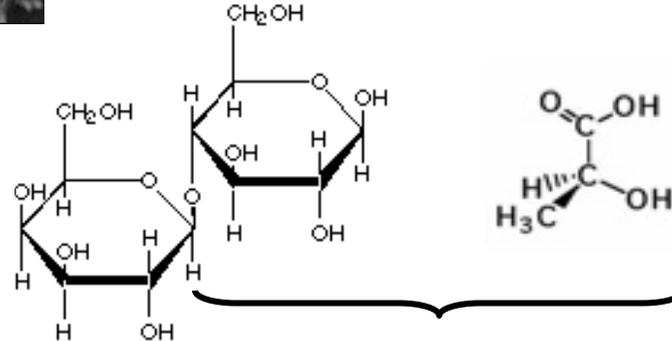
ACIDIFICACION y COAGULACION de la leche



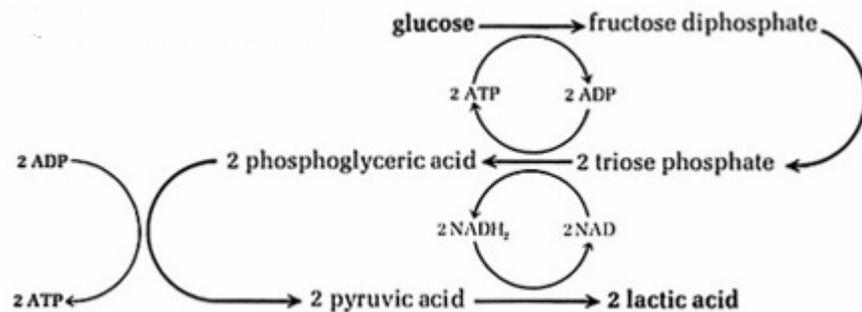
FERMENTACION

Bacterias lácticas

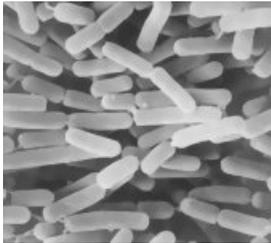
Lactosa → Ac. láctico



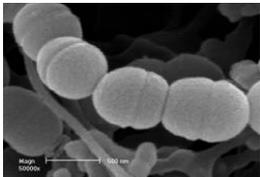
Disminuye el pH
Precipita la caseína



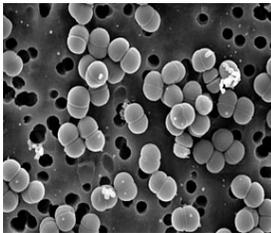
BACTERIAS LACTICAS



Lactobacillus



Leuconostoc

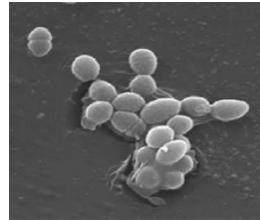


Pediococcus

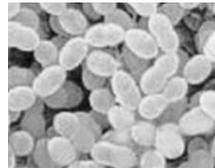


Streptococcus

Aerococcus
Carnobacterium



Enterococcus



Lactococcus

Oenococcus

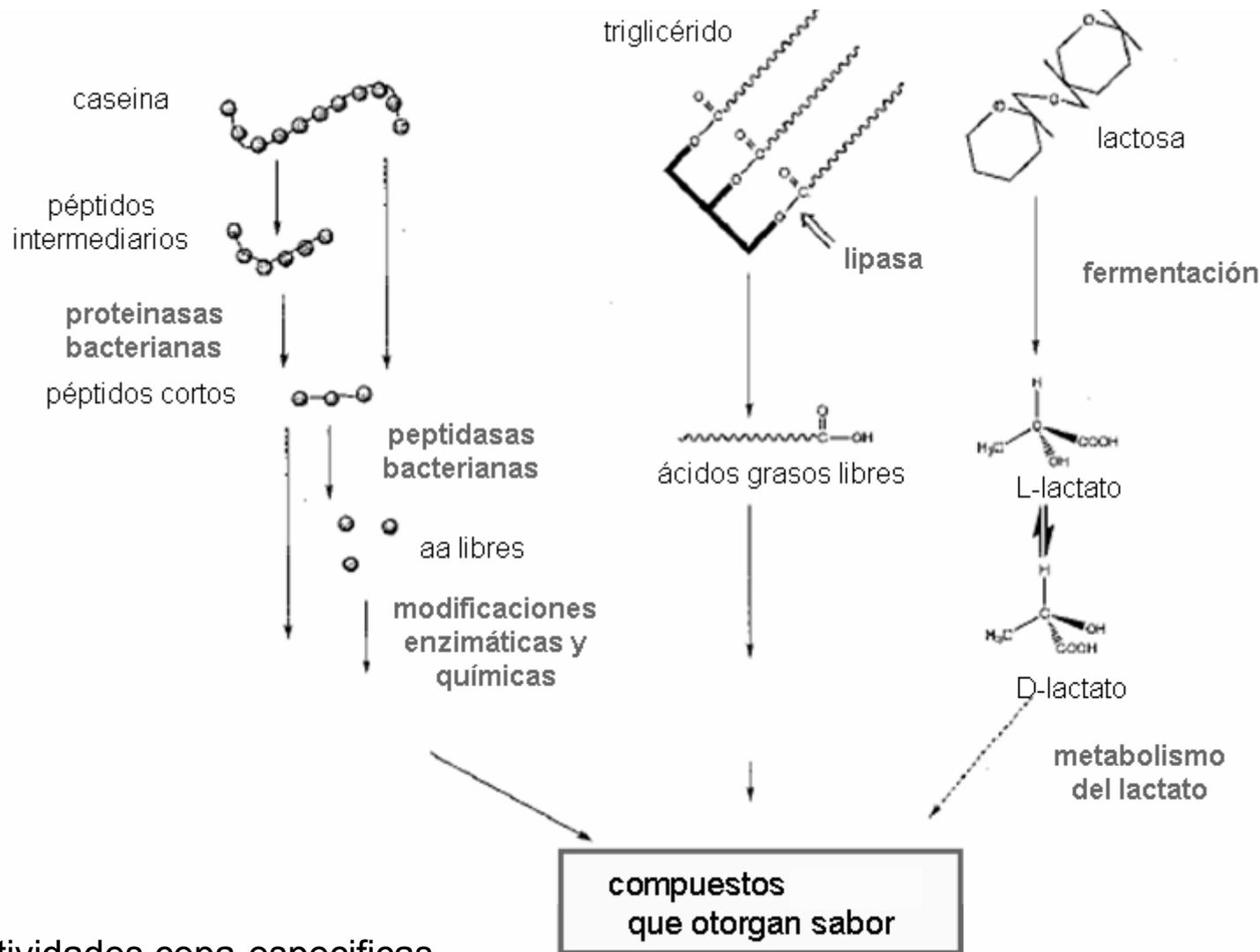
Tetragenococcus

Vagococcus

Weissella

- Aisladas alimentos fermentados y tracto intestinal
- bacterias gram-positivas
- bacilos o cocos que forman pares, tétradas o cadenas
- producen principalmente ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos

CUALIDADES ORGANOLEPTICAS producto del METABOLISMO bacteriano



- Actividades cepa-específicas

La microbiota NATIVA coloniza naturalmente la leche y está asociada a las condiciones de producción

- Zona geográfica (Buchin y col, 1999)
- Estación del año (Caridi y col, 2003)
- Temperatura de maduración (Klantschitsch y col, 2000)
- Prácticas higiénicas



MICROBIOTA LACTICA
CUALIDADES ORGANOLEPTICAS del queso

OBJETIVOS ESPECIFICOS

I Identificar la **microbiota láctica dominante**

II Caracterizar la microbiota láctica según **zona geográfica** de producción



valle y cordillera

para evaluar posibles diferencias de la microbiota láctica

III Caracterizar la microbiota láctica según **tiempo de maduración**

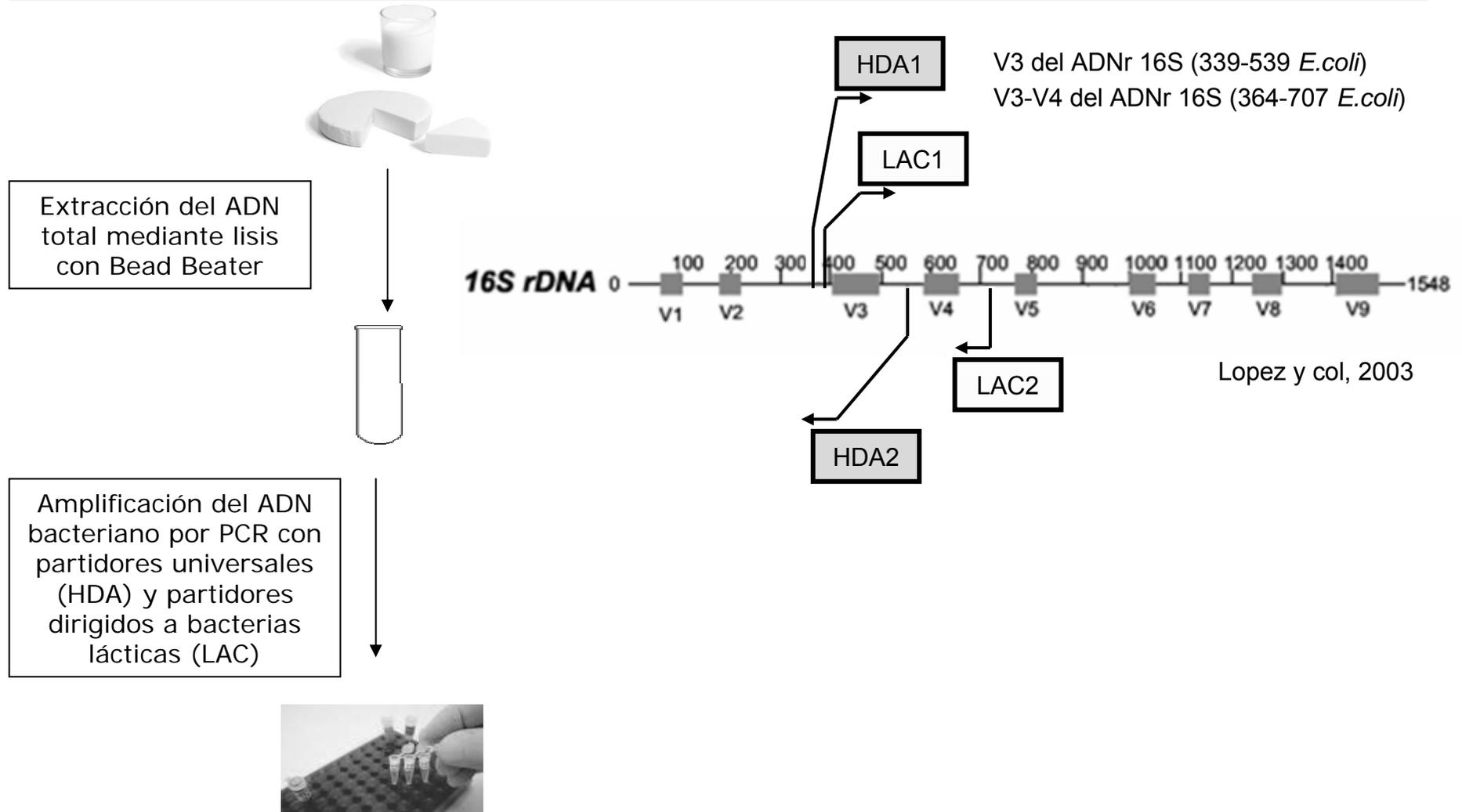


Leche, quesos con 15 (Q15) y 30 (Q30) días de maduración

para evaluar la dinámica

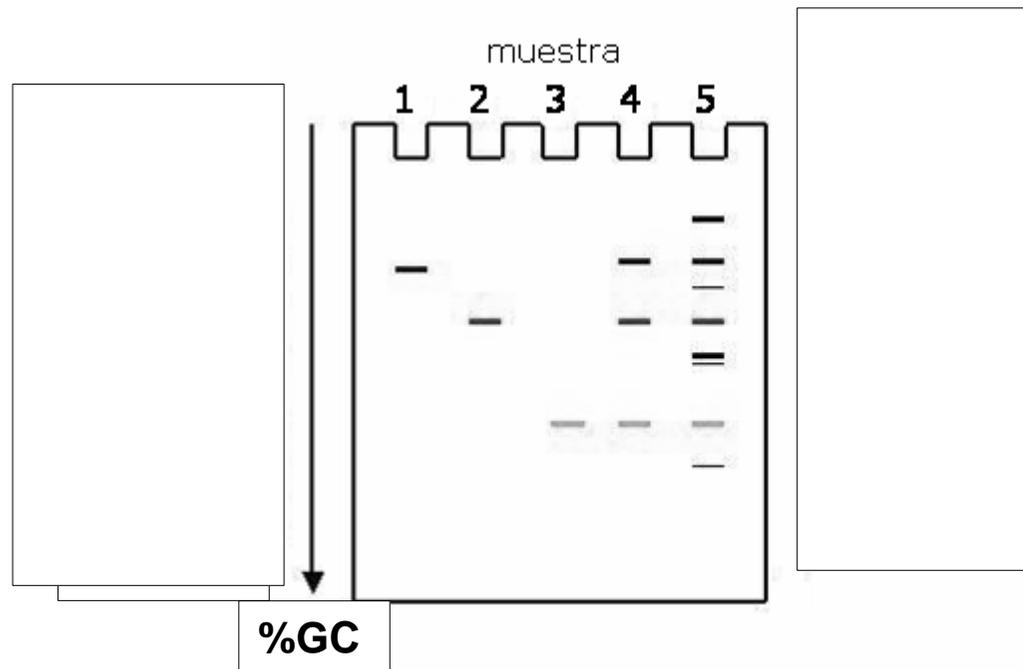


IDENTIFICACION de la microbiota dominante utilizando partidores dirigidos a eubacterias y a bacterias lácticas



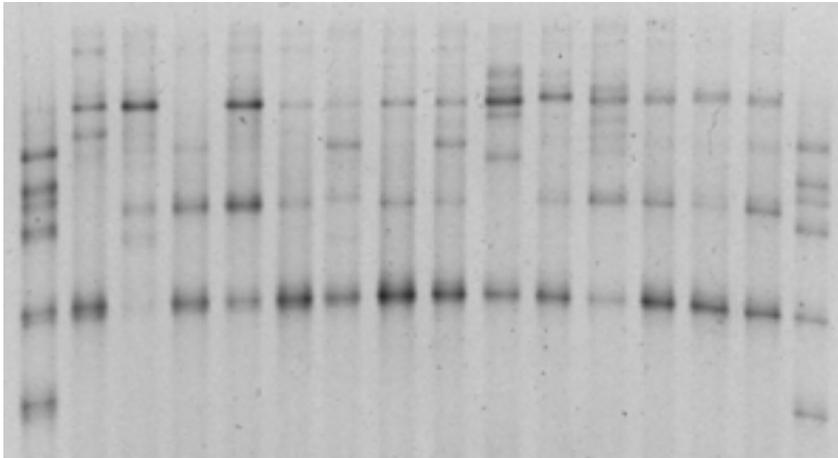
TTGE

electroforesis en gradiente temporal de temperatura

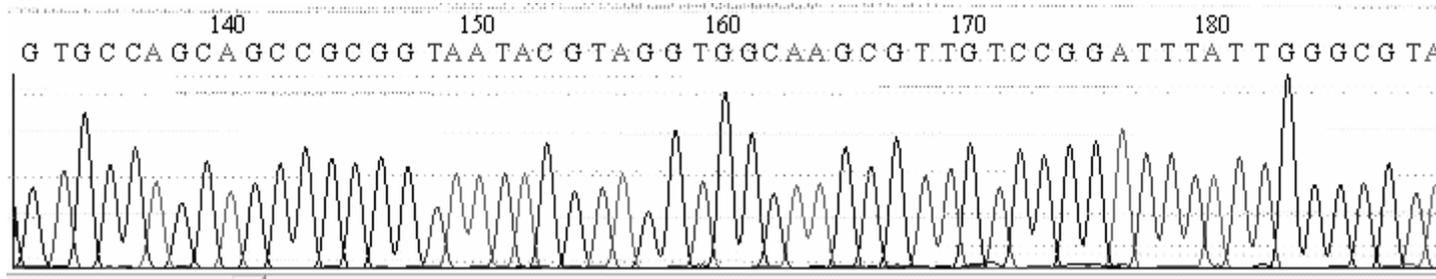


separa los amplicones por **%GC**

Identificación genotípica mediante SECUENCIACION del ADNr 16S

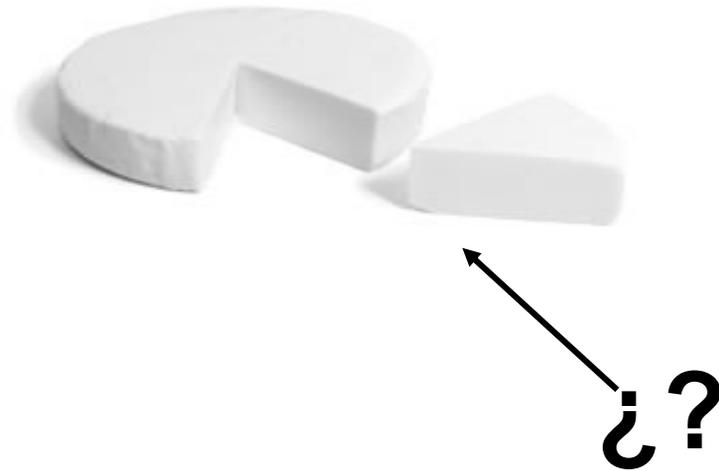


- todas las bandas fueron escindidas y eluidas de cada porción de gel
- se re-amplificaron en sextuplicado con los partidores correspondientes
- se cuantificó la cantidad de ADN re-amplificado
- se secuenciaron 2 o más bandas con igual movilidad electroforética
- se analizaron y editaron las secuencias
- se buscaron las correspondencias en el RDPII

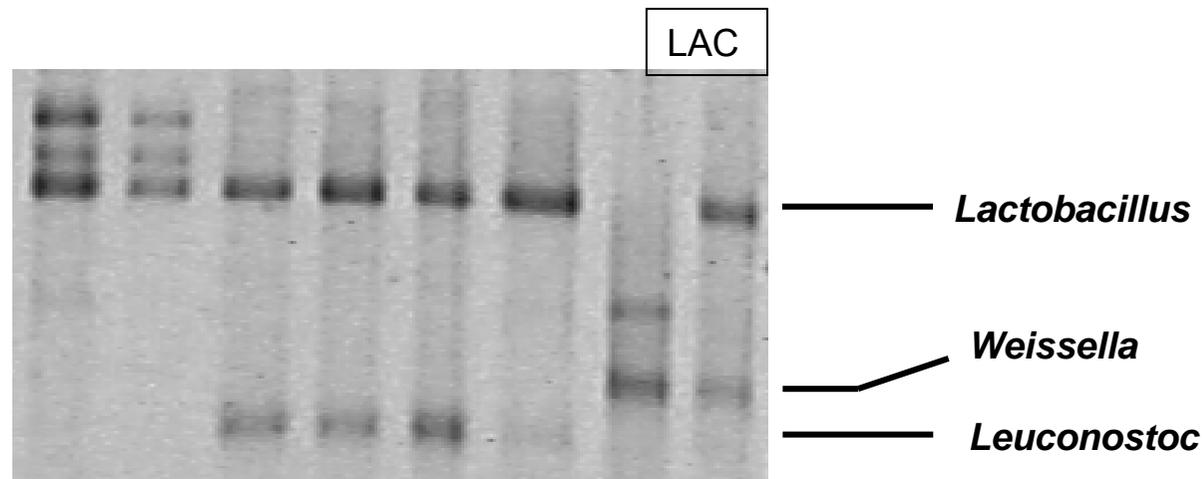
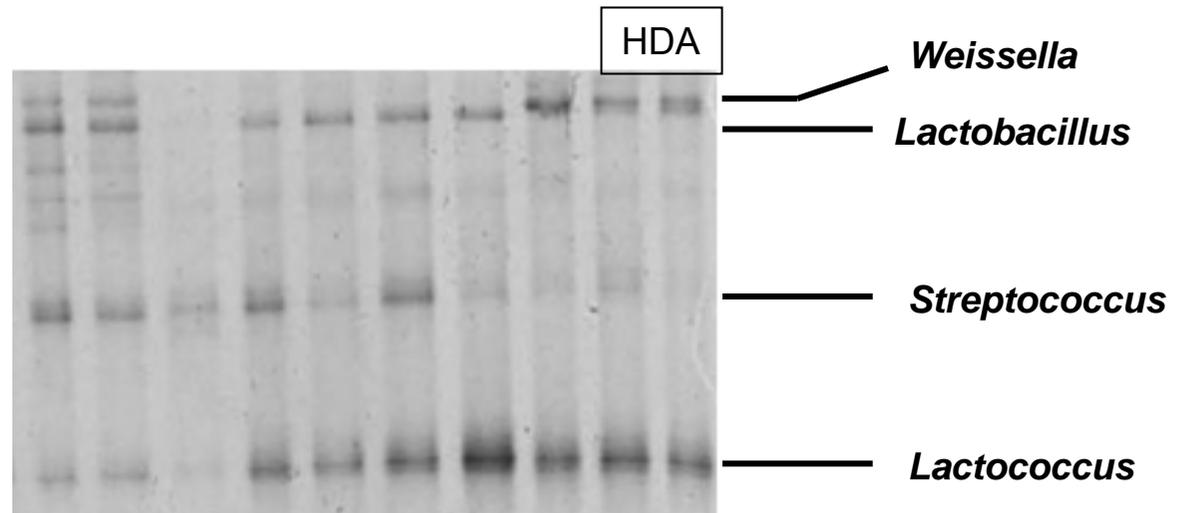


RESULTADOS

I Identificación de la microbiota láctica dominante

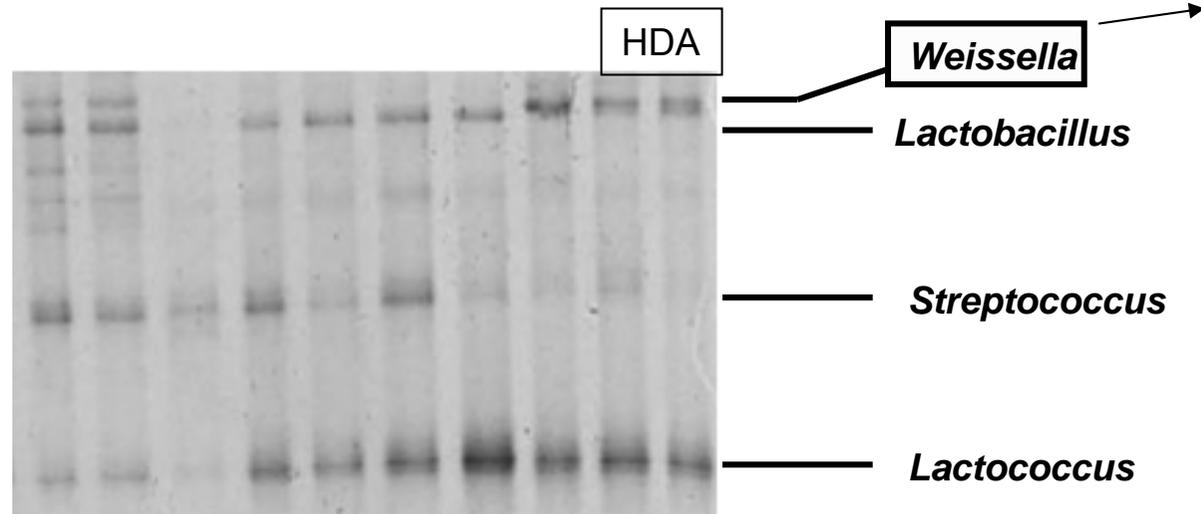


Microbiota láctica DOMINANTE identificada en los quesos con HDA y LAC

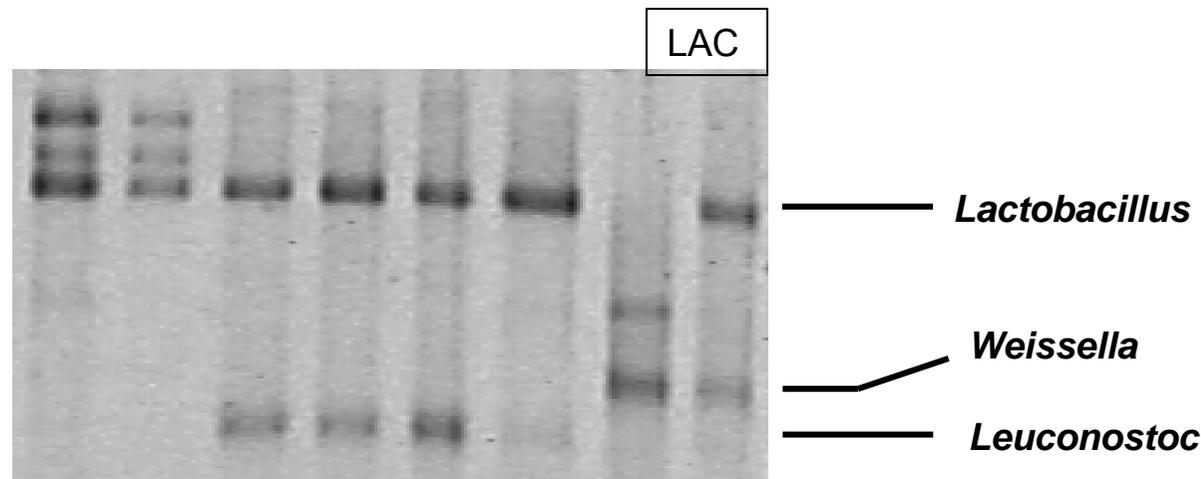


Todos descritos en quesos de cabra, con excepción de *Weissella*

Microbiota láctica DOMINANTE identificada en los quesos con HDA y LAC



- no ha sido reportado previamente en quesos de cabra
- descrita en leche de cabra (Badis y col, 2004) y en forraje fermentado (Bjorkroth y col, 2002)



RESULTADOS

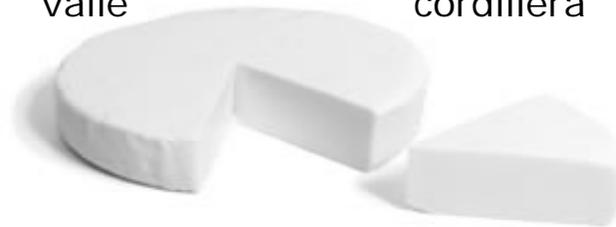
II Caracterización de la microbiota láctica según **zona geográfica** de producción



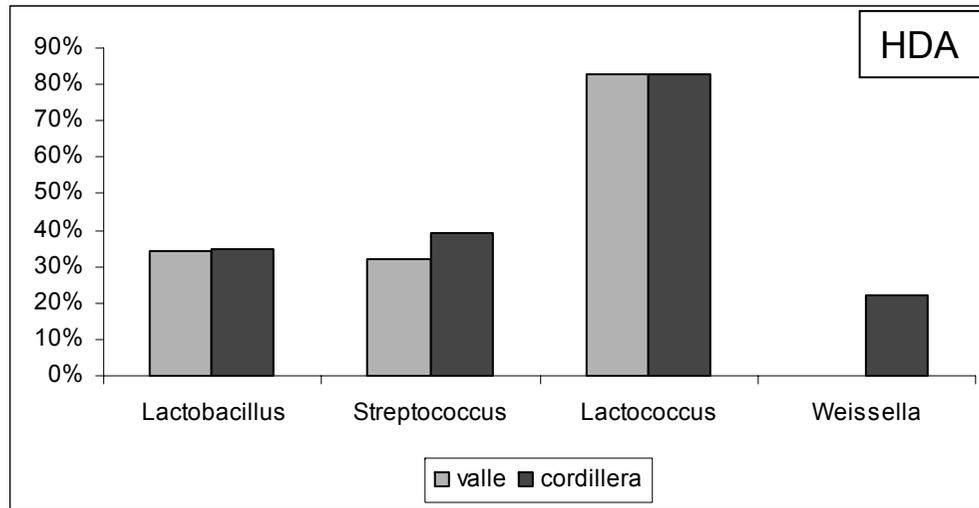
valle



cordillera

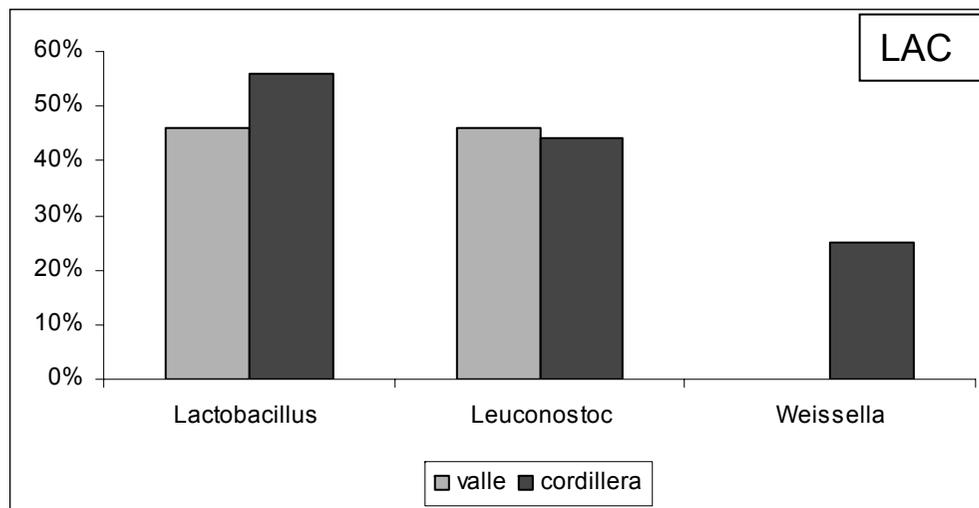


Microbiota Láctica según ZONA GEOGRAFICA

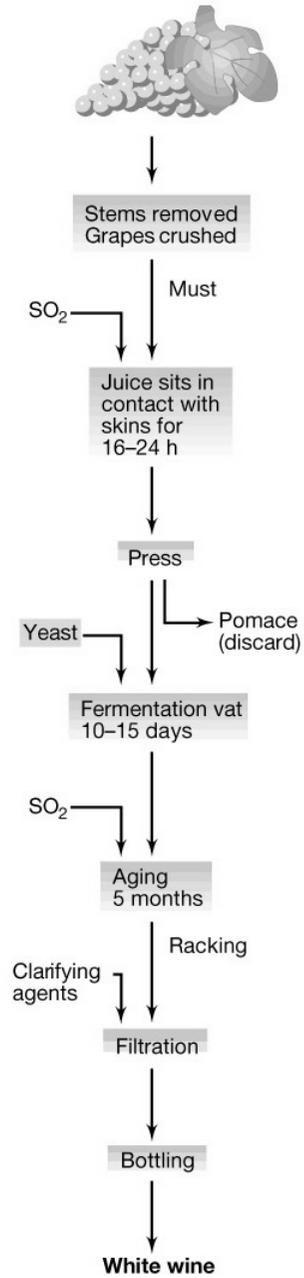


La microbiota láctica no presentó diferencias significativas entre zonas geográficas observables mediante PCR-TTGE

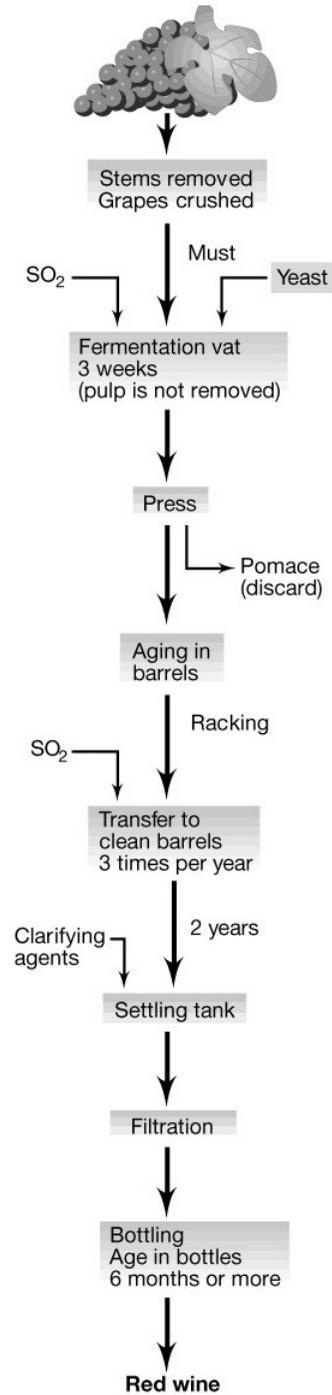
- *Lactococcus* es el género más frecuente
- La frecuencia de los demás géneros es similar



- La gran diferencia entre ambas zonas es la presencia de *Weissella* sólo en cordillera.

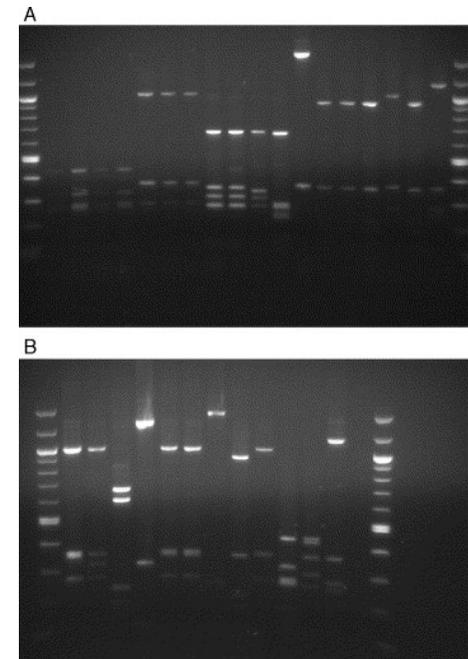


(a)



(b)

Selección de levaduras ITS, RFLP mitDNA



Levaduras genéticamente modificadas y self cloned yeast

Superproducción de glicerina

La glicerina aporta suavidad, redondez y cuerpo al vino. La producción de este producto secundario de la fermentación alcohólica está íntimamente ligada a la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, codificada por el gen GPD1.

Grossmann *et al.* (2001) han demostrado que la sobreexpresión de este gen implica un aumento en la producción de glicerina, que puede alcanzar los 20 g/l en el vino, aunque alguna anomalía sensorial también aparece como consecuencia de la elevación de acetaldehído y acetato de etilo.

Actividades enzimáticas

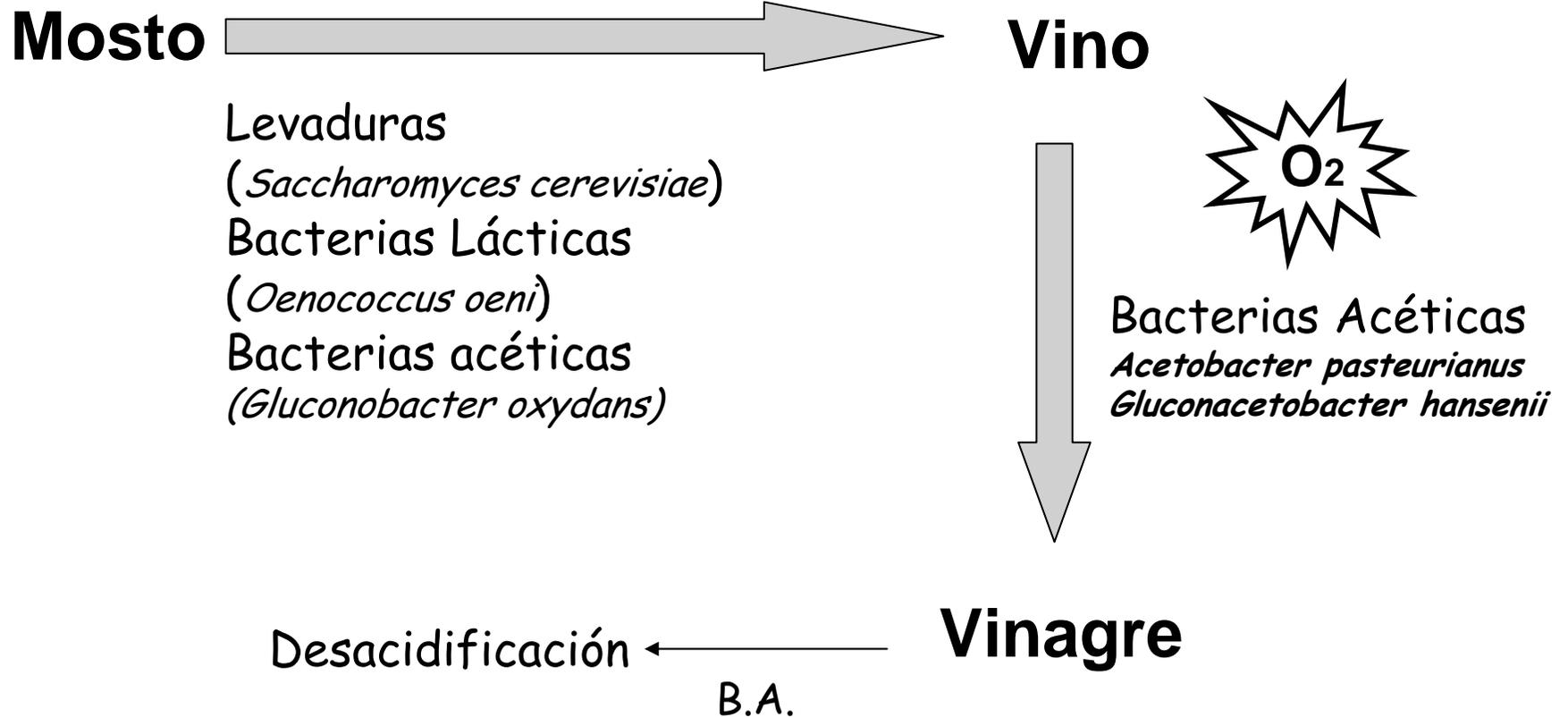
Laing y Preotrius (1993) constituyeron cepas de *S. cerevisiae* capaces de hidrolizar eficientemente las pectinas del mosto. El resultado se obtuvo mediante coexpresión del gen pectatoliasa (peIE) de *Erwinia drysanthemii* y del gen poligalacturonidasa (peh 1) de *Erwinia carotovora*.

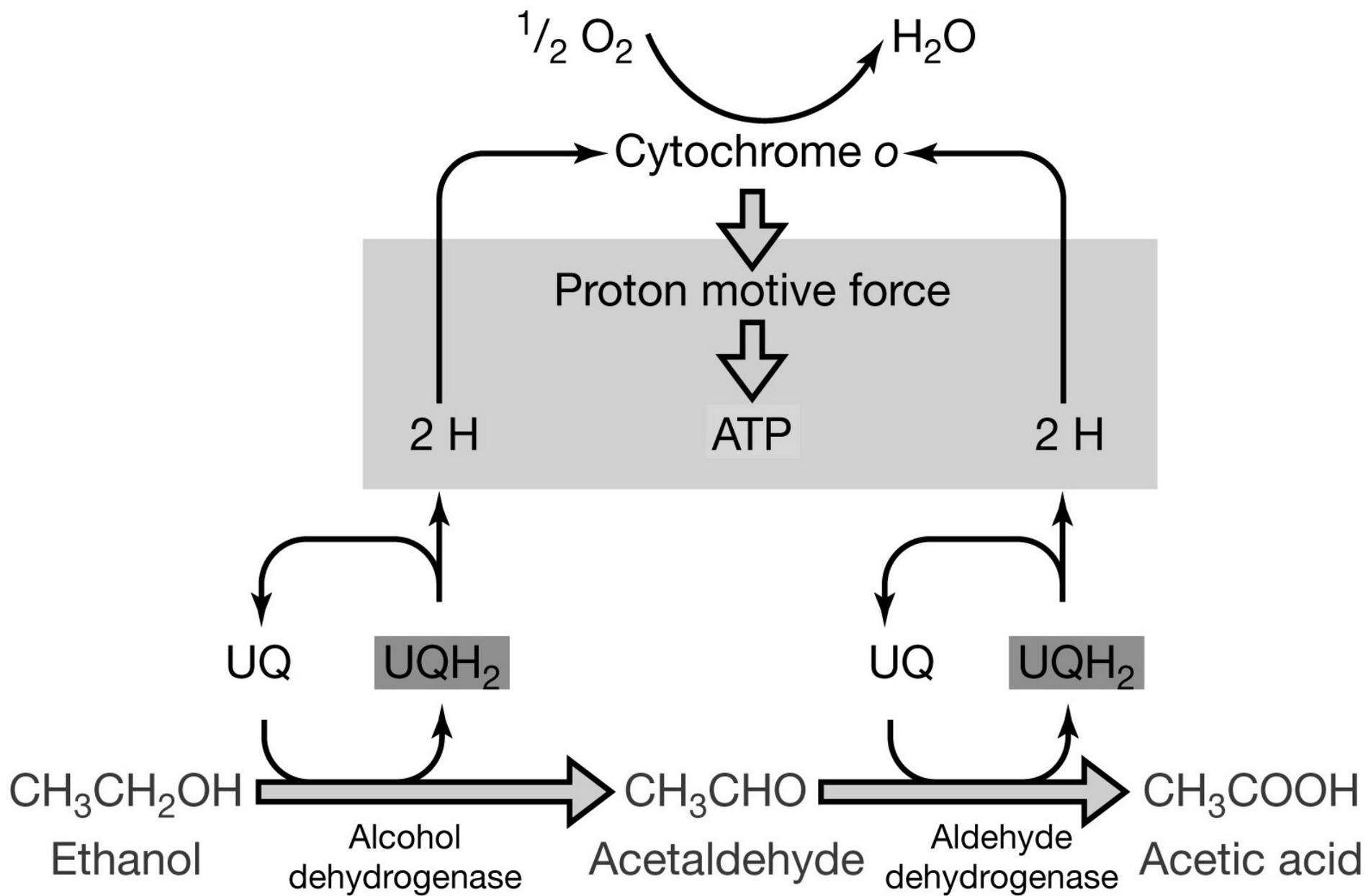
Actividad maloláctica

Durante la fermentación maloláctica, se rebaja la acidez de los vinos al descarboxilar el ácido L-málico a ácido L-láctico. Esta reacción está catalizada por la enzima maloláctica que ha sido purificada de varias bacterias lácticas. Los genes correspondientes han sido clonados de aislados de *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis* y *Oenococcus oeni*. Las cepas de *S. cerevisiae* no pueden metabolizar el malato del mosto, por lo que se ha trabajado mucho para expresar el gen que codifica la enzima málica en la levadura vínica.

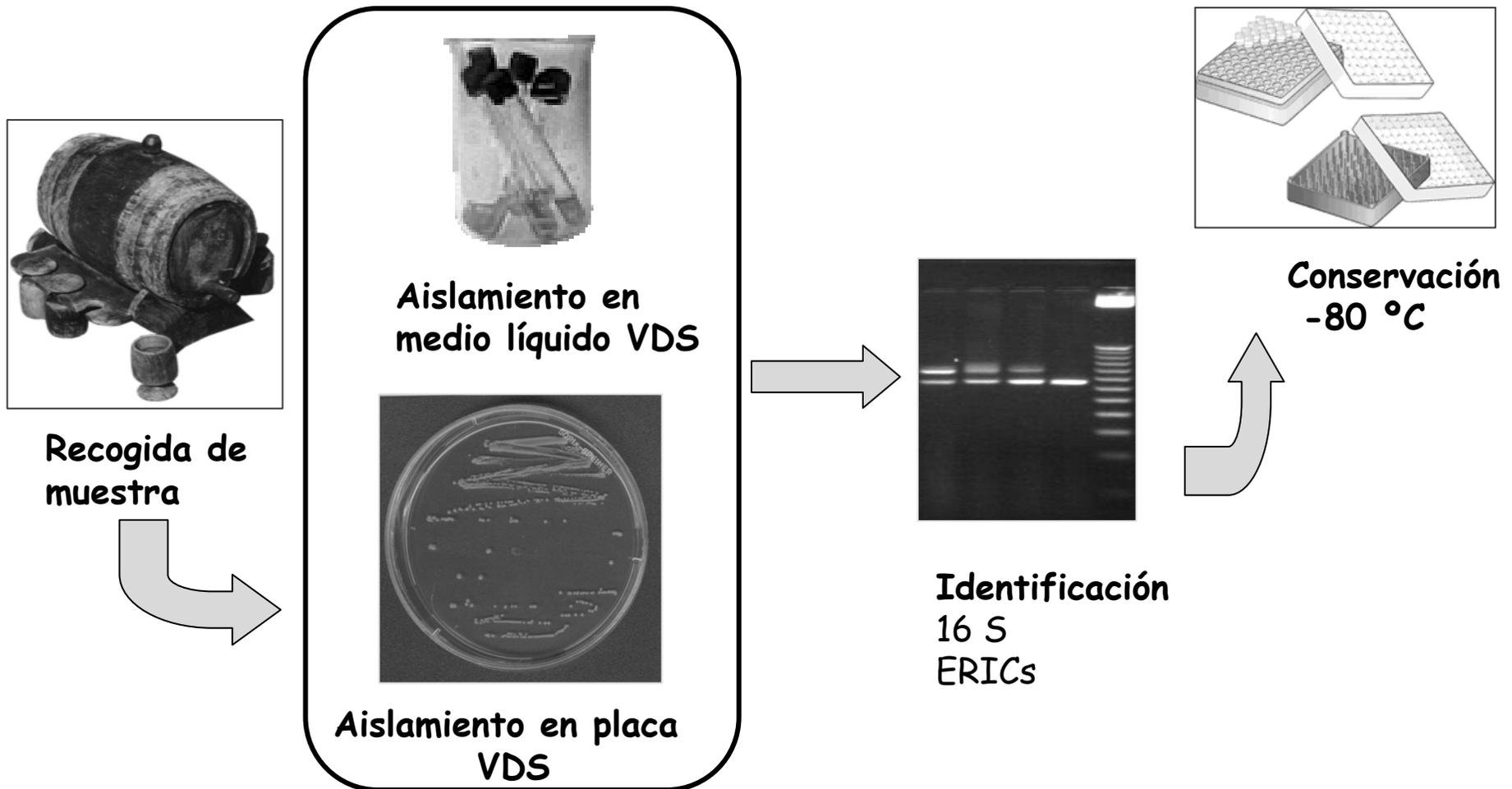
Posteriormente se construyó una levadura *S. cerevisiae* recombinante que porta un gen de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* que codifica una malato permeasa y el gen de *L. lactis* que codifica la enzima maloláctica. Según algunos investigadores, esta levadura es capaz de fermentar 4,5 g/l de malato en mostos artificiales en tan sólo cuatro días (Querol *et al.*, 1996).

Proceso de transformación del mosto de uva

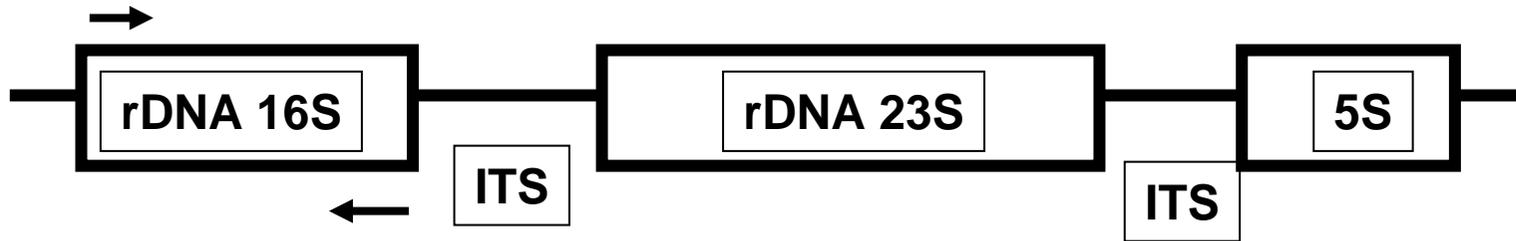




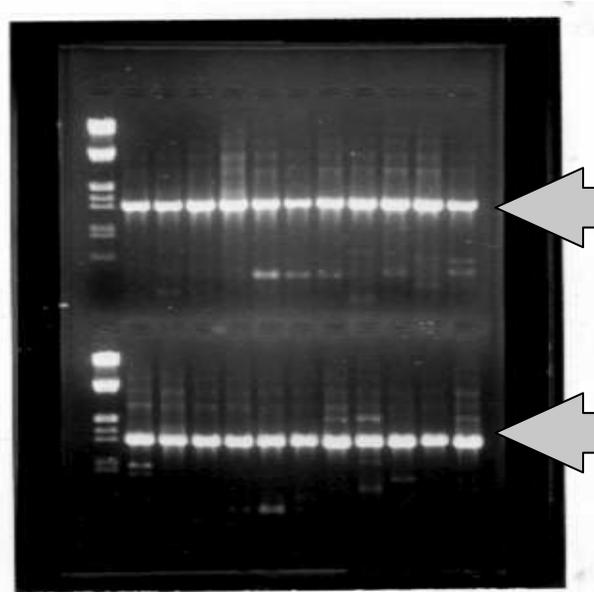
Aislamiento y conservación de cepas utilizando medio de cultivo (vino diluido sintético, VDS).



Métodos moleculares: especie



**Ampliació
d'un fragment
del DNA
ribosomal 16S**

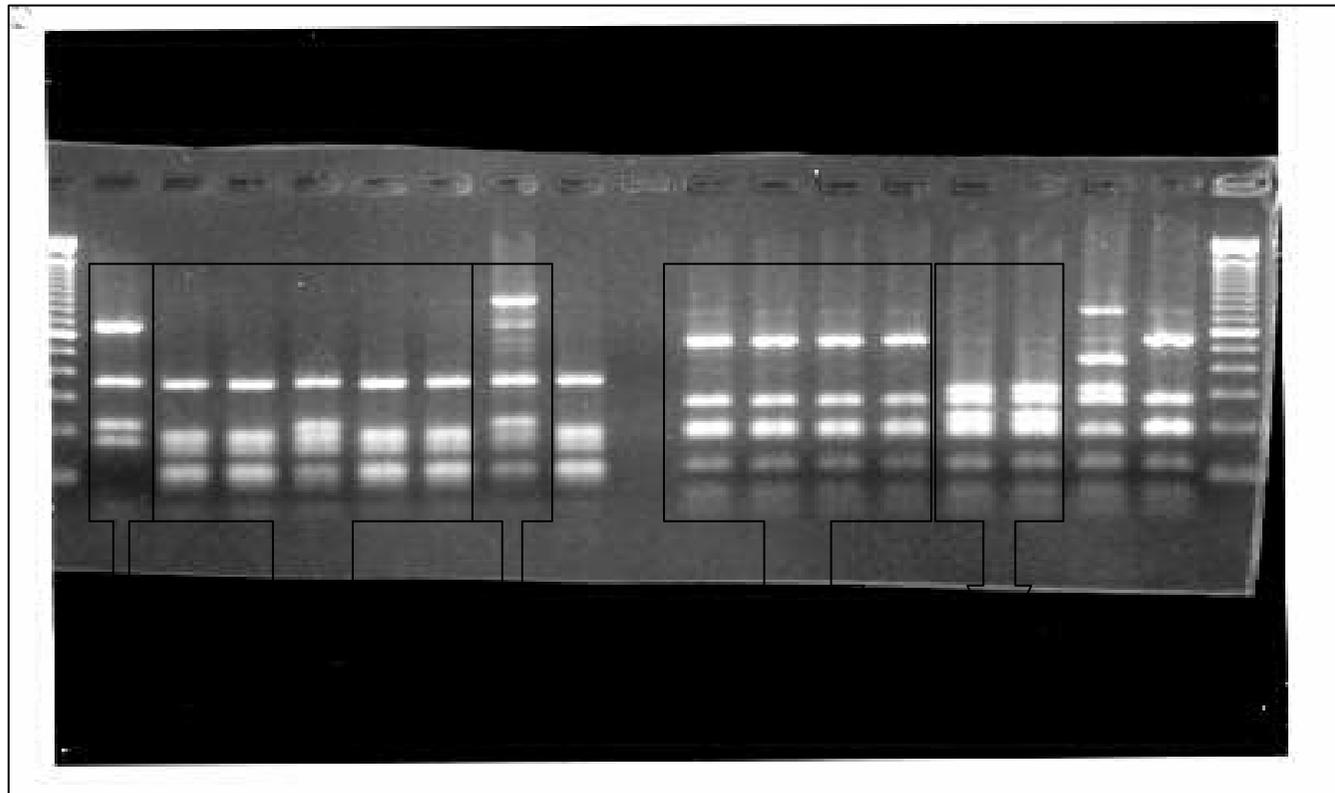


**Amplificats
(~1450 pb)**

**Amplificats
(~1450 pb)**

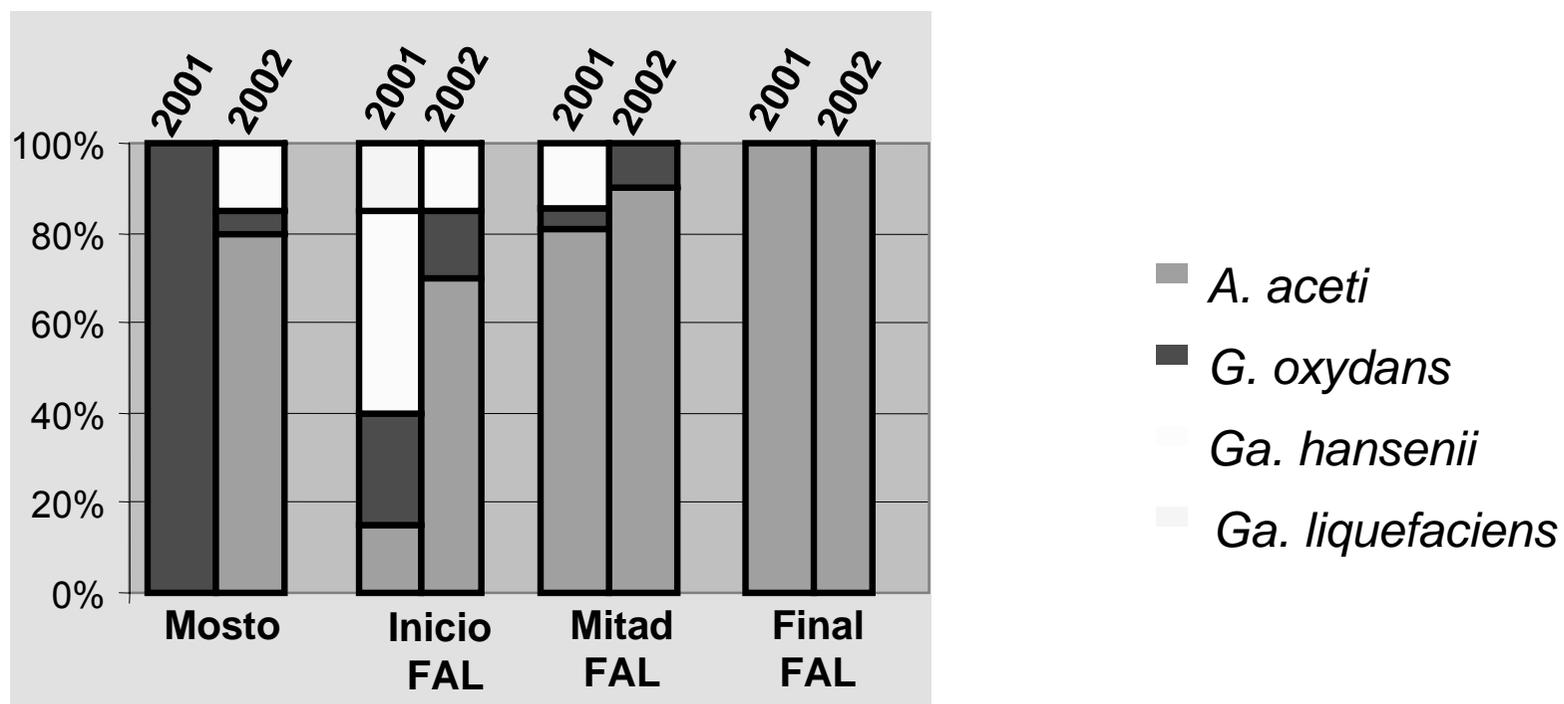
Métodos moleculares: especie

Patrones de restricción con *TaqI* de los amplicons del 16S rDNA

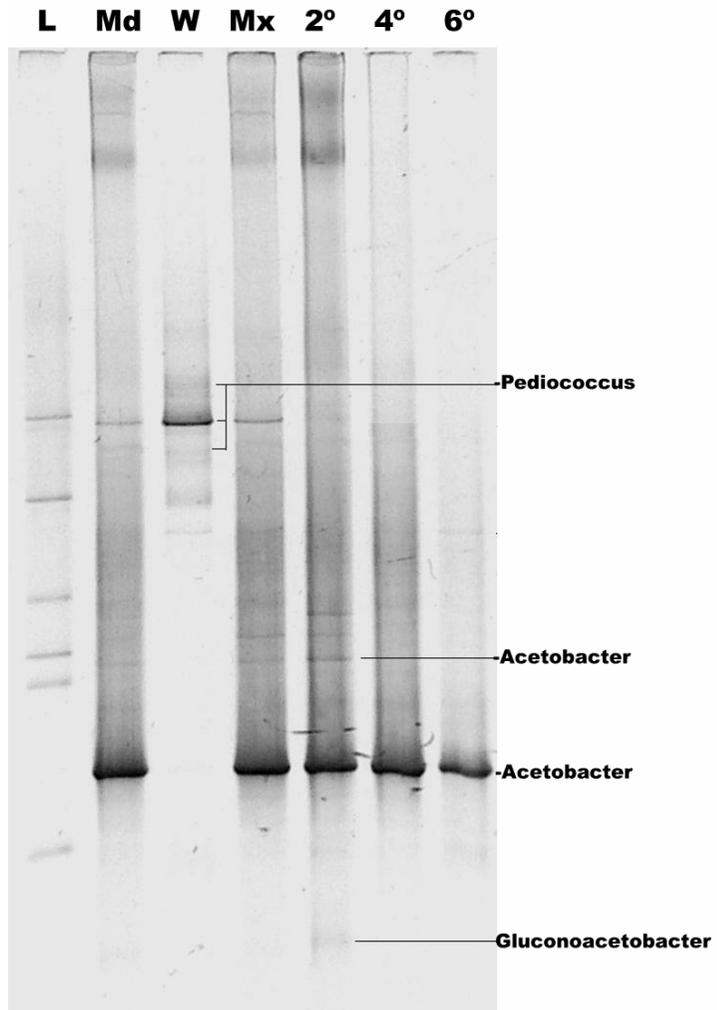
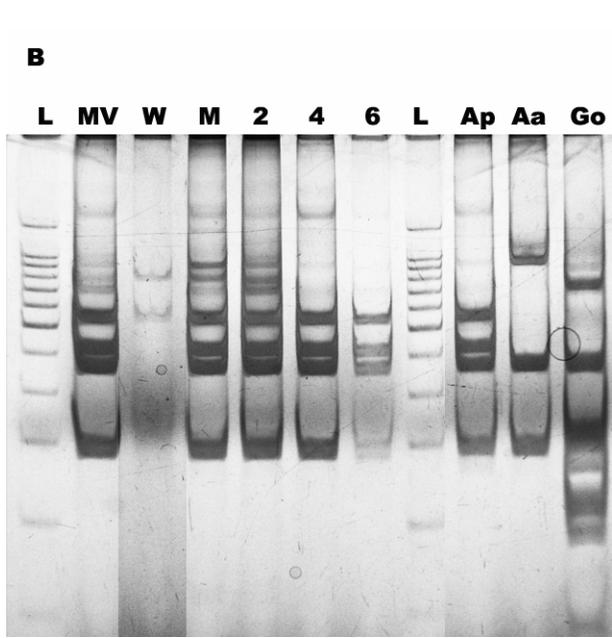




Distribución de especies de AAB durante la Fermentación alcohólica



Seguimiento cultivo independiente de comunidad en el vinagre

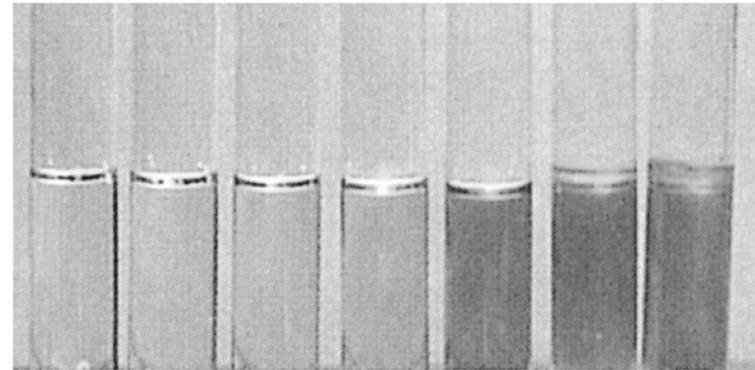


Chile: país minero, participación de sistemas microbianos



(c)

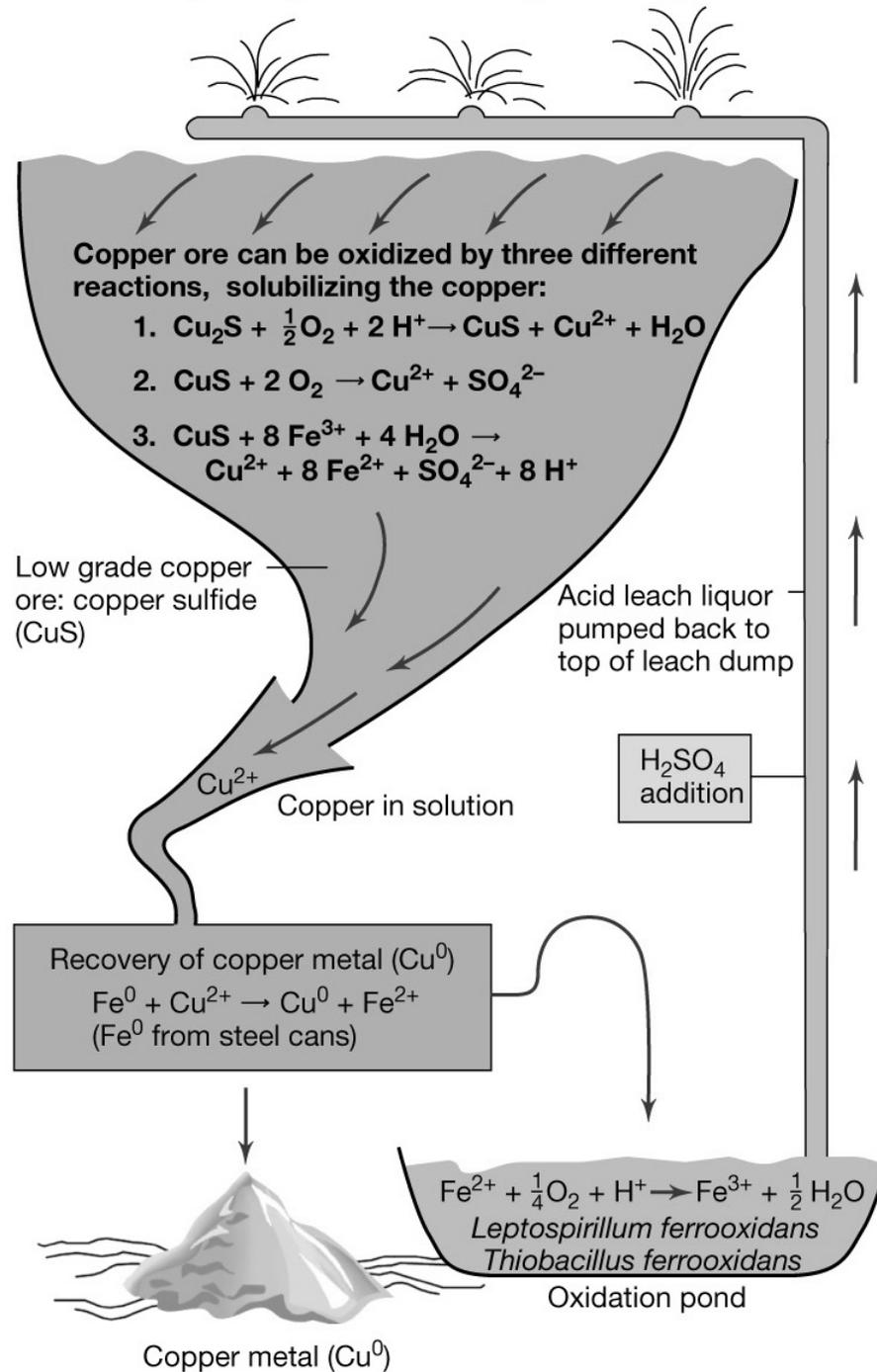
T. D. Brock

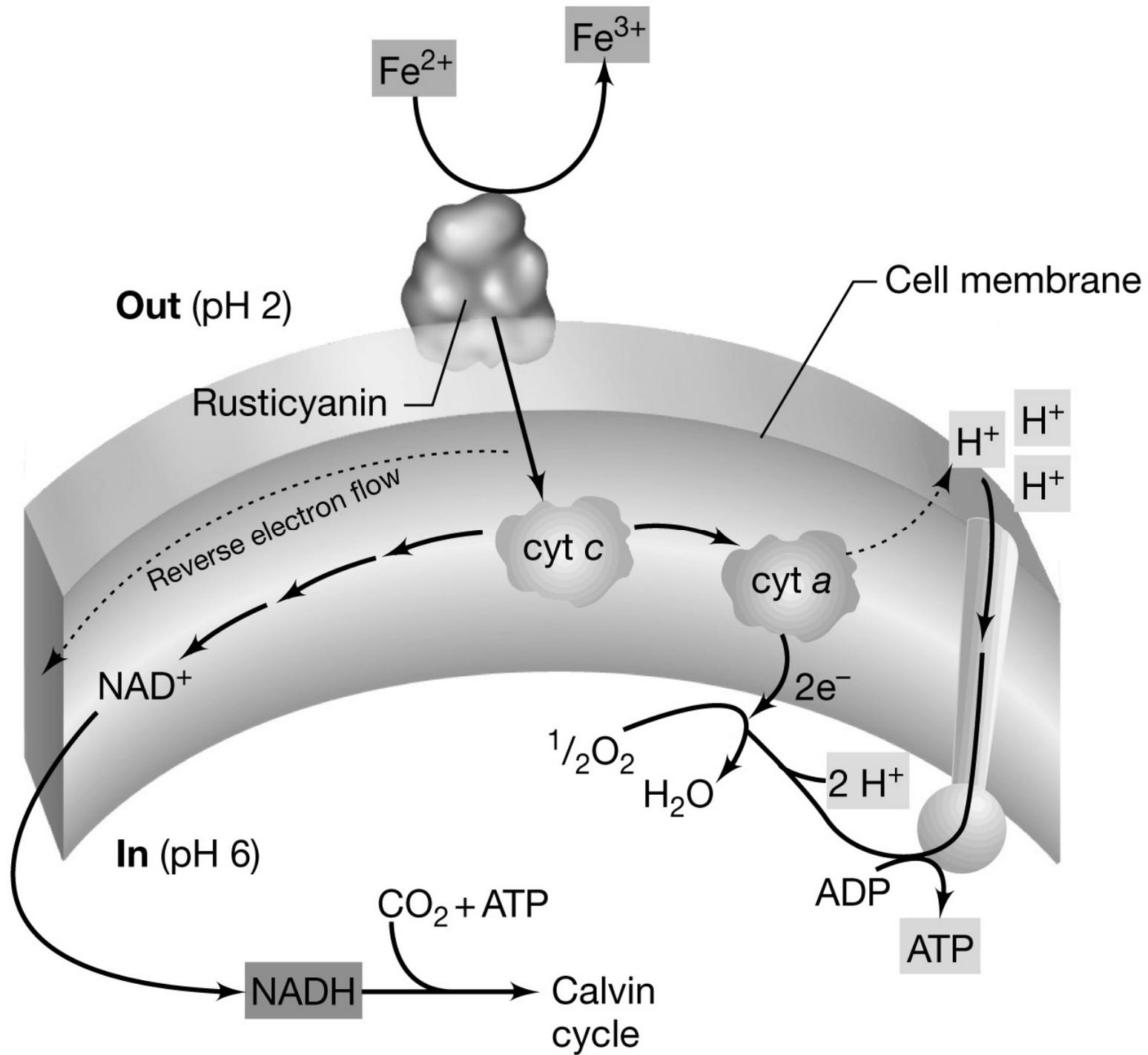


(b)

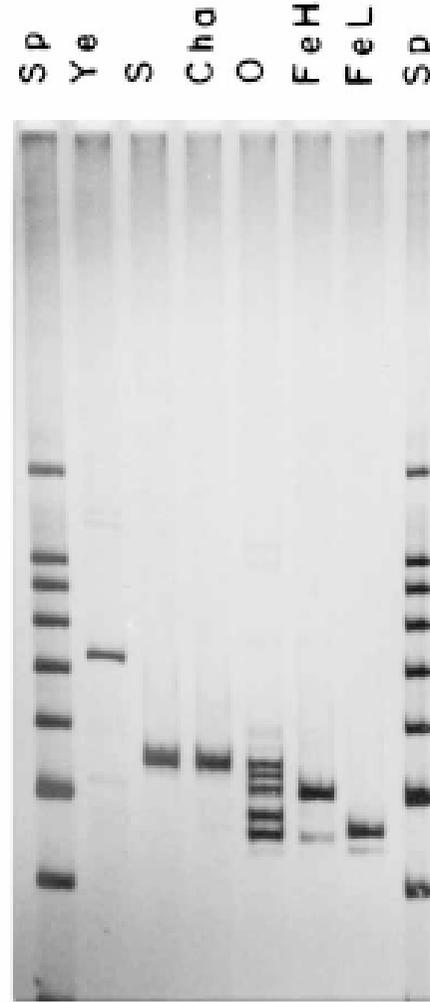
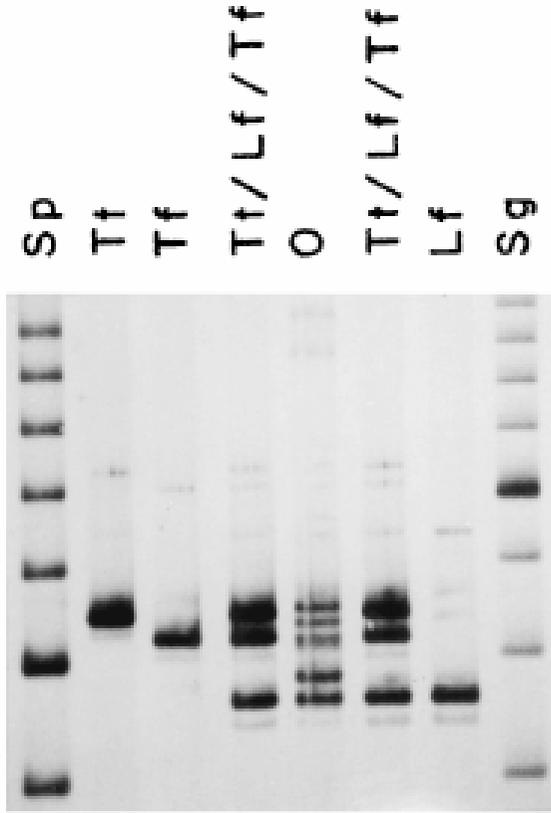
T. D. Brock

Sprinkling of acidic leach liquor on copper ore





Comunidades en biolixiviación- Uso ITS



Selección de microorganismos en biolixiviación

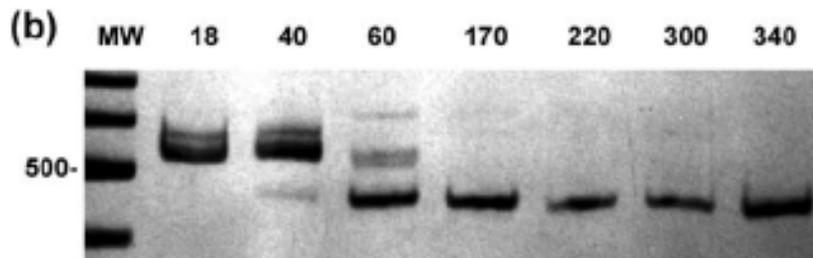
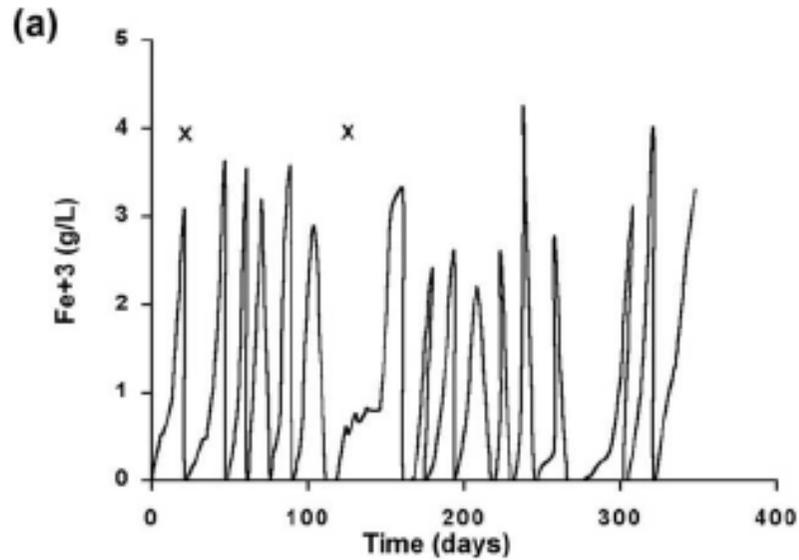
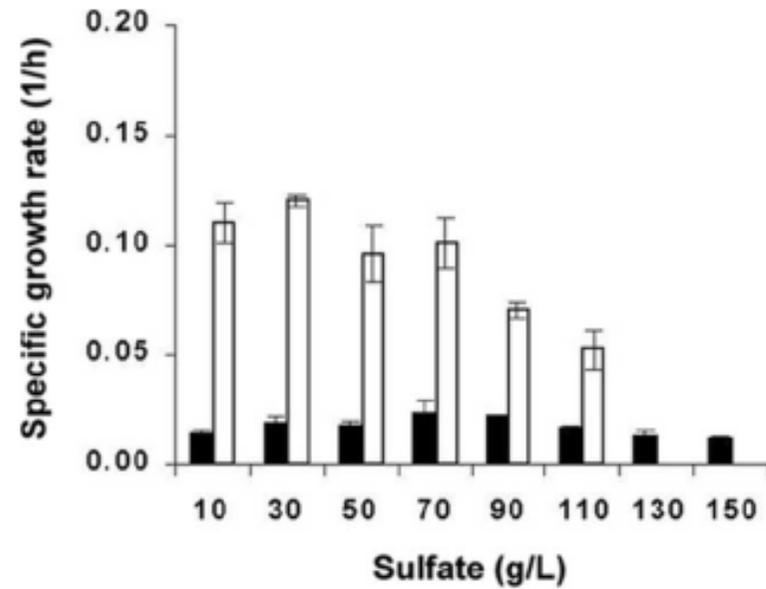
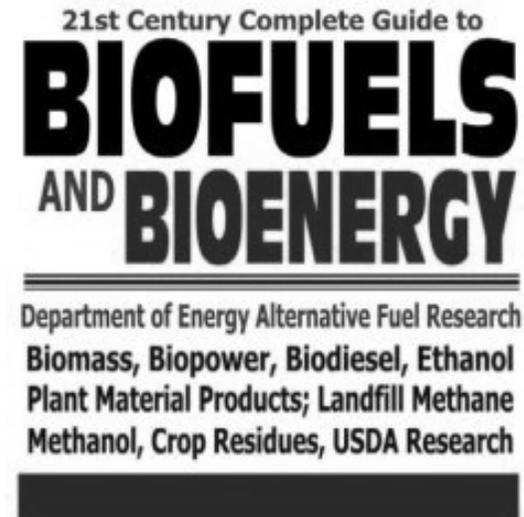


Fig. 1. Growth of iron-oxidizing bacteria in high sulfate media. (a) Ferric iron production in serial subcultures. The decrease in ferric iron to zero indicates the initiation of a new serial subculture. X indicates the medium



LA strain vs *A. ferroxidans*,
crecidos en 150 y 110 g/L

Production of fuels



Microbes produce ethanol for gasohol and methane for natural gas. Yeast ferment cornstarch to yield ethanol; bacteria decompose sludge, manure or landfill wastes to produce methane.