



Sistemas bacterianos y sus aplicaciones

¿cómo estudiarlos?

Sistemas bacterianos y sus aplicaciones

Objetivo

Entregar las bases y aplicaciones prácticas de las herramientas biotecnológicas en diversos sistemas.

Énfasis: estudio de comunidades bacterianas a través de métodos cultivo independientes.

Competencias

- Capacidad de aplicar los conocimientos adquiridos para el diseño de estrategias para la construcción de nuevas herramientas biotecnológicas de aplicación en bioprocesos.
- Capacidad para abordar problemas desde la base que otorga el conocimiento de un sistema
- Desarrollo de la percepción de las oportunidades que pueden derivarse de la aplicación de nuevas estrategias biotecnológicas.

Sistemas bacterianos y sus aplicaciones

Capítulos

- Generalidades – conceptos relacionados con la aproximación metodológica.
- Microorganismos en sistemas naturales-ciclos elementos C, N, P, S.
 - Importancia a nivel global
- Sistemas Microbianos asociados a hospederos-animales
 - Humanos, rumen, peces herbívoros- ejemplo salmón
- Sistemas Microbianos en alimentos y producción
 - Quesos, vinos-vinagres, 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 Microbianos: Identificar componentes-limitaciones de estudio

MICROBIOLOGICAL REVIEWS, Mar. 1995, p. 143-169
0146-0705/95/040143-27
Copyright © 1995, American Society for Microbiology

Vol. 59, No. 1

Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation

RUDOLF I. AMANN,* WOLFGANG LUDWIG, and KARL-HEINZ SCHLEIFER
Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, D-85200 Munich, Germany

THE CAUSE FAILURE OF MICROBIOLOGISTS TO DESCRIBE NATURAL DIVERSITY	143
The "Great Plate Count Anomaly"	144
Well-Known Uncultured Microorganisms	144
How Much of the Microbial Diversity Is Currently Known?	144
POSSIBLE SOLUTION: ANALYSIS OF rRNA MOLECULES	145
Retrieval of rRNA Sequence Information	
Designing Probes by Comparative Sequence Analysis	
Quantitative Dot Blot Hybridization	
Whole-Cell and In Situ Hybridization	
Closing In with Nested Probes (Top-to-Bottom Approach)	
Putting It All Together: the rRNA Approach	
APPLICATIONS OF THE rRNA APPROACH	
Symbiotic Bacteria and Archaea	
Chemosynthetic Invertebrates	
Endosymbiotic bacteria in insects	
Bacterial and archaeal symbionts of protozoa	
Symbiosis between vertebrates and bacteria	
Identification of pathogens	152
Magnetotactic Bacteria	153
Marine Picoplankton	155
Immobilized Microbial Consortia: Biofilms	156
Detection of Soil Bacteria	157

Habitat	Culturability (%) ^a	Reference(s)
Seawater	0.001-0.1	43, 51, 62
Freshwater	0.2-5	57
Microtrophic lake	0.1-4	59
Optimized natural water	0.1-2	45
Activated sludge	1-17	100, 141
Sediments	0.2-5	57
Soil	0.3	153

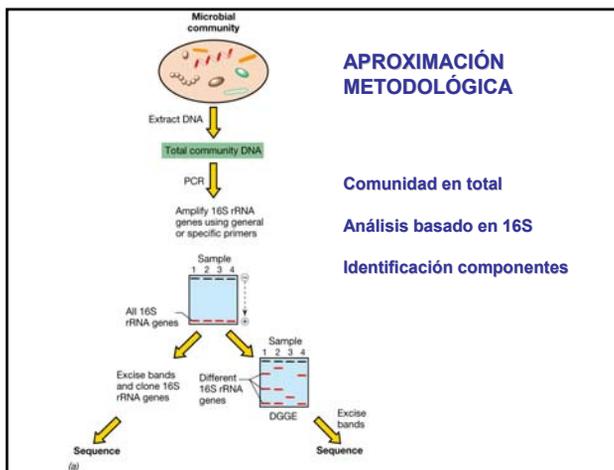
^aCulturable bacteria are assumed as CFU.

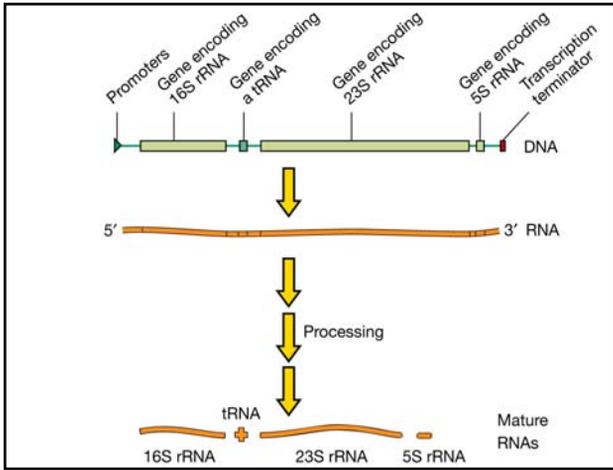
APROXIMACIÓN METODOLÓGICA

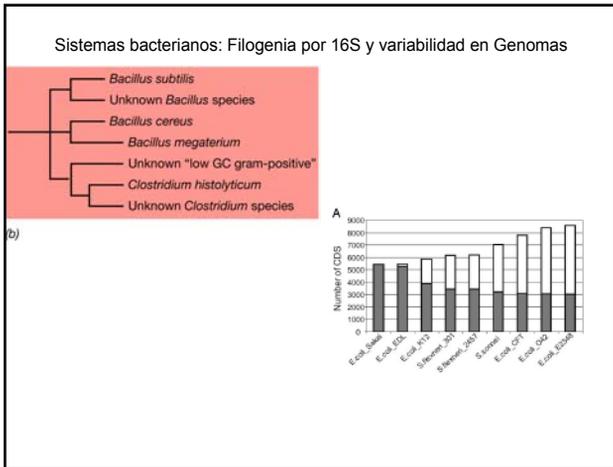
Comunidad en total

Análisis basado en 16S

Identificación componentes







Diferencias en Secuencias en Genomas Microbianos del mismo género

Science News
Comparing Chimp, Human DNA

The chimpanzee and human genomes are more than 98% identical, but there are a few critical DNA sequences that have diverged significantly in humans since the two species diverged about 5 million years ago, says Richard et al.

98% idénticos

Bacterial Chromosomes

3,806,533 bp

Asociaciones benéficas con animales

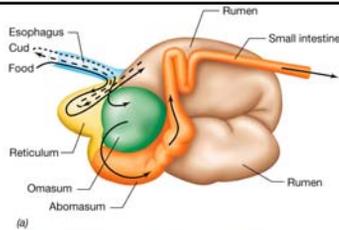


Rumiantes tienen un compartimento del tracto digestivo (rumen), en el cual habitan millones de microorganismos, con la capacidad de degradar la celulosa de las paredes vegetales.

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

Son esenciales para el desarrollo normal del animal.

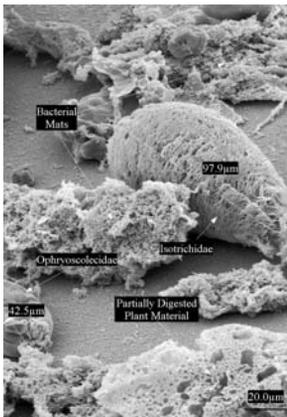
Rumen temperatura rango 38 – 42°C
pH rango 5.8-6.4.



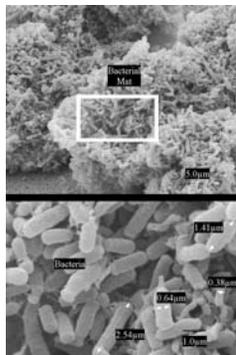
(a)



(b)



Imágenes de los Microorganismos en rumen



Sistemas Microbianos en alimentos y producción

Quesos: identificación de componentes bacterianos involucrados en quesos de diferentes regiones

Vinos-vinagres: dinámica de poblaciones y aislamiento para starters

Biolixiviación: participantes, ejemplos de aislamiento

Alimentos



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

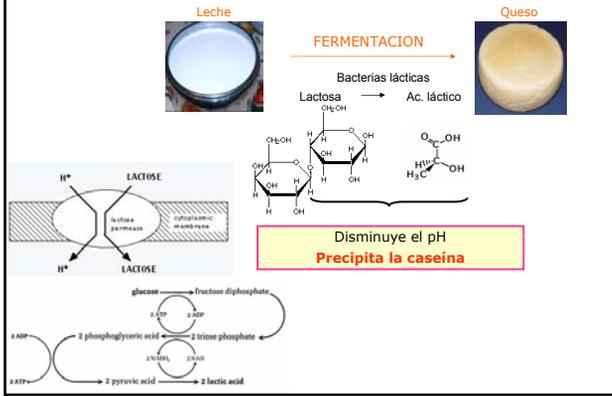
PROCESO de ELABORACION del QUESO

- 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:



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

ACIDIFICACION y COAGULACION de la leche



BACTERIAS LACTICAS



Lactobacillus



Leuconostoc



Pediococcus



Streptococcus

Aerococcus

Carnobacterium



Enterococcus



Lactococcus

Oenococcus

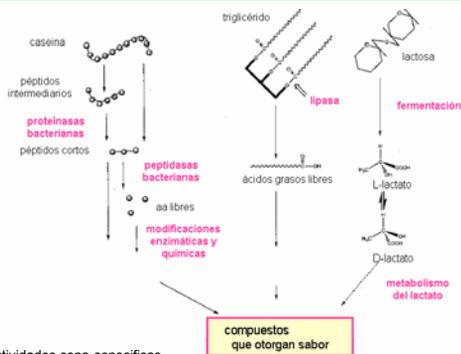
Tetragenococcus

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-especificas

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

- Zona geográfica (Buchin y col, 1999)
- Estación del año (Cardi 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

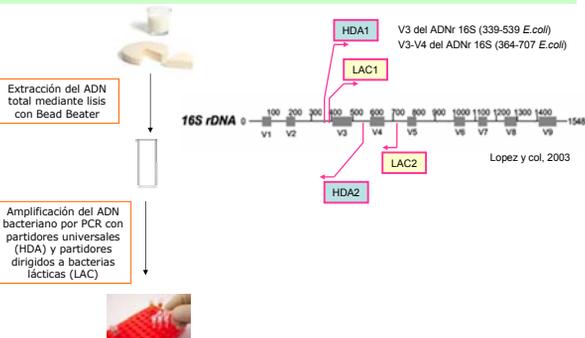
↳ valle y cordillera para evaluar posibles diferencias de la microbiota láctica

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

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

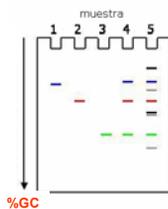
para evaluar la dinámica

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



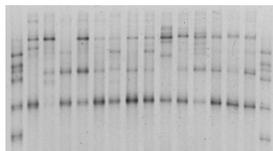
TTGE

electroforesis en gradiente temporal de temperatura

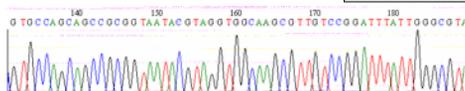


separa los amplicones por %GC

Identificación genotípica mediante SECUENCIACION del ADNr 16S

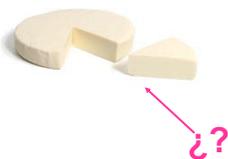


- todas las bandas fueron escindidas y eluidas de cada porción de gel
- se re-amplicaron en sextuplicado con los partidores correspondientes
- se cuantificó la cantidad de ADN re-amplicado
- se secuenciaron 2 o más bandas con igual movilidad electroforética
- se analizaron y editaron las secuencias
-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

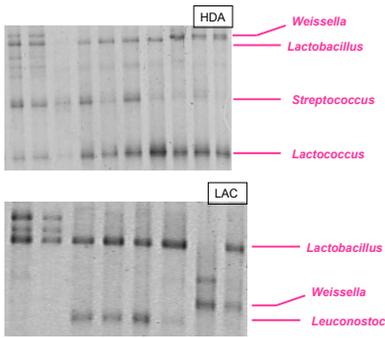


RESULTADOS

I Identificación de la microbiota láctica dominante

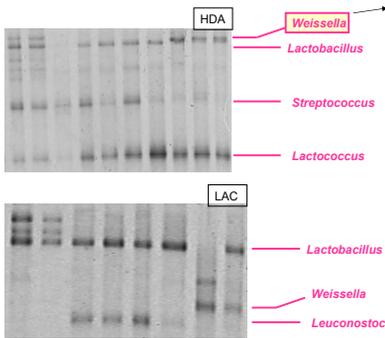


Microbiota láctica DOMINANTE identificada en los quesos con HDA y LAC



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

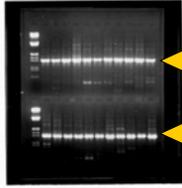
II Caracterización de la microbiota láctica según **zona geográfica** de producción



Métodos moleculares: especie



Ampliación de un fragmento del gen ribosomal 16S

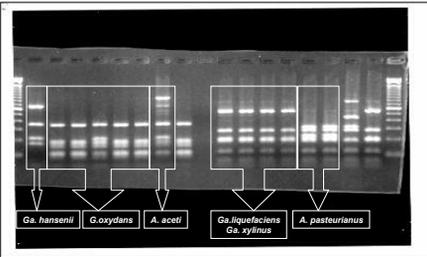


Amplicones (~1450 pb)

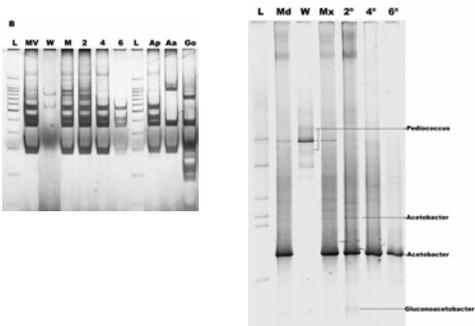
Amplicones (~1450 pb)

Métodos moleculares: especie

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



Seguimiento cultivo independiente de comunidad en el vinagre



Chile: país minero, participación de sistemas microbianos



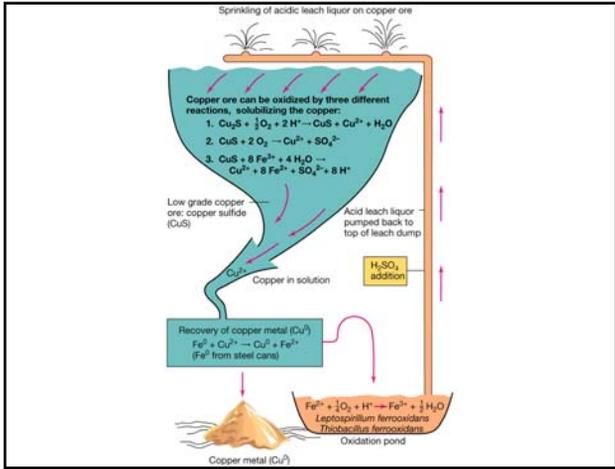
(c)

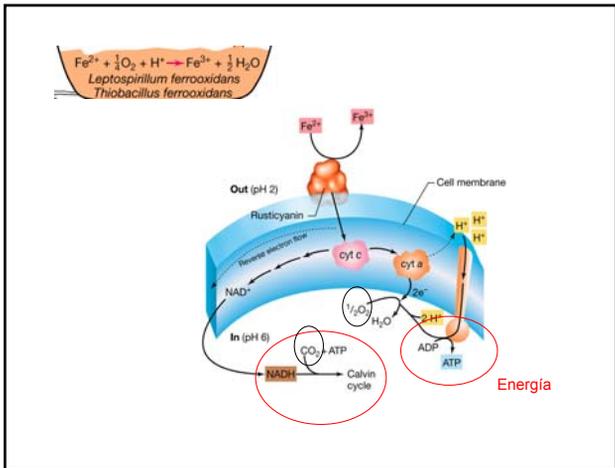


(b)

T. D. Brock

T. D. Brock

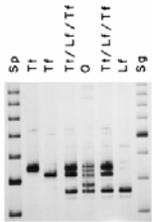




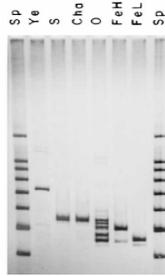
Comunidades en biolixiviación- Uso ITS



Cepas de colección vs mineral



Mineral en diversos medios



Selección de microorganismos en biolixiviación

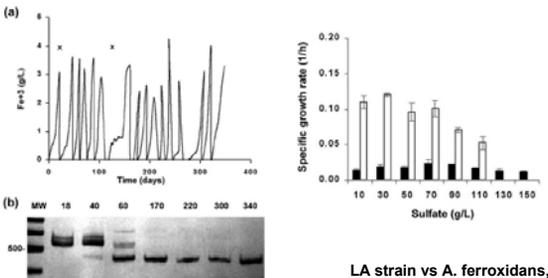


Fig. 1. Growth of iron-oxidizing bacteria in high sulfate media. (a) Ferrous iron production in serial subcultures. The decrease in ferrous iron to zero indicates the initiation of a new serial subculture. X indicates the medium.

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

Sistemas bacterianos y sus aplicaciones

- 1.- Generalidades – métodos indep-cultivo permiten identificar m.o. presentes en la naturaleza y en sistemas de producción.
- 2.- Los ciclos de los elementos C, N, P, S, tienen importancia global y las comunidades microbianas poseen un rol fundamental en ellos.
Ilustrativo para los balances de masas y conceptualización de los bioreactores sustratos, productos-interacciones.
- 3.- Las poblaciones microbianas pueden ser esenciales para hospederos animales.
Podemos usar sus actividades para beneficio del hospedero (leche, carne)
- 4.- Las metodologías cultivo independiente pueden aplicarse para analizar el comportamiento de las poblaciones naturales o de bacterias introducidas en un sistema de alimentos y producción.
También son útiles para dirigir aislamientos de cepas de interés.
