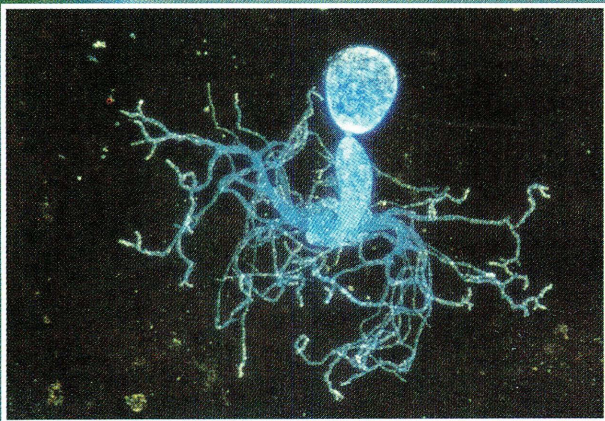
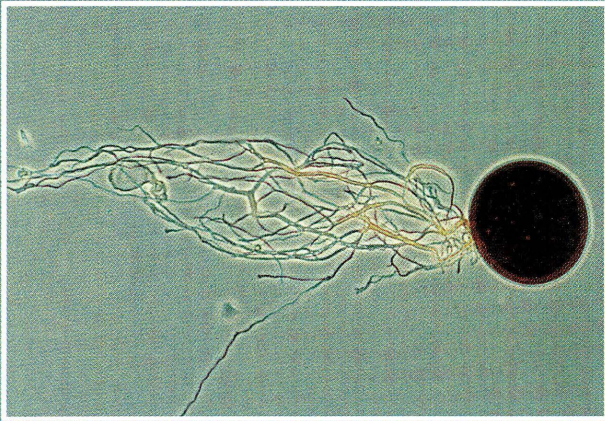


EL PODER DE LAS PARA ESTUDIAR



NUEVAS HERRAMIENTAS BACTERIAS

Por: **Fernando Rodríguez Villamizar, MSc**
Lab. Microbiología - Nutrición Animal CORPOICA



a posibilidad de estudiar las bacterias en su propio ambiente es hoy una realidad gracias al conocimiento de las secuencias de bases nitrogenadas de sus ácidos ribonucleicos ribosomales (ARNr), que han permitido el desarrollo de sondas moleculares que detectan y hacen visible una bacteria específica en un nicho microbiano determinado.

Los ARNr constituyen una pequeña parte del genoma de la bacteria (0.3 - 0.4 %) y están representados por tres moléculas que se distinguen por tener coeficientes de sedimentación diferentes en un gradiente de CsCl, 5S, 16S y 23S. La importancia del ARNr la representa el hecho que esta molécula porta dentro de su estructura secuencias nucleotídicas altamente conservadas, es decir, que han evolucionado más lentamente que el resto del genoma, constituyéndose entonces en un reloj biológico que aparentemente marca el tiempo, la distancia y el parentesco genético entre las bacterias.

Las sondas ADNr o ARNr no sólo permiten la realización de estudios ecológicos microbianos, sino que también se constituyen en una herramienta fundamental de identificación y clasificación taxonómica. A diferencia de otros sistemas, esta técnica no es dependiente del estado fisiológico del microorganismo o de su grado de crecimiento y lo más importante, no requiere de su aislamiento y cultivo.

DETECCIÓN *IN SITU* DE BACTERIAS

Utilizando sondas específicas se puede hibridar el ARNr 16S de una bacteria. El marcaje de la sonda usualmente con rodamina o fluoresceína, permite la visualización de la célula en un determinado microambiente, establece su morfología y distribución espacial y

EL ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO, ADN, ES LA MOLÉCULA QUE PORTA DENTRO DE SU ESTRUCTURA LA INFORMACIÓN GENÉTICA QUE EN TODO SER VIVIENTE SERÁ TRANSMITIDA DE GENERACIÓN EN GENERACIÓN. LEJANO AL NÚCLEO DE LAS CÉLULAS Y ASOCIADOS A LA ESTRUCTURA DE LOS RIBOSOMAS, OTRO ÁCIDO: EL RIBONUCLEICO RIBOSOMAL (ARNr), HA REGISTRADO A LO LARGO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS ESPECIES, PEQUEÑOS CAMBIOS O MUTACIONES AL INTERIOR DE SU CÓDIGO GENÉTICO, QUE LO HAN CONVERTIDO EN EL RELOJ BIOLÓGICO QUE MARCA Y REGISTRA LA HISTORIA NATURAL DE LA VIDA.

llega a determinar incluso su tasa de crecimiento *in situ*(1) (Figura 1). Una de las aplicaciones prácticas de esta técnica, ha sido realizada por el grupo de Stahl y colaboradores en la Universidad de Illinois(2), mediante la utilización de la sonda DHP 10006, a través de la cual se logró monitorear en el rumen de ovinos y bovinos la bacteria *Synergistes jonesii* que detoxifica la 3,4-dihidroxipiridona (DHP), sustancia generada en el hígado de los animales al consumir la leguminosa leucaena, *Leucaena leucocephala*. Teniendo en cuenta la amplia diversidad que ofrece el ecosistema microbiano del rumen, es notable que pueda llegar a detectarse de manera específica una especie entre numerosas poblaciones y subpoblaciones bacterianas (celulolíticas, hemicelulolíticas, pro-

LA IMPORTANCIA DEL ARNr LA REPRESENTA EL HECHO QUE ESTA MOLÉCULA PORTA DENTRO DE SU ESTRUCTURA SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS ALTAMENTE CONSERVADAS. ES DECIR, QUE HAN EVOLUCIONADO MÁS LENTAMENTE QUE EL RESTO DEL GENOMA, CONSTITUYÉNDOSE ENTONCES EN UN RELOJ BIOLÓGICO QUE APARENTEMENTE MARCA EL TIEMPO, LA DISTANCIA Y EL PARENTESCO GENÉTICO ENTRE LAS BACTERIAS.

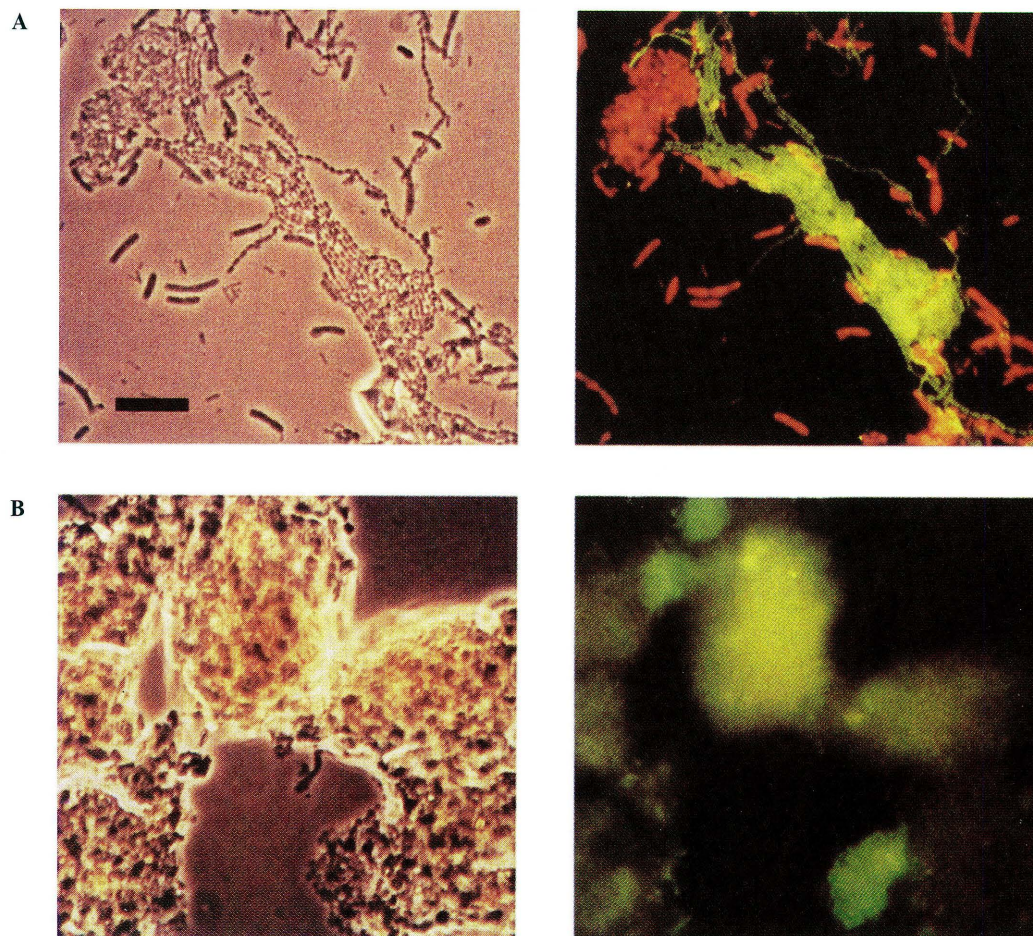


FIGURA 1. HIBRIDIZACIÓN IN SITU DE MUESTRAS DE LODO, A Y B, MICROFOTOGRAFÍAS EN CONTRASTE DE FASES Y EPIFLUORESCENCIA, MOSTRANDO CAMPOS IDÉNTICOS EN EL MICROSCOPIO. (A), HIBRIDIZACIÓN SIMULTÁNEA CON LAS SONDAS **GAM** MARCADA CON FLUORESCENCIA Y **BET** MARCADA TETRAMETILRODAMINA, COMPLEMENTARIAS AL ARNr 23S DE LA SUBCLASE GAMA Y BETA DE LAS PROTEOBACTERIAS, RESPECTIVAMENTE. (B), HIBRIDIZACIÓN CON LA SONDA **ALF** MARCADA CON FLUORESCENCIA, COMPLEMENTARIA A UNA REGIÓN EN EL ARNr 16S DE LA SUBCLASE ALFA DE LAS PROTEOBACTERIAS.

BARRA = 10 UM, MAGNIFICACIÓN X 1000. WAGNER Y COL. 1993

teolíticas, amilolíticas, diaminoativas, peptidolíticas, metanogénicas, etc.) las cuales agrupan decenas de géneros y especies.

La estrategia para abordar el estudio de la composición de un determinado nicho microbiano podría, a manera de ejemplo, incluir inicialmente la utilización de sondas universales para cualquiera de los grandes grupos bacterianos como Archaea y Proteobacterias (sondas 16S 915 y 16S 934, respectivamente), luego monitorear una población, como las sulforeductoras (sonda, 16S 647) y culminar con el seguimiento específico de una de las especies de este grupo, *Desulfovibrio desulfuricans*, a través de la sonda 16S 897; todo esto obviamente sujeto a los intereses del investigador(3).

Otras aplicaciones de las sondas ADNr/ARNr en estudios de ecología y dinámica microbiana

Los microbiólogos ven ahora una clara posibilidad metodológica de estudiar bacterias hasta ahora inculтивables como el caso de *Oscillospira guillermontii* (Figura 2), un gigantesco bacilo esporulado que alcanza hasta 50 mm de longitud y cuyo papel en el ecosistema ruminal es desconocido, aún después de haber sido descrita hace más de medio siglo. Otros microorganismos, como las bacterias que responden a campos magnéticos, vibrios que habitan los órganos luminiscentes de peces, bacterias que coexisten únicamente en el micronúcleo o macronúcleo de un para-



FIGURA 2. *OSCILLOSPIRA GUILLERMONDII* EN LÍQUIDO RUMINAL. NÓTESE LA PRESENCIA DE LA ENDOSPERA, CONTRASTE DE FASES, MAGNIFICACIÓN X 1000. NUTRICIÓN ANIMAL. CORPOICA.

Fotografías: Fernando Rodríguez V.

mecio, y sulfobacterias endosimbiontes de gusanos marinos, son algunos ejemplos de la diversidad microbiana a la cual podremos tener acceso con estas herramientas (3).

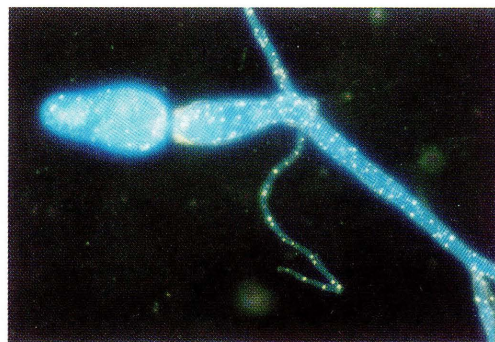
Otra de las posibilidades que ofrece la utilización de sondas *in situ*, es el seguimiento de biopelículas microbianas sobre una superficie determinada. En estos nichos, la disponibilidad de nutrientes es muy diferente a la del ambiente circundante y se llevan a cabo particulares interacciones biológicas y fisicoquímicas entre sus componentes, que en cultivos *in vitro* resultan difíciles de conocer (4).

En el campo médico podría tener utilidad para aquellas enfermedades donde el patógeno es visible pero no cultivable; como por ejemplo la Enfermedad de Whipple, donde el paciente sufre fiebre, dolor abdominal y diarrea como consecuencia de la presencia a nivel del duodeno de un bacilo no cultivable (3,5).

ESTUDIOS FILOGENÉTICOS BACTERIANOS UTILIZANDO ADN_r Y ARN_r

A través de la información contenida en los ADN_r y los ARN_r se han construido catálogos de secuencias genómicas que han permitido el establecimiento de árboles filogenéticos bacterianos y la disposición de sondas específicas. Con estas sondas se pueden monitorear poblaciones microbianas o especies particulares dentro de un extracto crudo total de ADN o de ARN proveniente de una muestra del ambiente o de loscidos nucleicos de una cepa purificada en el laboratorio (3)(Figura 3).

Para los actuales progresos en filogenética y taxonomía de las bacterias, incluyendo la discriminación de cepas dentro de una misma especie, ha sido fundamental el establecimiento de bases de datos internacionales a las cuales puede tener acceso el investigador. En la actualidad, la más importante se encuentra en la Universidad de Illinois, a través del recientemente constituido RDP (Ribosomal database Project) (6), el cual ofrece servicios y programas relacionados con ARN_r, entre los cuales se encuentran catálogos de secuencias de ARN_r ordenadas filogenéticamente, árboles filogenéticos, información acerca de las estructuras secundarias de los ARN_r y varios paquetes de Software para manipular, analizar secuencias y generar dendogramas y árboles.



PARA LOS ACTUALES PROGRESOS
EN FILOGENÉTICA Y TAXONOMÍA DE LAS
BACTERIAS, INCLUYENDO LA
DISCRIMINACIÓN DE CEPAS DENTRO DE
UNA MISMA ESPECIE, HA SIDO
FUNDAMENTAL EL ESTABLECIMIENTO DE
BASES DE DATOS INTERNACIONALES
A LAS CUALES PUEDE TENER ACCESO
EL INVESTIGADOR.

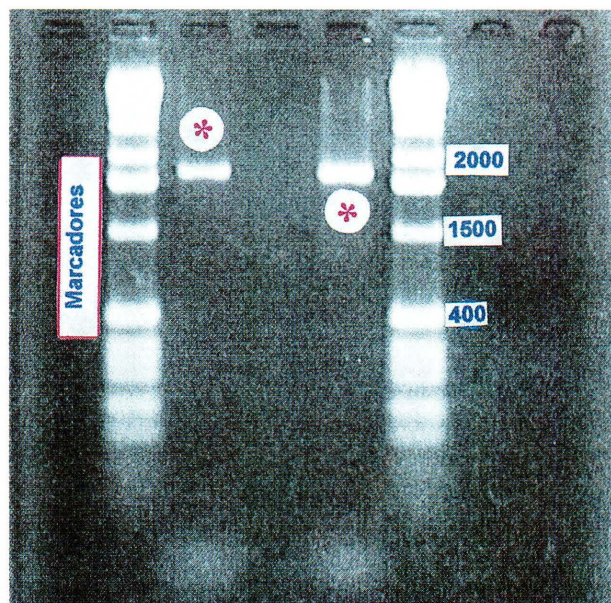


FIGURA 3. ADN_r DEL HONGO RUMINAL *NEOCALLIMASTIX FRONTALIS* AMPLIFICADO POR PCR. A TRAVÉS DE LAS SECUENCIAS DE ESTOS ÁCIDOS NUCLEICOS SE CONOCE LA HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS MICROORGANISMOS Y SE ESTABLECEN LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE AISLADOS DE DIFERENTES SITIOS GEOGRÁFICOS.

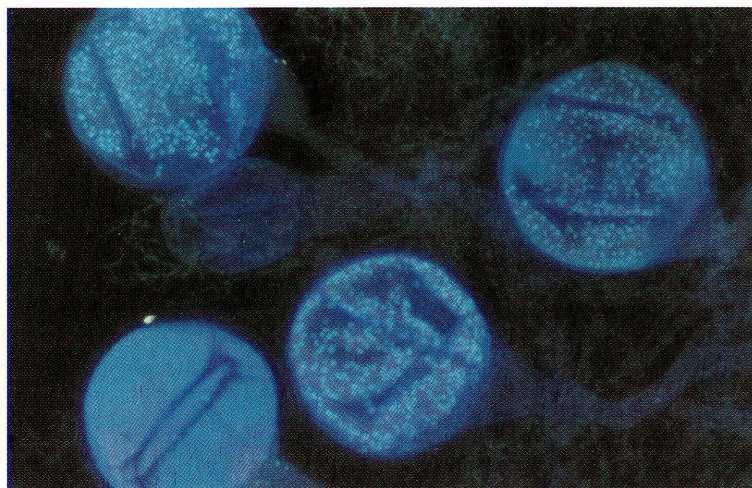
Fotografías: Fernando Rodríguez V.

Cualquier usuario puede, desde su laboratorio, introducir vía correo electrónico, la secuencia de un ARNr en particular y el sistema evaluar e interpretar la información mediante la ejecución de todas las operaciones de que está dotado, hasta finalmente enviar los resultados al remitente.

La base de datos del RDP esta siendo alimentada continuamente con secuencias provenientes de dos de las colecciones más grandes de genoma: el GENBANK y el EMBL (European Molecular Biology Labora-

tory), al igual que de investigadores particulares y de colecciones privadas. Esta permanente renovación le permite al RDP generar cuatro versiones durante el año y mantener actualizados a sus usuarios.

Todo el conocimiento generado en este campo abre, sin duda alguna, muchas posibilidades de estudiar las bacterias en su propio hábitat y de comprender que a partir de las complejas interacciones que allí mantienen con otras comunidades, se definen muchas de las respuestas a nuestros interrogantes.&



Fotografías: Fernando Rodríguez V.



BIBLIOGRAFÍA

1. AMANN RI., BINDER BJ., OLSON RJ., CHISHOLM SW., DEVEREUX R., STAHL DA. «Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial opulations». **Appl. Environ. Microbiol.** 1990; 56(6): 1919.
2. MCSWEENEY CS., MACKIE RI., ODENYO AA., STAHL DA. «Development of an oligonucleotide probe targeting 16S rRNA and its application for detection and quantitation of the ruminal bacterium *Synergistes jonesii* in a mixed-population chemostat». **Appl. Environ. Microbiol.** 1993; 59(5): 1607.
3. AMANN RI., LUDWIG W., SCHLEIFER KH. «Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation». **Microbiol. Rev.** 1995; 59(1): 143.
4. POULSEN LK., BALLARD G., STAHL DA. «Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms». **Appl. Environ. Microbiol.** 1993; 59(5): 1354.
5. RELMAN DA., SCHMIDT TM., MACDERMOT RP., FALKOW S. «Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease». **N. Engl. J. Med.** 1992; 327.
6. LARSEN N., OLSEN GJ., MAIDAK BL., MCCAUGHEY JMC., OVERBEEK R., MACKE TJ., MARSH TL., WOESE CR. **Nucleic Acids Res.** 1993; 21(13):3021.
7. WAGNER, M., AMANN, R., LEMMER, H., SCHELEIFER. **Probing activated sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure.** **Appl. Environ. Microbiol.** 1993; 59 (5): 1520-1525