

Conceptos y técnicas en ecología fluvial

Edición a cargo de:

ARTURO ELOSEGI

Profesor titular de Ecología en la Universidad del País Vasco

SERGI SABATER

Catedrático de Ecología en la Universidad de Girona

Separata del capítulo 11

La biota de los ríos: los microorganismos heterotróficos

ANNA M. ROMANÍ

JOAN ARTIGAS

ANTONIO CAMACHO

MANUEL A.S. GRAÇA

CLÁUDIA PASCOAL

Primera edición: abril 2009

ISBN: 978-84-96515-87-1

© los autores, 2009

© de la edición en español, Fundación BBVA, 2009

La biota de los ríos: los microorganismos heterotróficos

ANNA M. ROMANÍ, JOAN ARTIGAS, ANTONIO CAMACHO,
MANUEL A.S. GRAÇA Y CLÁUDIA PASCOAL

11.1. Introducción

En los ecosistemas fluviales se pueden encontrar microorganismos heterótrofos tanto en el bentos como en el plancton. En el bentos, las bacterias, hongos y protozoos, juntamente con algas y cianobacterias, y dentro de una matriz mucilagínosa de polisacáridos y proteínas, forman el biofilm, que se desarrolla sobre los distintos sustratos del lecho (piedras, rocas, granos de arena, limo, hojarasca, macrófitos, madera). En arroyos de orden 1 a 4, la comunidad bentónica microbiana es la principal responsable de procesar la materia orgánica, siendo su biomasa mucho más significativa que la planctónica (Pusch et al. 1998). En ríos mayores (orden 5-8) se desarrolla una comunidad planctónica en la que encontramos bacterias, ciliados y flagelados.

Las bacterias bentónicas colonizan especialmente rocas, cantos rodados y sedimentos blandos. La densidad y diversidad de bacterias se ve afectada por múltiples factores, tanto químicos y físicos (disponibilidad de materia orgánica, temperatura, nutrientes, tamaño de grano del sedimento, oxígeno) como biológicos (desarrollo de la comunidad algal, actividad bacterívora de protozoos). Las bacterias pueden llegar a representar hasta un 10% del total de la biomasa microbiana bentónica en condiciones de luz (donde la mayor parte de la biomasa es algal), y hasta un 70% en el sedimento hiporreico. La densidad de bacterias en el bentos fluvial varía entre 10^6 - 10^9 células por cm^2 , y en el plancton entre 10^4 - 10^6 células por mL. La diver-

Entre los microorganismos heterotróficos de sistemas fluviales se cuentan bacterias, hongos y protozoos

sidad de la comunidad bacteriana y la variedad de sus capacidades metabólicas le otorgan un papel clave en los procesos ecológicos fluviales.

La forma de vida de los hongos acuáticos es muy distinta de la de las bacterias, ya que forman filamentos (hifas) y se reproducen mediante esporas. Los hongos acuáticos crecen preferiblemente sobre sustratos orgánicos (hojas, ramas, madera), llegando hasta el 90% de la biomasa microbiana en la hojarasca (mientras que las bacterias pueden representar sobre esos sustratos un 10% de la biomasa microbiana). Los hongos acuáticos más estudiados y más relevantes desde el punto de vista ecológico son los hifomicetos. Éstos desempeñan un papel fundamental en la descomposición de la materia orgánica de los ríos (Pascoal y Cássio 2008). Los hifomicetos acuáticos son conocidos por producir un elevado número de esporas (conidios), lo que contribuye a su dispersión y colonización en ambientes acuáticos (Gessner et al. 2003). Las extremidades de los conidios de los hifomicetos acuáticos producen mucílago que facilita la adhesión sobre los sustratos que colonizan y descomponen, en particular hojas provenientes de la vegetación ripariana (Gessner et al. 2007).

Los hongos y las bacterias son los principales descomponedores de materia orgánica de los ríos. Además hay numerosos microorganismos patógenos

Tanto bacterias como hongos realizan la crucial función de reciclar el material orgánico que entra en el ecosistema, ya sea éste de origen autóctono (producción primaria en el lecho del río) como alóctono (material de origen terrestre, hojarasca, ramas, madera). Estos microorganismos sintetizan enzimas extracelulares capaces de descomponer las moléculas orgánicas complejas y de gran tamaño, para incorporarlas en su organismo como fuente de C, N y P. En general, los hongos tienen mayor capacidad para descomponer material vegetal complejo como la celulosa y la lignina (enzimas celulolíticas y ligninolíticas como la celobiohidrolasa y la peroxidasa). Gracias a esta capacidad, los hongos rompen los tejidos vegetales y colonizan fácilmente el material vegetal y la hojarasca. En cambio, las bacterias tienen una mayor capacidad para descomponer polisacáridos simples y péptidos (enzimas polisacáridicos y peptídicos como la β -glucosidasa y las peptidasas) (Romaní et al. 2006). El proceso de descomposición microbiana por hongos y bacterias es esencial para la posterior utilización del material por parte de los macroinvertebrados. Además de su importante papel ecológico, algunos microorganismos fluviales adquieren relevancia como agentes patógenos. Entre los microorganismos causantes de enfermedades los hay autóctonos, como *Legionella*, pero la gran mayoría son consecuencia de la contaminación fecal (como virus, bacterias y protozoos parásitos). La monitorización de la concentración de agentes patógenos es esencial para el control de la calidad del agua y su potencial efecto infeccioso para la salud humana.

En este capítulo se describen algunas de las técnicas básicas que pueden permitir estudiar la estructura y el funcionamiento de las comunidades de bacterias y hongos fluviales. Se incluyen dos técnicas básicas de análisis de biomasa bacteriana y fúngica (técnica 22 y técnica 23), y otras dos técnicas adecuadas para el análisis de

la diversidad microbiana (técnica 24 y técnica 25). Como medida de la actividad de estos microorganismos y su papel en el ecosistema fluvial se incluyen la tasa de esporulación en hongos (técnica 26) y las medidas de las actividades enzimáticas extracelulares (técnica 27). Estas técnicas permiten entender aspectos cruciales de la ecología microbiana en los sistemas fluviales. Sin embargo, no se han incluido en este capítulo otras técnicas, tales como la medida de producción microbiana mediante la incorporación de acetato, glucosa, timidina o leucina marcados radiativamente (técnicas que pueden hallarse en multitud de manuales específicos), ni técnicas microscópicas que permiten el análisis de la arquitectura de la comunidad microbiana bentónica, como sería el uso de la microscopia confocal o de rastreo.

11.2. Toma de muestras de microorganismos heterotróficos fluviales

Para evitar la contaminación, la toma de muestras para el estudio de microorganismos heterótrofos debe realizarse utilizando material previamente esterilizado (lavado con etanol al 96% y agua Milli-Q o autoclavado). Por lo que respecta al muestreo y procesado de las muestras, podemos distinguir entre los microorganismos planctónicos y bentónicos. En función del estudio y de las características del río, interesará la comunidad microbiana planctónica o bien la bentónica. Dentro de un mismo tramo fluvial, las condiciones ambientales de corriente, oxigenación y luz pueden variar entre microhábitats y afectar significativamente a la biomasa, diversidad o actividad metabólica de la comunidad microbiana. El cuadro 11.1 resume las técnicas básicas de muestreo, que se concretan más adelante en cada técnica específica.

El muestreo de microorganismos debe hacerse con material estéril

Hábitat	Método de muestreo
Agua fluvial (comunidad planctónica)	Recoger un volumen de agua en viales de vidrio estériles
Rocas, cantos, guijarros (comunidad epilítica)	Sustratos artificiales de vidrio o cerámica de 1-4 cm ² , incubados en el río durante un mínimo de 6-8 semanas Rascar una superficie conocida mediante bisturí o cepillo previamente esterilizados con etanol y agua Milli-Q
Grava, arena, limo (comunidad epipsámica)	Corers de arena (tubo de metacrilato o polietileno de 2-6 cm de diámetro), submuestras (de aproximadamente 1-2 mL) con una jeringa cortada en su extremo Para el sedimento blando, pipeta de vidrio de 10 mL con soporte tipo embudo de goma en su extremo. Se recoge un volumen de material equivalente a una superficie de sedimento conocida
Hojarasca	Recoger hojarasca y cortar con un sacabocados (fig. 11.3, técnica 23) una superficie conocida de hoja (1-4 cm ²)
Macrófitas (comunidad microbiana epifítica)	Recoger una fracción de macrófitas, ocupando un área conocida de río.

Cuadro 11.1:
Procedimiento de muestreo para la comunidad microbiana en distintos hábitats fluviales

Técnica 22. Densidad y biomasa de bacterias fluviales

Para muestras planctónicas, el método más comúnmente utilizado es la tinción de una muestra líquida con DAPI (4,6-diamidino-2 fenilindol), la filtración con filtros de 0,2 μm de color negro y la observación y conteo con el microscopio de epifluorescencia (Porter y Feig 1980). Para muestras bentónicas, el método requiere primero separar las bacterias del sustrato y obtener una muestra homogénea en suspensión. El DAPI tiñe todo el DNA, el de células activas y no activas. Actualmente existen técnicas alternativas que permiten distinguir las bacterias activas de las inactivas o muertas, como se indica al final de la técnica.

MATERIAL Y PREPARACIÓN

- Viales de vidrio de 15-30 mL limpios con ácido, mejor si son autoclavados, especialmente para las muestras de agua (o viales estériles de poliuretano tipo Falcon de 15 mL).
- Material específico para muestreo en función de las muestras a recoger (cuadro 11.1).
- Equipo de filtración previamente autoclavado.
- Agua destilada Milli-Q autoclavada (100-200 mL).
- Micropipetas automáticas y puntas de pipeta autoclavadas.
- Filtros Whatman GF/C de 1,4 μm de diámetro de poro.
- Filtros de nailon, de 0,2 μm de diámetro de poro.
- Filtros negros de policarbonato, de 0,2 μm de diámetro de poro.
- Aceite de inmersión de baja fluorescencia (por ejemplo, de Panreac o Leica).
- DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). Se pueden guardar soluciones madre de DAPI de 0,1 mg/mL en el congelador (mejor guardar pequeños volúmenes, 5-20 mL, para evitar que se degrade cada vez que lo descongelamos para ser utilizado). La luz y el calor hacen perder fluorescencia al DAPI.
- Portaobjetos y cubreobjetos para montar las preparaciones.
- Pinzas.
- Formol al 40%.
- Microscopio de epifluorescencia equipado con filtro UV, excitación 340-380 nm.

PROCEDIMIENTO

Toma de muestras

1. Muestrear según se indica en el cuadro 11.1. Las muestras bentónicas se guardan en agua del río filtrada por filtros de nailon de 0,2 μm para evitar contaminar la muestra con bacterias planctónicas, con un volumen suficiente para que queden cubiertas. Para las muestras planctónicas será suficiente un volumen de 20 mL.

2. Fijar las muestras bentónicas o planctónicas con formol al 2% y guardar en viales herméticos estériles. Las muestras se guardan en la oscuridad hasta su preparación y conteo.

Extracción de la muestra

Para todas las muestras bentónicas será necesario obtener una suspensión previamente a la tinción y, por ello, tendremos que extraer la comunidad microbiana adherida al sustrato. En función del tipo de muestra (grosor del biofilm, material muy/poco adherido al sustrato) se pueden utilizar distintos métodos de separación:

Los microorganismos se separan del sustrato mediante sonicación, raspado o adición de pirofosfato

- a) *Sonicación*. Las muestras se sonicán en un baño de ultrasonidos (40 W de potencia y frecuencia de ultrasonidos de 40 kHz). Sonicar dos veces sucesivas, dos minutos cada vez. Un tiempo más largo de sonicación podría producir la ruptura de las células bacterianas. Durante la sonicación hay que mantener las muestras refrigeradas en hielo. En caso de arenas y limos puede ser necesario dejar sedimentar la muestra unos minutos para disminuir el contenido de partículas que puedan interferir en la observación y conteo (fluorescencia amarilla). En este caso, el tiempo de sedimentación debe ser siempre igual para todas las muestras del estudio, que permita optimizar al máximo la visión en el conteo pero sin perder bacterias.
- b) *Raspado de la muestra* con un «raspador celular» (*cell scraper*) estéril para obtener una suspensión del biofilm. El raspado se puede combinar con la sonicación para la correcta extracción de la muestra del sustrato.
- c) *Adición de pirofosfato sódico* hasta una concentración final de 0,05 mmol/L y dejarla reposar durante 30 minutos. El pirofosfato sódico disgrega la muestra y evita la formación de agregados, facilitando el posterior conteo.

Estos tres métodos se pueden combinar. Es importante utilizar para un estudio siempre el mismo método de extracción de la muestra del sustrato. La eficiencia de extracción se debe comprobar mediante técnicas microscópicas (por ejemplo, microscopía óptica y microscopía electrónica de rastreo).

Alternativamente, y para muestras de comunidades muy delgadas sobre sustratos artificiales, se puede teñir directamente el sustrato. Este procedimiento permite, además, identificar la posición de las bacterias en la comunidad bentónica y su distribución en la superficie.

Tinción y preparación de la muestra para su observación al microscopio

1. *Dilución*. Es posible que sea necesario diluir la mayoría de las muestras previamente a la tinción con DAPI. La dilución debe hacerse con agua Milli-Q (o agua del río filtrada por 0,2 μm de poro) autoclavada. Habitualmente las

muestras de arena y sedimento se diluyen entre diez y cien veces, las muestras sobre piedras, hojarasca o macrófitos se diluyen de cinco a diez veces. Hay que determinar la dilución adecuada y decidir el factor de dilución para todas las muestras del estudio. Es recomendable tomar un volumen de la suspensión y diluir hasta un volumen final de 5 mL.

2. *Tinción.* Las submuestras diluidas se tiñen con $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DAPI (añadir $100 \mu\text{L}$ de la solución madre concentrada de DAPI al volumen de 5 mL) durante 10 minutos.
3. *Filtración.* La suspensión teñida se filtra con filtros negros de $0,2 \mu\text{m}$ de poro y a baja presión de vacío (unos 180 mmHg). Para proteger el filtro negro, que es muy delgado y se rompe con facilidad, se puede colocar debajo del mismo un filtro Whatman GF/C o de policarbonato.
4. *Preparación de la muestra.* El filtro negro con la muestra ya teñida se coloca sobre un portaobjetos al que previamente se ha añadido una gota de aceite de inmersión. Posteriormente se añade otra gota de aceite de inmersión encima del filtro y se coloca el cubreobjetos procurando que el filtro negro quede plano para su correcta observación. Las preparaciones se pueden guardar congeladas durante dos o tres meses sin pérdida significativa de fluorescencia, aunque es preferible contarlas de inmediato.

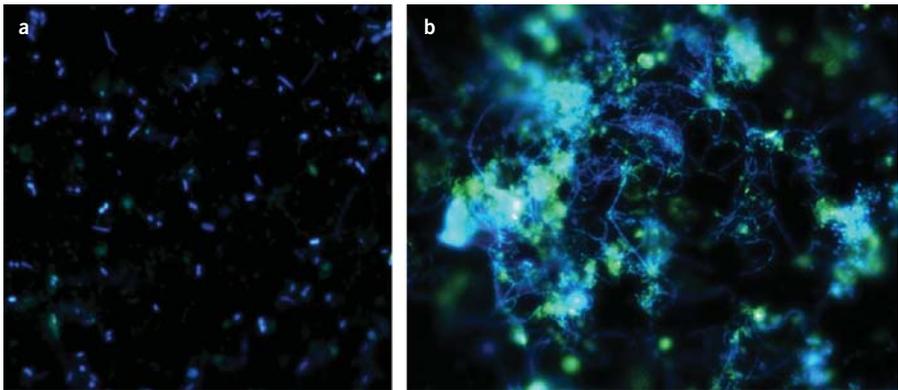
El conteo bacteriano requiere la tinción con DAPI y observación al microscopio de fluorescencia

Conteo

1. *La tinción de DAPI* permite diferenciar las bacterias en color azul claro sobre el fondo negro del filtro mediante el microscopio de fluorescencia (filtro UV-2A, Ex. 330-380 nm; véase fig. 11.1). Las muestras se cuentan a 1000 o 1250 aumentos, con objetivo de inmersión. Habitualmente se cuentan unos 20-40 campos para cada filtro, hasta un total de 400-1500 organismos. Es práctico disponer de cuadrícula en el ocular para facilitar el conteo. Si se tiene un sistema

Figura 11.1:

Bacterias teñidas con DAPI. Se pueden observar formas muy distintas: cocos, bacilos y filamentos



Nota: a) Muestra suficientemente diluida y disgregada para ser contada. b) Muestra con agregados, filamentos y material detrítico (amarillo-verdoso), que dificulta su conteo.

de análisis de imágenes se pueden fotografiar las muestras y realizar el conteo automáticamente. Para ello las muestras deberán ser muy claras, lo que resulta complicado con comunidades bentónicas.

2. *El cálculo de la densidad bacteriana se realiza aplicando los factores de dilución, volumen total de la muestra, volumen de la submuestra, superficie o volumen correspondiente de muestra recogida al campo, superficie total de filtro ocupada por la muestra (a partir del diámetro de la columna de filtración), superficie de filtro contada, y aumentos en el microscopio.*

La macro 11.1 permite calcular la densidad y biomasa bacterianas

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de bacterias}}{\text{cm}^2} = \frac{n(A/at)d(Vm/Vf)}{S} \quad (11.1)$$

donde n : número total de bacterias contadas por filtro, A : área de filtración (un poco menor que la total de filtro y calculada a partir del diámetro de la columna de filtración), at : área de filtro contada (equivalente al número de campos contados por la superficie contada de cada campo), d : factor de dilución, Vm : volumen total de muestra, Vf : volumen de la submuestra teñida y filtrada, y S : superficie de la muestra de campo.

CÁLCULO DE LA BIOMASA BACTERIANA

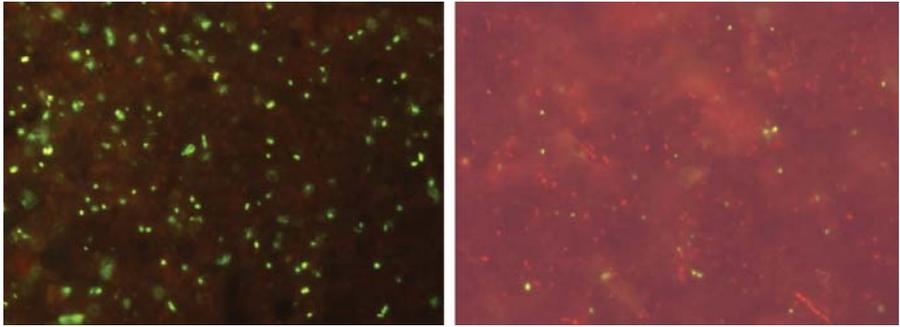
La biomasa bacteriana se calcula a partir de las densidades y del tamaño de las distintas formas observadas, que se aproximan a la correspondiente figura geométrica. En general se calculan biovolúmenes considerando los cocos como esferas, los filamentos como cilindros y los bacilos como cilindros con extremos semi-esféricos. El cálculo final de biomasa bacteriana se efectúa a partir del biovolumen y de la densidad de cada forma bacteriana observada utilizando la relación alométrica de Norland (Norland 1993) y un factor de conversión. Entre éstos, el más utilizado es el $2,2 \cdot 10^{-13} \text{ g C } \mu\text{m}^{-3}$ (Bratbak y Dundas 1984). El cálculo de la biomasa también se puede realizar de forma mucho más tosca, considerando un biovolumen medio de $0,1 \mu\text{m}^3$ por célula bacteriana. Este cálculo permite obtener un valor aproximado de $\mu\text{g C}$ bacteriano por cm^2 , interesante sobre todo cuando se está trabajando con distintos niveles tróficos.

BACTERIAS ACTIVAS/INACTIVAS

Entre un 20-70% de las bacterias pueden ser metabólicamente inactivas o estar lesionadas o muertas. Por ello, en muchas ocasiones puede ser revelador para el funcionamiento del ecosistema conocer la proporción de bacterias vivas y muertas (Freese et al. 2006). Las bacterias vivas se pueden medir mediante una doble tinción que consiste en una mezcla de 3,34 mM de SYTO® 9 (que tiñe todas las células) y 20 mM de yoduro de propidio (que penetra en las células que tienen

Figura 11.2:

Observación de bacterias epilíticas fluviales con la doble tinción de SYTO® 9 y yoduro de propidio. Izquierda, en verde claro, bacterias vivas. Derecha, con coloración roja, bacterias muertas



las membranas rotas). Cuando se excita la muestra teñida con luz azul, las células vivas, con membranas celulares intactas, aparecen verdes, y las muertas tienen coloración roja. La muestra (obtenida de la misma manera que para la tinción con DAPI) se tiñe con la mezcla 1:1 de SYTO® 9 y yoduro de propidio durante 15 minutos. Las muestras se filtran a través de filtros negros de policarbonato de 0,2 µm de poro como los utilizados para el DAPI y se preparan para la observación al microscopio de epifluorescencia.

Hay varios métodos para distinguir las bacterias vivas de las muertas

Las bacterias activas también se pueden detectar midiendo la actividad respiratoria (actividad del sistema de transporte de electrones, ETS, *electron transport system*). Ésta se determina mediante la reducción de CTC (cloruro de 5-ciano-2,3 ditilil tetrazolio) en su forma fluorescente (Rodríguez et al. 1992). Sin embargo, no todas las bacterias son capaces de reducir el CTC, que puede ser dañino para las bacterias. Las medidas a nivel celular (como la *microautorradiografía*, MAR; o la *hibridación in situ*, FISH), aunque mucho más caras, son métodos potentes y sensibles que pueden combinarse con los métodos clásicos de conteo mediante fluorescencia para una mejor detección de la biomasa bacteriana activa (Smith y Del Giorgio 2003).

Técnica 23. Biomasa de hongos

La determinación de biomasa fúngica puede hacerse midiendo el contenido en ergosterol

El *ergosterol* es una molécula que se encuentra en la membrana celular de los hongos, cuya función es estructurar e impermeabilizar los lípidos de membrana, como hace el colesterol en células animales. Existe una buena correlación entre la concentración de ergosterol y la biomasa de hongos (Stahl y Parkin 1996). La determinación de la biomasa fúngica mediante el análisis de ergosterol, descrita por Gessner y Schmitt (1996), se basa en una extracción de los lípidos y una separación del ergosterol mediante cromatografía líquida; el ergosterol se mide por absorbancia. La extracción de lípidos se puede realizar mediante extracción en

fase sólida (como se describe en este protocolo) o alternativamente mediante separación con ciclohexano (Davis y Lamar 1992).

MATERIAL

Material para el muestreo en el campo

- Sacabocados metálico (diámetro 1-2 cm).
- Papel de filtro.
- Viales de polietileno (20-100 mL).

Material y equipamiento de laboratorio

- Liofilizador.
- Tubos de ensayo de cristal resistentes a la presión (40 mL).
- Baño termostático (hasta 100 °C) con agitador para tubos.
- Baño de ultrasonidos (sonicador).
- Sistema de vacío para extracción en fase sólida.
- Bomba de vacío.
- Cartuchos para la extracción en fase sólida (por ejemplo de Waters Sep-Pack® Vac RC, 500 mg, tC18).
- Aparato de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Éste debe constar de bomba, inyector, detector de UV programado para lectura a 282 nm y ordenador para almacenamiento de datos.
- Columna para HPLC (RP 18, 250 × 4,6 mm). La utilización de precolumna es opcional, si bien alarga la vida de la columna.
- Viales para HPLC.
- Material de cristal (matraces, vasos de precipitados).
- Pipetas.

Productos químicos

- Metanol (CH₃OH, calidad analítica o para HPLC).
- Isopropanol (C₃H₈O, calidad analítica o para HPLC).
- Hidróxido de potasio (KOH, en lentejas, calidad analítica).
- Ácido clorhídrico (HCl, calidad analítica).
- Estándar de ergosterol (C₂₈H₄₄O, pureza > 98%).

PROCEDIMIENTO

Toma de muestras

El análisis de ergosterol puede efectuarse sobre cualquier tipo de sustrato fluvial, si bien los hongos predominan en la hojarasca y éste es el sustrato habitual en la mayoría de estudios. El análisis de ergosterol en sustratos inorgánicos (arenas, piedra) es menos frecuente, aunque posible.

La hojarasca contiene la mayor parte de la biomasa de hongos

Figura 11.3:
Círculos de hoja y
sacabocados usado para
obtener los discos



1. Muestreo según cuadro 11.1. Las muestras de hoja y madera sumergidas deben ser lavadas con agua abundante para eliminar restos de material detrítico fino e invertebrados adheridos en la superficie.
2. Con el sacabocados, cortar círculos (aproximadamente 10 por muestra) y colocarlos encima del papel de filtro (fig. 11.3). Éste reduce ligeramente la cantidad de agua en la muestra.
3. Las muestras (círculos) se colocan en viales de plástico y son transportadas en frío (4 °C) hasta el laboratorio, donde se procede a su congelación (-80 °C). Las muestras deben protegerse de la luz, ya que el ergosterol puede sufrir degradación fotoquímica.

Extracción de lípidos y saponificación¹

1. Liofilizar las muestras y determinar el peso seco (PS).
2. Transferir las muestras a los tubos de ensayo y añadir 10 mL de KOH 0,14 M en metanol.
3. Tapar los tubos herméticamente e introducirlos en el baño caliente (80 °C) y en agitación durante 30 minutos.
4. Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente y sin luz. Transferir el extracto a un recipiente y lavar el sustrato con metanol (2 lavados de 10 mL cada uno = 30 mL extracto total) y sonicado (2 minutos en baño de ultrasonidos durante cada lavado) para una mayor recuperación.

Los lípidos se extraen
por saponificación

¹ En el caso de arenas y limos, los extractos de lípidos suelen ser más turbios y por esa razón deben ser filtrados (0,7 µm, filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F) antes de su paso por los cartuchos en fase sólida (Sep-Pack®).

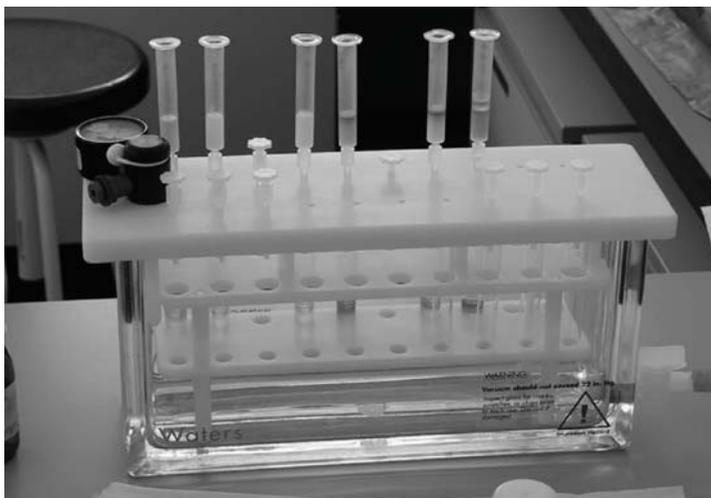


Figura 11.4:
Sistema de vacío para
extracción en fase sólida

Acondicionamiento de los cartuchos para extracción en fase sólida

1. Conectar los cartuchos y sus correspondientes válvulas al sistema de vacío; antes de iniciarlo las válvulas deben estar cerradas.
2. Añadir 7,5 mL de metanol en cada cartucho.
3. Accionar la bomba para generar vacío y abrir las válvulas. Mediante la regulación de las válvulas, se debe generar un flujo suave y constante del disolvente a través de la columna (fig. 11.4).
4. Añadir 7,5 mL de disolvente acondicionador acidificado (6 volúmenes de KOH 0,12 M en metanol + 1 volumen de HCl 0,75 M). Asegurar que el pH de la solución es < 3 .
5. Cerrar las válvulas y la bomba cuando quede 1 mL de disolvente acondicionador por encima del material empaquetado dentro de la columna. Es muy importante no dejar secar la columna durante este proceso; de no ser así, se debe reiniciar el acondicionamiento desde el punto 2 de este apartado.

Elución del extracto de lípidos a través de los cartuchos de extracción en fase sólida²

1. Añadir 5 mL de HCl 0,75 M al extracto de lípidos. Sólo si el pH de la muestra es < 3 , el ergosterol podrá ser retenido y concentrado en la columna. Es importante calcular el volumen final del extracto.
2. Transferir el extracto de lípidos al cartucho y accionar la bomba. Abrir las vál-

² La capacidad de retención del ergosterol a través de las columnas en fase sólida se puede evaluar añadiendo una concentración conocida de ergosterol diluido en metanol (por ejemplo, estándar de $100 \mu\text{g}$ ergosterol mL^{-1}) en una columna adicional. Este extracto deberá ser procesado igual que el resto de muestras.

vulas de los cartuchos y regular la presión en el sistema de vacío hasta obtener un flujo aproximado de 1 mL min^{-1} .

- Una vez ha pasado todo el extracto a través de la columna, añadir 2,5 mL de KOH 0,4 M en metanol:H₂O (6:4, vol:vol) para proceder a su limpieza.
- Dejar secar la columna durante 60 minutos. Este proceso se puede agilizar generando un vacío máximo, abriendo las válvulas y conectando la bomba.

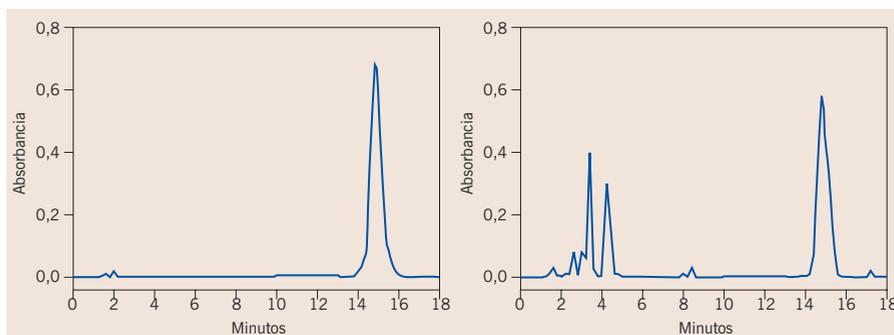
Elución del ergosterol

- Colocar viales para HPLC (prepesados) en la salida de cada una de las válvulas dentro del sistema de vacío.
- Accionar la bomba y aplicar el vacío en el sistema.
- Añadir 1,6 mL de isopropanol a los cartuchos y eluir a un flujo aproximado de 1 mL min^{-1} .
- Eliminar el vacío en el sistema de manera progresiva (no bruscamente) y retirar los viales. Pesar los viales y cerrar con su tapón correspondiente. El volumen de muestra en el vial se calcula considerando δ isopropanol = $0,79 \text{ g cm}^{-3}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Análisis con el HPLC

- Las cromatografías deben seguir la siguiente configuración:
 - Fase móvil: 100% metanol.
 - Flujo de la fase móvil: $1,4 \text{ mL min}^{-1}$
 - Temperatura de la columna: $33 \text{ }^\circ\text{C}$.
 - Longitud de onda de detección: 282 nm.
 - Volumen de inyección de muestra: $10 \text{ } \mu\text{L}$.
- El análisis de las muestras debe ir acompañado de una curva patrón (concentraciones de 0 a $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) de ergosterol en isopropanol. Es aconsejable analizar los patrones en primer lugar y a continuación las muestras. Para una mayor exactitud en los resultados, cada muestra puede ser inyectada y analizada dos veces (configurar en cromatograma).

Figura 11.5:
Cromatogramas de un patrón de ergosterol (arriba) y de un extracto de lípidos de hojas de *Platanus acerifolia* recogidas en un río (abajo)



La instalación de una precolumna en el sistema de HPLC puede retrasar el tiempo de retención del pico de ergosterol, como se observa en estos cromatogramas (aproximadamente 14 minutos).

Sustrato	Ergosterol (μg ergosterol/g PS)	Referencia
Hojas		
<i>Fraxinus excelsior</i>	800-900	Gessner y Chauvet (1994)
<i>Alnus glutinosa</i>	575-600	Gessner y Chauvet (1994)
<i>Corylus avellana</i>	500-600	Gessner y Chauvet (1994)
<i>Quercus ilex</i>	300-400	Gessner y Chauvet (1994)
Madera		
<i>Fagus sylvatica</i>	50-60	Hendel y Marxsen (2000)
Grava	40*	Artigas et al. (2004)

Cuadro 11.2:

Contenido de ergosterol en diferentes sustratos fluviales (hojas, madera y grava)

* El valor de ergosterol en la grava se expresa en μg ergosterol/g PSLC.

- Una vez obtenidos los cromatogramas, determinar la posición del pico de ergosterol mediante la comparación entre patrones y muestras (fig. 11.5). El tiempo de retención del ergosterol se sitúa alrededor de los 8 minutos. Medir el área y la altura de los picos.

La medida de ergosterol requiere el uso de HPLC

Cálculo de la biomasa de hongos

- La concentración de ergosterol en cada muestra se calcula a partir del volumen final del extracto y el peso seco o peso seco sin cenizas de la muestra de hoja o madera (por ejemplo, μg ergosterol/g PS). El peso seco sin cenizas de la muestra puede ser determinado una vez finalizado el proceso de extracción o mediante partes alícuotas de la muestra inicial. La concentración de ergosterol también se puede expresar en función de la superficie (cm^2) de sustrato analizada. El cuadro 11.2 recoge algunos valores de ergosterol en distintos tipos de sustrato y ríos.
- La concentración de ergosterol se transforma a biomasa de hongos (en g de carbono) aplicando los siguientes factores de conversión. Se considera que 5,5 mg de ergosterol se encuentran en 1 g de biomasa fúngica (Gessner y Chauvet 1993) y que un 43% de la biomasa fúngica es en forma de carbono (Baldy y Gessner 1997).

Técnica 24. Comunidad microbiana: métodos moleculares de estudio de la diversidad

En las últimas dos décadas se han desarrollado técnicas moleculares basadas en el análisis de la diversidad genética de los microorganismos, normalmente del operón ribosomal, que han permitido la evaluación detallada de la composición de las comunidades microbianas acuáticas (incluyendo organismos procariontas y eucariontas, sean autótrofos o heterótrofos). Para ello se toman muestras

Numerosas técnicas de biología molecular permiten evaluar la diversidad de comunidades microbianas

Cuadro 11.3:
Métodos moleculares más habituales para el estudio de la diversidad microbiana acuática

Fundamento	Pasos	Observaciones	Nombre de la técnica
Con amplificación del DNA (PCR)	Amplificación Clonaje	Secuenciación Comparación de secuencias en bases de datos (p.ej. EMBL, GenBank, etc.)	Clonaje y secuenciación (<i>random sequencing in clone libraries</i>)
	<i>Fingerprinting</i> Sin digestión enzimática del DNA	Separación electroforética	DGGE (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
		Separación en función de la secuencia característica que determina la temperatura de desnaturalización	TGGE (<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>)
		Se amplifica la región espaciadora entre los genes que codifican para la subunidad pequeña y grande del rRNA. Separación determinada por la longitud de los fragmentos amplificados	RISA/ARISA (<i>Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i>)
		Sin desnaturalización, movilidad determinada por estructura tridimensional. Separación en función de la secuencia característica	SSCP (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)
	<i>Fingerprinting</i> Con digestión enzimática del DNA	Digestión con enzimas de restricción	RFLP y (t)-RFLP (<i>terminal- Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
Sin amplificación del DNA	Fijación Hibridación con sondas fluorescentes de oligonucleótidos	Recuento microscópico o por citometría	FISH (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
	Extracción del DNA Desnaturalización	Cinética de reasociación del DNA Se utiliza para comparar comunidades o la diversidad intracomunitaria a partir de extractos de DNA	Reasociación del DNA

Fuente: Adaptado de Dorigo et al. 2005.

de las comunidades cuya diversidad se desea estudiar, y se realiza una extracción y purificación del DNA, para proceder a la amplificación, utilizando la técnica de *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR), de fragmentos seleccionados del operón ribosomal mediante el uso de cebadores específicos (*primers*) de las secuencias de este operón para los microorganismos cuya diversidad se pretende determinar. La elección de cebadores específicos puede ir dirigida a la detección de microorganismos de diversos niveles taxonómicos (desde cepas de una especie hasta reinos). Los fragmentos de DNA amplificados corresponden a los diferentes microorganismos presentes en la muestra cuyo DNA coincida con la secuencia de los cebadores utilizados para la secuencia génica diana. En una segunda etapa, se trata de determinar las variaciones en las secuencias del DNA amplificado, para con ello desvelar la diversidad microbiana. Este segundo paso puede realizarse de maneras diversas, bien mediante clonaje y secuenciación, que proporciona una caracterización completa de los fragmentos, o bien mediante una separación electroforética (con o sin digestión enzimática previa). Esta última proporciona una separación visual de la mezcla de DNA (*fingerprinting*) en función del polimorfismo en la secuencia (DGGE, TGGE, SSCP; véase cuadro 11.3) o de la longitud de los fragmentos (t-RFLP, AFLP, ARISA; véase cuadro 11.3). Dicha separación puede también ir seguida de una escisión y secuenciación de las bandas. A partir de las secuencias se pueden construir árboles filogenéticos que muestran la similitud de las secuencias dominantes en la comunidad microbiana, y con ello proporcionan una visión de su diversidad. En el cuadro 11.3 se señalan las principales características distintivas de cada una de estas técnicas. La más comúnmente utilizada es la *electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante* (DGGE), que se describe a continuación. Asimismo se incluye un breve resumen del protocolo de clonación, que está entre las técnicas más utilizadas y que ofrece una resolución taxonómica mayor (Zwart et al. 2002, Kowalchuk et al. 2004, Ausubel et al. 2008). Además de las técnicas basadas en la amplificación del DNA, existen otras técnicas moleculares independientes de dicha amplificación, tales como la hibridación in situ con marcadores fluorescentes (FISH) o los métodos de reasociación del DNA, que no se incluyen aquí.

Los protocolos detallados de estas técnicas moleculares aquí descritas pueden presentar numerosas variantes que deben ser adaptadas para cada estudio concreto.

MATERIAL

El material necesario para realizar cada uno de los pasos del proceso se señala en el cuadro 11.4. La preparación de las soluciones *stock* se describe en el apéndice A.1 (pág. 413).

Cuadro 11.4:
Material necesario para
cada uno de los pasos

	A	B	C	D	E	F	G	H
Botella de vidrio pyrex estéril	✓							
Nevera portátil	✓	✓						
Acumuladores de frío	✓	✓						
Nevera (4 °C)	✓	✓	✓	✓				
Tubos Eppendorf de 2 mL	✓	✓	✓	✓				
Equipo de filtración	✓							
Bomba de vacío	✓							
Pinzas	✓							
Filtro de nital de 30 µm de poro	✓							
Filtro de policarbonato de 10 µm de poro	✓							
Filtro de policarbonato de 3 µm de poro	✓							
Filtro de policarbonato de 0,2 µm de poro	✓							
Etanol 96% para lavado de material	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Autoclave	✓	✓						
Recipientes estériles	✓	✓						
Congelador (-80 °C)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cepillo		✓						
Ultracentrífuga para tubos Eppendorf			✓	✓				
Pipetas automáticas de 5, 40, 200 y 1000 µL			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Puntas estériles para pipetas			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tijeras estériles			✓					
Sonicador			✓					
Hielo picado			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Bolas (<i>beads</i>) de circonio/sílice de 0,5 mm de diámetro			✓	✓				
Soluciones <i>stock</i> de extracción y purificación*			✓	✓				
Isopropanol			✓	✓				✓
Etanol 70%			✓	✓				
Vortex o <i>beadbeater</i> (rompedor de células mediante agitación con bolas de vidrio)			✓	✓				
Baño termostatzado			✓	✓				
Estufa termostatzada de aire forzado			✓	✓				
Desecador			✓	✓				
Balanza de precisión				✓				
Tubos Falcon de 15 mL				✓				
Microespátula				✓	✓			
Espectrofotómetro					✓			
Tampón TE (Tris-EDTA)*					✓	✓	✓	
Microcubeta de cuarzo					✓			
Solución estándar de DNA					✓			
Agua Milli-Q						✓	✓	✓
Tubos de PCR						✓		
Tampón 10X						✓		
Solución de MgCl ₂						✓		
Solución <i>stock</i> de oligonucleótidos (10 mM)						✓		

	A	B	C	D	E	F	G	H
Cebadores (directo y reverso)						✓		
BSA 0,1%						✓		
Solución 5X de <i>enhancer</i> (solución de intensificación)						✓		
Polimerasa termoestable (p. ej. Taq polimerasa)						✓		
Termociclador						✓		
Horno microondas							✓	
Cubeta horizontal para electroforesis							✓	
Molde de metacrilato							✓	
Peine para preparar los pocillos							✓	✓
Transiluminador y protector visual contra UV							✓	✓
Agarosa (grado para electroforesis)							✓	
Solución <i>stock</i> 50X de tampón TAE (Tris/acetato/EDTA)*							✓	✓
Tampón de carga con y sin azul de bromocresol*							✓	✓
Marcador de tamaño de fragmentos de DNA							✓	✓
Solución de bromuro de etidio							✓	✓
Fuente de electroforesis							✓	✓
Pipetas automáticas y puntas de pipeta tipo Gelsaver típs, de 1-200 µL							✓	✓
Placas de vidrio para preparación del gel								✓
Espaciadores								✓
Grasa de silicona								✓
Marco de electroforesis								✓
Pinzas para el marco								✓
Generador de gradientes								✓
Bomba								✓
Sistema de electroforesis vertical								✓
Sistema de circulación de líquidos termostatizado								✓
Cámara fotográfica								✓
Pipeta Pasteur								✓
Papel Whatman para cromatografía								✓
Film transparente								✓
Detergente suave (tipo Decon 90 o similar)							✓	✓
Solución 40% de acrilamida:bisacrilamida*								✓
Solución de APS*								✓
Formamida								✓
TEMED								✓
Urea								✓
Glicerol								✓
Butanol								✓

Cuadro 11.4:

Material necesario para cada uno de los pasos (cont.)

A: Muestreo y procesado de muestra planctónica. B: Muestreo y procesado de muestra bentónica. C: Extracción y purificación del DNA de microorganismos planctónicos o de microorganismos bentónicos recogidos por raspado. D: Extracción y purificación del DNA de microorganismos embebidos en sedimentos. E: Cuantificación del DNA. F: Amplificación del DNA (PCR). G: Electroforesis en gel de agarosa. H: DGGE.

* Véase el apéndice A.1, en página 413.

Técnica 24a. Toma, procesado y conservación de muestras

MICROORGANISMOS PLANCTÓNICOS

Las muestras planctónicas se trasladan rápidamente al laboratorio para su filtrado o se filtran in situ. La recolección de los organismos para extraer su DNA puede realizarse o bien concentrando todos los organismos en una única filtración a través de un filtro de 0,2 μm de poro, o bien mediante filtración fraccionada. En la filtración fraccionada se busca retirar los microorganismos de mayor tamaño y concentrar los de las fracciones de menor tamaño, aunque los organismos que viven adheridos a partículas (inertes o no) quedan retenidos por el filtro que retiene las partículas a las que están adheridos. Se procede del modo siguiente:

1. Recogida de la muestra. Se toma una muestra de agua (1-2 L) en una zona central del cauce ligeramente por debajo de la superficie, o en otras partes del cauce si así se precisa.
2. Poner la muestra en un recipiente estéril (por ejemplo, una botella de vidrio Pyrex previamente esterilizada).
3. Trasladar la muestra al laboratorio (a 4 °C y en la oscuridad). Filtrar lo antes posible (siempre dentro de las primeras 24 horas). Para filtrar se utiliza un equipo de filtración previamente lavado con etanol y con agua destilada, y esterilizado. En el caso de la filtración secuenciada, se filtra la muestra primero a través de un filtro de nital de 30 μm de poro, y el filtrado se pasa consecutivamente a través de filtros de policarbonato de 10 μm , 3 μm , y 0,2 μm de poro. Todos los filtros se guardan en tubos Eppendorf de 2 mL (conservación a -80 °C).

Los microorganismos planctónicos se obtienen por filtración de la muestra

En el caso de no realizar fraccionamiento, la filtración completa de la muestra se realiza directamente a través del filtro de policarbonato de 0,2 μm de poro. La filtración no fraccionada tiene la ventaja de recoger todos los componentes de la comunidad, pero en ella se produce una rápida colmatación del filtro, que puede llevar a no detectar los componentes minoritarios de la comunidad. Se recomienda realizar varias filtraciones en diferentes filtros de policarbonato de 0,2 μm de poro y realizar la extracción del DNA de todos ellos.

MICROORGANISMOS BENTÓNICOS

Los microorganismos bentónicos se recogen de acuerdo con las indicaciones del cuadro 11.1. La muestra, sea de los sedimentos o del raspado de los materiales duros, se deposita en un tubo Eppendorf de 2 mL y se centrifuga, se retira el sobrenadante y se congela el *pellet*, o material sedimentado (preferiblemente a -80 °C) hasta el momento de la extracción del DNA.

Los microorganismos bentónicos se obtienen por centrifugado

Técnica 24b. Extracción, purificación y cuantificación del DNA

Los pasos principales a realizar consisten en la homogenización de la muestra, la disrupción celular para liberar el DNA y la eliminación de los componentes del extracto que no sean ácidos nucleicos (proteínas, polisacáridos, etc.). Alternativamente a la preparación de los reactivos a partir de sus componentes se puede recurrir a kits de extracción y purificación de DNA preparados comercialmente.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA DE MICROORGANISMOS PLANCTÓNICOS O BENTÓNICOS SOBRE SUSTRATOS DUROS

Los pasos 1 a 12 constituyen el proceso de extracción del DNA y a partir del 13 los de purificación.

1. En el caso de muestras procedentes de raspado, se realiza la extracción a partir del pellet guardado en el tubo Eppendorf. En el caso de muestras recogidas en un filtro, éste se fragmenta en pequeñas piezas con unas tijeras estériles y se deposita en un tubo Eppendorf de 2 mL antes de proceder al siguiente paso.
2. Añadir 567 μL de la solución TE (tampón Tris-EDTA), 30 μL de la solución de dodecilsulfato de sodio, SDS, 10% (véase apéndice A.1 en pág. 413) y dos gotas de bolas de 0,5 mm al tubo Eppendorf.³
3. Colocar el tubo Eppendorf en hielo picado y sonicar durante 5 minutos.
4. Mezclar con un vortex (o un aparato tipo *beadbeater*) durante 10-60 minutos (dependiendo de la dificultad de ruptura de las estructuras celulares).
5. Añadir 3 μL de la solución *stock* de proteinasa K (*stock* de 20 mg/mL) y 10 μL de la solución de lisozima (*stock* de 10 mg/mL).
6. Mezclar enérgicamente por volteado (sin utilizar el vortex).
7. Incubar a 37 °C durante 60 minutos.
8. En muestras con mucho RNA puede ser necesario realizar un tratamiento con RNAasa para eliminar éste (el procedimiento se suele encontrar en los kits de extracción de DNA). Se añade la RNAasa (normalmente 3 μL de la solución comercial) y se incuba a 37 °C durante 60 minutos.
9. Añadir 100 μL de la solución de NaCl 5 M.
10. Mezclar enérgicamente por volteado (sin utilizar el vortex).
11. Incubar a 65 °C durante 2 minutos.
12. Añadir 80 μL de la solución *stock* de CTAB/NaCl. Esta solución debe estar precalentada a 65 °C y, dada su elevada densidad, debe pipetarse con una punta cortada en su extremo más fino.
13. Añadir 750 μL de la solución CI (cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado provocando la emulsión de los dos medios.

³ Por ejemplo, circonio/sílice *beads* fabricadas por Biospec Products Inc. (www.biospec.com).

14. Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos.
15. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Eppendorf.
16. Añadir 750 μL de la solución PCI (fenol:cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado provocando la emulsión de los dos medios.
17. Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos.
18. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Eppendorf.
19. Añadir 750 μL de la solución CI (cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado provocando la emulsión de los dos medios.
20. Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos.
21. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Eppendorf.
22. Añadir 600 μL de isopropanol para precipitar el DNA y mezclar por volteado.
23. Incubar en la oscuridad durante una noche a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente.
24. Centrifugar a 12 000 rpm durante 30 minutos. El *pellet* con el DNA debe ser visible.
25. Eliminar el sobrenadante.
26. Añadir 500 μL de etanol 70% para lavar los restos de cloroformo.
27. Mezclar enérgicamente por volteado (sin utilizar el vortex).
28. Centrifugar a 13 000 rpm durante 15 minutos.
29. Eliminar el sobrenadante.
30. Secar el *pellet* en un desecador al vacío de 1 a 3 horas.
31. Añadir 100 μL de la solución TE (tampón Tris-EDTA).
32. Resuspender incubando a 37 °C durante 5 minutos.
33. Cuantificar el extracto (véase procedimiento para cuantificar el DNA extraído, pág. 190).
34. Congelar el extracto a -80 °C hasta el momento de proceder a la amplificación del DNA.

La extracción de DNA
precisa un proceso largo
y cuidadoso

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA DE MICROORGANISMOS EMBEBIDOS EN SEDIMENTOS

1. Poner entre 50 y 300 mg de sedimentos (peso fresco) en un tubo Falcon de 15 mL (Falcon 1).
2. Añadir 2 mL del tampón de extracción TESC.
3. Congelar, y descongelar a 65 °C. Repetir este paso tres veces.
4. Añadir cuatro gotas de bolas de 0,5 mm (por ejemplo, circonio/sílice, *beads*).
5. Incubar a 70 °C durante 30 segundos, mezclar con un vórtex. Incubar de nuevo de 5 a 10 minutos (dependiendo de la dificultad de ruptura de las estructuras celulares) y agitar de nuevo el vórtex. Repetir este último paso tres veces.
6. Añadir 15 μL de la solución *stock* de proteinasa K (*stock* de 20 mg/mL), 200 μL de la solución de SDS 10%, y 50 μL de la solución de lisozima (*stock* de 10 mg/mL).

7. Incubar a 50 °C durante 40 minutos. Agitar por volteado cada 10 minutos.
8. En el caso de muestras con mucho RNA, puede ser necesario hacer un tratamiento con RNAasa para eliminar éste (habitualmente se puede encontrar el procedimiento en los kits de extracción de DNA). En ese caso se añade la RNAasa (normalmente 3 µL de la solución comercial) y se incuba a 37 °C durante 60 minutos.
9. Añadir 2 mL de la solución CI (cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado provocando la emulsión de los dos medios.
10. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
11. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Falcon (Falcon 2).
12. Al tubo Falcon con el sedimento (Falcon 1), añadir 2 mL del tampón de extracción TESC, homogenizar bien por volteado, centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos, recoger el sobrenadante y depositarlo en el tubo Falcon 2.
13. Al tubo Falcon 2, añadirle 4 mL de la solución PCI (fenol:cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado.
14. Incubar el tubo Falcon 2 a 65 °C durante 10 minutos.
15. Centrifugar a 4000 rpm durante 12 minutos.
16. Recoger el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Falcon (Falcon 3)
17. Al tubo Falcon 3, añadirle 2 mL de la solución CI (cloroformo:isoamilalcohol) y homogenizar bien por volteado.
18. Centrifugar a 4000 rpm durante 12 minutos.
19. Recoger el sobrenadante en un nuevo tubo Falcon (Falcon 4) y agitarlo.
20. Centrifugar a 4000 rpm durante 8 minutos.
21. Comprobar que no queda CI/PCI (se verían dos fases); si queda, repetir el paso hasta elimina el CI/PCI que queda en la parte inferior.
22. Añadir 2,5 mL de isopropanol (para precipitar el DNA) y mezclar por volteado.
23. Incubar en la oscuridad durante una noche a 4 °C.
24. Centrifugar a 4000 rpm durante 1 hora. El *pellet* con el DNA debe ser visible.
25. Eliminar el sobrenadante.
26. Añadir 500 µL de etanol 70% para lavar los restos de cloroformo, agitar por volteado e incubar a -20 °C durante 10 minutos.
27. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
28. Eliminar el sobrenadante.
29. Secar el *pellet* en un desecador al vacío durante 1 a 3 horas.
30. Añadir 250 µL de la solución TE (tampón Tris-EDTA).
31. Resuspender incubando a 37 °C durante 30 minutos.
32. Pasar a un tubo Eppendorf de 2 mL.
33. Cuantificar el extracto (véase apartado siguiente).
34. Congelar el extracto a -80 °C hasta el momento de proceder a la amplificación del DNA.

PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR LA CANTIDAD Y PUREZA DEL DNA EXTRAÍDO

Una vez extraído el DNA se verifica su pureza mediante el espectrofotómetro

Una vez completada la extracción del DNA, éste debe cuantificarse para comprobar que el proceso de extracción ha tenido éxito y para evaluar su pureza. Dicha cuantificación puede realizarse de manera espectrofotométrica para determinar si la extracción ha sido suficientemente efectiva y el extracto es lo bastante puro, o bien mediante una electroforesis en gel de agarosa (normalmente preparado al 0,8-1% p/v de agarosa; véase técnica 24d). En el procedimiento espectrofotométrico se determina la absorbancia del extracto de DNA (diluido 1/25) a diversas longitudes de onda para determinar su concentración y su pureza con respecto a otras sustancias que podrían estar incluidas en el extracto (polisacáridos, proteínas, RNA, ...). La medida de la absorbancia a 260 nm permite cuantificar la concentración de ácidos nucleicos, mientras que la relación entre esta absorbancia y la determinada a otras longitudes de onda (por ejemplo, 230 para fenol y polisacáridos, 280 para proteínas) permite determinar la pureza relativa del extracto. Se resume a continuación el protocolo para la determinación espectrofotométrica.

1. En la microcubeta, añadir 500 µL de tampón TE.
2. Añadir 20 µL del extracto de DNA.
3. Medir la absorbancia de la mezcla a 230, 260 y 280 nm frente a un blanco de tampón TE.
4. Calcular la concentración de DNA, según la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] \text{ (mg/mL)} = A_{260}/0,02 \quad (11.2)$$

5. Calcular la pureza mediante las siguientes razones (ratios) de absorbancia:

A_{230}/A_{260} : Debe estar comprendido entre 0,3 y 0,9; valores superiores indican la contaminación del extracto por polisacáridos o por restos del fenol resultantes de un mal lavado en el proceso de extracción.

A_{260}/A_{280} : Valores de esta relación situados entre 1,8 y 2,0 indican un alto grado de pureza de ácidos nucleicos; si se hallan entre 1,8 y 1,9 indican una alta pureza de DNA. Valores por encima de 2,0 indican contaminación por RNA, lo cual hace aconsejable la inclusión de la lisis de este RNA utilizando RNAasa en el proceso de extracción. Valores por debajo de 1,8 indican la contaminación del extracto con proteínas, lo que exigiría un mayor cuidado en la eliminación de éstas durante el proceso de extracción o una posterior purificación.

En caso de ser necesario, el extracto puede purificarse de manera adicional, por ejemplo, utilizando columnas de purificación (Sepharose G-200).

Técnica 24c. Amplificación del DNA (PCR)

AMPLIFICACIÓN DEL DNA

La técnica de la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) consiste en la multiplicación in vitro de secuencias específicas de DNA utilizando la actividad enzimática de la DNA-polimerasa. Generalmente la secuencia amplificada suele ser la del gen que codifica para el 16S rRNA (en los procariotas) y para el 18S rRNA (en los eucariotas). Cuando la amplificación de las secuencias de los genes codificantes para el RNA ribosómico no da suficiente resolución suele recurrirse al uso de las *secuencias de las regiones intergénicas* (ITS). El DNA extraído de las muestras, correspondiente a toda la comunidad, se amplifica de forma selectiva mediante cebadores selectivos que se eligen en función del grupo taxonómico cuyo DNA se pretenda amplificar. Son necesarios cebadores de iniciación en ambos lados de la cadena de DNA (cebador directo —*forward primer*— y reverso —*reverse primer*—), cuyas temperaturas de hibridación deben ser similares. Las condiciones a aplicar en el termociclador (fig. 11.6a), referentes a la desnaturalización, a la hibridación de los cebadores al extremo 3' de cada hebra y a la elongación de la hebra, tales como el número de ciclos, temperaturas y los tiempos de incubación y rampas de incremento de éstas, son específicas para cada cebador y secuencia a amplificar.

El DNA se amplifica mediante cebadores selectivos

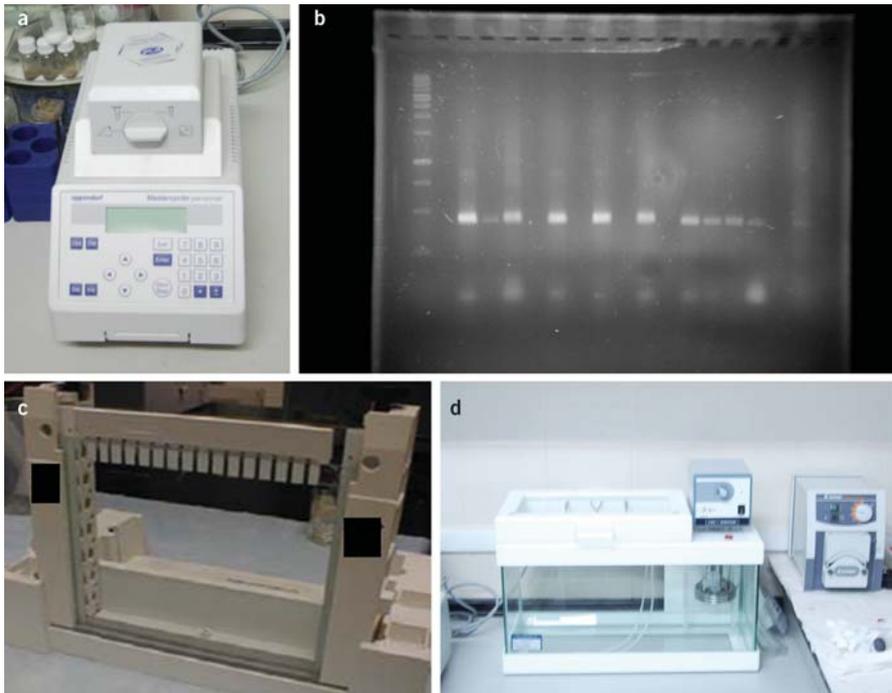


Figura 11.6:

a) Termociclador.
 b) Electroforesis en gel de agarosa 2% del producto de PCR utilizando cebadores específicos para cianobacterias 460 pb (CYA359F y CYA781r), teñido con bromuro de etidio (fotografía de Antonio Picazo, Universidad de Valencia). c) Marco de electroforesis ya montado. d) Tanque contenedor y sistema de circulación y electroforesis vertical (izquierda) y generador de gradientes (derecha)

Para la amplificación, partimos del extracto de DNA previamente cuantificado que se conserva congelado. Así, se prepara la mezcla de polimerización y después se le adiciona el DNA extraído para llevarlo al termociclador.

Normalmente, los reactivos se adquieren ya preparados, en cuyo caso las cantidades a añadir serán las que especifique el fabricante. Dada la facilidad de contaminación, es recomendable que el material utilizado sea de uso exclusivo y los reactivos específicos para el uso en biología molecular, en condiciones de trabajo extremadamente pulcras. El procedimiento es el siguiente:

1. Tomar un tubo de PCR (200 μ L).
2. Añadir 5,75 μ L de agua Milli-Q.
3. Añadir 2,5 μ L de tampón 10X.
4. Añadir 0,75 μ L de $MgCl_2$. Utilizar la concentración recomendada por el fabricante de la polimerasa. Se suelen usar soluciones *stock* en torno a 50 mM, de las que se añade la cantidad indicada a la mezcla (por muestra).
5. Añadir 1 μ L de la solución de oligonucleótidos (dNTP).
6. Añadir 1 μ L del cebador directo (*stock* 10 pmo/ μ L).
7. Añadir 1 μ L del cebador reverso (*stock* 10 pmo/ μ L).
8. Añadir 1 μ L de una solución 0,1% de *seroalbúmina bovina* (BSA).
9. Añadir 5 μ L de la solución 5X de *enhancer* (solución de intensificación) (precalentado a 65 °C). Estos productos actúan de manera diversa para incrementar el rendimiento y/o la especificidad de la polimerización, por ejemplo protegiendo la actividad enzimática o disminuyendo la ligación inespecífica de los cebadores.
10. Añadir 1 μ L de Taq polimerasa.
11. Una vez preparada la mezcla de polimerización con todo lo anterior, se añaden aproximadamente 10 ng de DNA del extracto (según la abundancia del DNA que se desea amplificar en el extracto puede ser necesario añadir mayores cantidades, oscilando normalmente entre 10-100 ng). Para ello el extracto de DNA se diluye en tampón TE, de manera que haya unos 10 ng en 6 μ L. Para el buen funcionamiento de la reacción de polimerización el extracto debe estar bien limpio de compuestos tales como fenol, agentes quelantes como el EDTA, detergentes u otras sustancias usadas en el proceso de extracción, ya que éstas dificultan la acción de la polimerasa.
12. Llevar al termociclador y someter al proceso de polimerización (opciones de amplificación en función de los cebadores).
13. Comprobar que se ha obtenido amplificación y que el tamaño del DNA amplificado es correcto mediante una electroforesis en gel de agarosa (0,8-2%) con tampón TAE 1X, utilizando un marcador de tamaño, tinción del gel con bromuro de etidio u otros tintes (por ejemplo, SYBR) y observación (proteger la vista) con luz ultravioleta (fig. 11.6b).

14. Una vez obtenido el DNA amplificado y comprobado que el proceso ha funcionado correctamente, el extracto se congela a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Si se va a utilizar para clonación no se puede congelar y debe utilizarse inmediatamente.
15. El producto de la amplificación puede ser utilizado tanto para la clonación como para la separación electroforética que proporciona el *fingerprinting* de la comunidad, o incluso para la secuenciación directa (Ausubel et al. 2008).

El DNA amplificado puede congelarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a no ser que vaya a utilizarse para clonación

PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Como se ha indicado en el punto 13 del protocolo anterior, la bondad del proceso de amplificación por lo que se refiere a la cantidad y calidad del producto obtenido se evalúa mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se usa del modo siguiente:

1. Pesar la cantidad apropiada de agarosa, entre 0,8 y 2 g según la concentración de agarosa en el gel. Se suele utilizar una concentración 0,8% para los productos de extracción de DNA y entre 1,5 y 2% para los productos de PCR. Generalmente, la concentración debe ser más baja cuanto mayores sean los fragmentos de DNA a separar.
2. Añadir la agarosa en un matraz Erlenmeyer de 0,5 L.
3. Añadir 100 mL de tampón Tris/acetato/EDTA (TAE) 1X.
4. Hervir durante 2 minutos, evitando que se vierta.
5. Dejar enfriar hasta una temperatura de $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin que solidifique.
6. Preparar el molde de metacrilato, incluyendo el peine con el número de pocillos necesario para las muestras y el marcador, sin que éste toque el fondo.
7. Verter cuidadosamente la agarosa evitando la formación de burbujas, o eliminado éstas si se forman (por ejemplo, pinchándolas con una aguja estéril).
8. Dejar solidificar el gel durante media hora.
9. Retirar el peine.
10. Colocar el molde con el gel en la cubeta de electroforesis, con los pocillos más próximos al polo negativo.
11. Añadir a la cubeta de electroforesis tampón TAE 1X hasta cubrir el gel de manera sobrada.
12. Preparar cada muestra en un tubo Eppendorf pequeño añadiendo 10 μL del producto amplificado y 4 μL del tampón de carga con azul de bromocresol.
13. Cargar los pocillos de los extremos con el marcador molecular de tamaño.
14. Cargar el resto de los pocillos con las muestras que corresponda.
15. Conectar la fuente eléctrica (120 V) y dejar el tiempo suficiente para que corra la muestra (entre 0,5 y 1,5 horas, según el tamaño del gel).

16. Una vez finalizada la electroforesis, teñir el gel sumergiéndolo durante unos 15 minutos en una solución de bromuro de etidio preparada añadiendo unas 10-20 gotas de éste (hasta que el agua adquiera un ligero color) a 1 L de agua Milli-Q. Toda la manipulación del bromuro de etidio y del gel a partir de este instante se debe realizar con guantes y otras medidas protectoras, utilizando material específico y recogiendo el material desechado en un recipiente adecuado. Los residuos son tóxicos, ya que el bromuro de etidio es mutágeno y potencialmente cancerígeno.
17. Lavar el gel con agua del grifo.
18. Visualizar el gel con luz ultravioleta y fotografiar si se desea.

Técnica 24d. Separación del DNA por DGGE (*fingerprinting* de la comunidad)

La DGGE proporciona un patrón de bandas de DNA característico de la comunidad microbiana

Las técnicas electroforéticas se basan en la separación de moléculas cargadas al someterlas a un campo eléctrico a través de un gel. La *electroforesis en gel con gradiente químico desnaturizante* (DGGE), generalmente usando urea y formamida para desnaturizar, al igual que su equivalente de desnaturización con gradiente de temperatura (TGGE), se utilizan de manera rutinaria para estudios cualitativos y semicuantitativos de la diversidad de comunidades microbianas. Los productos de amplificación son separados electroforéticamente en un gel de poli-acrilamida en función de las diferencias en sus secuencias, que determinan patrones diferentes de desnaturización y con ello de migración. En la DGGE la separación del DNA es función de las características de desnaturización de la doble hélice de DNA. La carrera electroforética se realiza en una cubeta vertical en la que se coloca un gel de poli-acrilamida entre un gradiente desnaturizante. En ella se obtiene un patrón de bandas característico de la comunidad. El patrón obtenido en la DGGE ofrece una visión de la diversidad de la comunidad (*finger-printing*). Además se puede obtener información taxonómica con la escisión de las bandas, su reamplificación, y la secuenciación de los productos de esa nueva amplificación, o bien mediante análisis de hibridación con oligonucleótidos marcados específicos para determinados taxones. En la DGGE se deben considerar las condiciones de la carrera electroforética y la dificultad de comparación de los patrones cuando aparecen muchas bandas, lo que puede hacer necesaria la realización de diversos geles y combinaciones de muestras. Cuando el número de bandas es grande, diferentes fragmentos de DNA podrían migrar juntos, limitando de esta manera la sensibilidad de la técnica.⁴

⁴ Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en la DGGE se sugiere Fromin et al. (2002), y para dudas sobre la técnica se puede consultar <http://ddgehelp.blogspot.com/>

PREPARACIÓN DEL GEL

La acrilamida y la formamida son tóxicas, por lo que todo el procedimiento se debe realizar con guantes y, cuando se manipulen estas sustancias, en campana de gases, evitando la contaminación y recolectando todos los residuos contaminados en recipientes especiales.

1. Limpiar cuidadosamente todo el material (cristales, espaciadores, peines, etc.) con detergente (tipo Decon 90 o similar, no usar materiales abrasivos), posteriormente con isopropanol, etanol al 96% y finalmente agua Milli-Q. Es especialmente importante eliminar los restos de silicona de electroforesis anteriores.
2. Colocar los espaciadores alineados a lo largo de los bordes del cristal más largo, situar el cristal pequeño en la parte externa y sujetarlos con pinzas. Sellar los bordes y, especialmente la parte baja, con cinta y silicona (usar el mínimo necesario). Poner las placas de cristal en el marco.
3. Comprobar el buen funcionamiento del generador de gradientes con un flujo de agua Milli-Q. Una vez comprobado que el bombeo funciona correctamente, vaciar el tubo por bombeo y colocar la punta del tubo de salida (con una punta de pipeta en el extremo) en el centro de la parte superior de la cámara que contendrá el gel (el espacio entre cristales).
4. Preparar igual volumen (15-30 mL de cada, dependiendo del tamaño del gel) de las dos soluciones de acrilamida, la de mayor y la de menor concentración desnaturizante. Por ejemplo, para preparar un gradiente desnaturizante 30-70%, se prepara una solución al 30% (menor porcentaje desnaturizante) y una al 70% (mayor porcentaje desnaturizante), de acuerdo con lo reseñado en el cuadro 11.5.

También puede prepararse una solución 100% desnaturizante con concentración 40% de formamida y 7 M de urea (a partir de 84 g de urea disueltos en el mínimo posible de agua Milli-Q, 80 mL de formamida 100%, 2 mL de solu-

Reactivo	[Final]	Porcentaje											
		0	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Milli-Q	–	3,6	9,5	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5
Acrilamida: bisacrilamida (37:1) 40%	Aprox. 8%	1,3	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Tampón TAE 50X	1X	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Urea	Variable	0,0	1,3	1,6	1,9	2,2	2,5	2,8	3,1	3,4	3,7	4,0	4,3
Formamida	Variable	0,0	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,7	3,0	3,3	3,6	3,9	4,2
Glicerol	2%	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Cuadro 11.5:
Cantidades de reactivos (en mL) a añadir para preparar las soluciones desnaturizantes a aplicar en el generador de gradientes

ción tampón TAE 50X, 4 mL de glicerol, 40 mL de la solución 40% de acrilamida:bisacrilamida [37:1], y agua Milli-Q hasta 200 mL) y una solución 0% (lo mismo, pero sin añadir formamida ni urea), y juntarlas en las proporciones adecuadas para hacer las dos soluciones (mayor y menor porcentaje desnaturalizante) que se vayan a utilizar. La urea se disuelve en caliente.

5. Verter 15-20 mL de solución con la mayor concentración de desnaturalizante en la cámara correspondiente del generador de gradientes. Llenar el tubo suavemente, evitando burbujas de aire. Poner en marcha el agitador de esta cámara.
6. Verter 15-20 mL de solución con la menor concentración de desnaturalizante en el otro compartimento del generador de gradientes.
7. Añadir 150 μ L de APS y 15 μ L de TEMED a cada una de las dos soluciones desnaturalizantes, mezclándolo bien con las soluciones de acrilamida. Al añadir estas sustancias comienza la polimerización de la acrilamida, desde este momento se dispone de unos 15 minutos para completar el montaje del gel.
8. Abrir las llaves de salida de las cámaras del generador de gradientes, evitando la formación de burbujas.
9. Conectar la bomba del generador de gradientes, a un flujo de 5 mL/min (si no se dispone de sistema de bombeo puede colocarse el generador de gradientes sobre las placas y dejar que el líquido pase por gravedad), completándose el vertido del gel en unos 4-6 minutos.
10. Detener el llenado cuando el líquido esté aproximadamente 0,5 cm por debajo del nivel que ocupará el peine. Limpiar el tubo y el generador de gradientes con un flujo de agua Milli-Q (que se descarta).
11. Añadir unos mL de agua Milli-Q saturada con butanol.
12. Dejar polimerizar el gel durante una hora.
13. Limpiar el espacio entre las placas tres veces con agua Milli-Q. Secar el espacio entre las placas con papel Whatman.
14. Colocar el peine en la parte superior.
15. Con una pipeta Pasteur, añadir una mezcla de solución de acrilamida 0% (sin formamida ni urea), 50 μ L de APS y 5 μ L de TEMED (*stacking gel*).
16. Dejar polimerizar el gel durante 15 minutos.
17. Quitar el peine del gel y la tapa de la parte inferior de las placas de cristal.

Las técnicas electroforéticas se basan en la separación de moléculas cargadas al someterlas a un campo eléctrico a través de un gel

Carrera electroforética y revelado del gel

1. Colocar el marco con el gel (fig. 11.6c) en el tanque contenedor de la solución tampón (fig. 11.6d).
2. Llenar el contenedor con tampón TAE 1X. Ajustar el tampón para que suba justo sobre el nivel de los pocillos. Evitar el contacto del tampón con la cámara de electroforesis superior. El tampón se renueva cada tres o cuatro carreras.
3. Conectar el sistema de circulación del baño y calentar a 60 °C.
4. Llenar los pocillos con tampón.
5. Precorrer el gel durante media hora a 60 voltios (unos 50 mA).

6. Lavar los pocillos con tampón.
7. Cargar las muestras, añadiéndoles previamente el tampón de carga de gel (10-50%) con puntas de pipeta para carga de geles. Cargar alrededor de 10 μL de muestra.
8. Cargar los marcadores de tamaño (normalmente uno a cada extremo y uno en el centro del gel).
9. Comprobar el buen funcionamiento del sistema de circulación.
10. Cubrir la cubeta con film plástico para disminuir la evaporación.
11. Correr la electroforesis durante unas 15 horas a 50-60 voltios.
12. Finalizar la electroforesis y desconectar el aparato y el sistema de circulación.
13. Retirar el gel de la cámara apoyado sobre una de las placas de cristal.
14. Teñir el gel durante 30 minutos en una solución de TAE 1X con 50 μL de una solución 10 mg/mL de bromuro de etidio, con agitación suave.
15. Colocar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta.
16. Fotografiar cuidadosamente el gel con un sistema de fotografía digital.
17. Trabajar la fotografía con un programa de análisis de imagen.
18. Si se desea obtener más información taxonómica, las bandas se pueden escindir, reamplificar y secuenciar, aunque para ese tipo de estudios la clonación es un procedimiento más adecuado.

Técnica 24e. Clonación

La clonación de los fragmentos amplificados por PCR, con posterior secuenciación, es un procedimiento costoso, por lo que no suele utilizarse para estudiar diferencias espaciotemporales en toda la comunidad microbiana, sino más bien para el estudio de la diversidad de grupos taxonómicos concretos. El análisis de las secuencias clonadas hace posible identificar las secuencias dominantes en el producto inicial de la PCR.

La clonación es adecuada solamente para el estudio de la diversidad taxonómica

En la técnica de clonación, los fragmentos de DNA amplificados son unidos a un vector (un plásmido) que suele llevar un gen que codifica para unas características distintivas (normalmente una resistencia a un antibiótico y un enzima para una determinada reacción), de manera que al ser insertado en una bacteria ésta integra tanto el fragmento de DNA procedente de la amplificación como el gen que le confiere dichas características, las cuales permiten identificar las colonias de las bacterias que han incorporado el vector. Fundamentalmente, los pasos del proceso de clonación son:

Ligación del DNA amplificado al vector. La reacción se realiza en tubos Eppendorf de 0,5 mL de capacidad, en los que se introduce la mezcla de ligación consistente, fundamentalmente, en DNA-ligasa (por ejemplo, T4 DNA-ligasa), el vec-

tor de clonación (un plásmido, que en el protocolo resumido que incluimos aquí incluye un gen de resistencia a un antibiótico, generalmente a la ampicilina, junto con la capacidad de síntesis de β -galactosidasa que permite la degradación de XGal), el producto de PCR a clonar (que no se debe haber congelado previamente), un tampón, y agua Milli-Q. Se incluyen, además de las muestras, un control positivo, consistente en un fragmento de DNA diferente al amplificado, y un control negativo, en el que no se añade DNA. Todo esto se incuba a temperatura ambiente, durante aproximadamente una hora, o durante una noche a 4 °C.

Transformación (introducción del vector en las células competentes). La clonación se realiza sobre células competentes (para la transformación) de *Escherichia coli* (se pueden adquirir ya preparadas y se guardan congeladas). A estas células, una vez descongeladas en un baño con hielo, se les añade el producto de la ligación mezclándolo con la propia pipeta. Se incuba en hielo durante 20 minutos, se le somete a un choque térmico a 42 °C durante 50 segundos (sin agitar), se devuelve al hielo durante un par de minutos, se añade aproximadamente 1 mL de medio de cultivo líquido (medio Luria-Bertani —LB—, o medio SOC) y se incuba durante una hora y media a 37 °C en agitación. Se prepara también un control con el plásmido no ligado.

Cultivo de las bacterias transformadas para, a partir de cada colonia, obtener los clones. Se toma el producto de la transformación y se transfieren unos 100 μ L a una placa de medio LB/ampicilina/XGal, incubándolo durante una noche a 37 °C.

Las células transformadas, que contienen el fragmento de DNA clonado, dan lugar a colonias blancas, ya que son capaces de crecer en medio con ampicilina y degradar XGal, que es lo que caracteriza al plásmido introducido). Estas colonias se seleccionan y se vuelven a plaquear en medio sólido LB/ampicilina/XGal, obteniéndose con ello cada uno de los clones. Cada uno de ellos se deberá amplificar picando con un asa de siembra estéril en la colonia y juntando con la mezcla de polimerización para llevar al termociclador. Con el producto amplificado se corre una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que efectivamente contienen el DNA que se pretendía clonar. El producto de PCR purificado podrá ser utilizado para su secuenciación y, con ello, para la asignación filogenética del donante de DNA comparando la secuencia con las de las bases de datos (véase técnica 24f).

Actualmente los vectores, las células competentes y la mayoría de los reactivos pueden adquirirse comercialmente en *kits* comerciales de clonación (por ejemplo, *pGEM[®]-T Easy Vector System* de Promega).

Molde	Cantidad necesaria (ng)
Producto de PCR de 100-200 pb	10
Producto de PCR de 200-500 pb	20
Producto de PCR de 500-1000 pb	30
Producto de PCR > 1000 pb	100
DNA de cadena sencilla	100
DNA de doble cadena	250

Cuadro 11.6:

Cantidades mínimas de DNA monoespecífico (de una misma secuencia) necesarias para la secuenciación

Técnica 24f. Secuenciación y asignación filogenética

Para la secuenciación se parte de un producto de PCR, que puede provenir tanto de un clon, de una banda de DGGE, o del producto amplificado en la PCR de una muestra presuntamente uniespecífica. La secuencia a realizar debe ser única. Es necesario cuantificar la cantidad de DNA que contiene el extracto para llevar a secuenciar la cantidad correcta de DNA (cuadro 11.6). Cuando sea necesario, la muestra se diluye con agua Milli-Q. Es necesario tener un producto de PCR bien purificado, sin contaminación por fenol, RNA, proteínas u otros compuestos que puedan interferir en el proceso de secuenciación. La pureza puede determinarse mediante el procedimiento anteriormente descrito en el apartado «procedimiento para cuantificar la cantidad y pureza del DNA extraído» (pág. 190) La purificación del producto de PCR previo al proceso de secuenciación se puede realizar con kits comerciales (por ejemplo, con filtración o minicolumnas), aunque éste es un proceso que habitualmente también pueden realizar los laboratorios dedicados a la secuenciación, a los que se puede remitir el DNA purificado o sin purificar, con las instrucciones oportunas al respecto.

Lo más sencillo es secuenciar el DNA en un laboratorio comercial

Una vez secuenciado, el laboratorio de secuenciación remitirá los resultados en el formato acordado, por lo que debemos asegurarnos de contar con el software adecuado para poder leerlo. Por ejemplo, los secuenciadores ABI (Applied Biosystems) utilizan el programa Chromas 1.45.⁵

Al abrir el archivo se pueden presentar tres posibilidades.

- Que la secuencia sea perfecta y cada posición tenga asignada correctamente un nucleótido.
- Que haya dos hebras secuenciadas, una del directo y otra del reverso. El software es capaz de identificarlo y solucionarlo.

⁵ Se puede encontrar más información en <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

- c) Que en muchas posiciones aparezca la letra «N», lo que significa que en la secuenciación no se ha podido asignar un único nucleótido en esa posición. Esto indica que probablemente teníamos una mezcla de distintas secuencias y no es posible la secuenciación.

Si la secuencia es correcta, se puede alinear y comparar con otras existentes en las bases de datos. Actualmente la herramienta más utilizada para la parte inicial de este proceso es BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).⁶

Los pasos a realizar son:

Una vez secuenciado el DNA, se puede comparar la secuencia con las existentes en bases de datos

1. Ir a *Nucleotide* BLAST.
2. Introducir la secuencia o cargar directamente el archivo, darle un nombre a la búsqueda y seleccionar la base de datos donde buscar (por ejemplo, GenBank, EMBL o ARB Silva Databases).
3. Guardar el resultado y secuencias que interese alinear con la nuestra.

Una vez se tienen identificadas, se importan las secuencias con alta homología con la nuestra usando programas como Bioedit.⁷ Mediante un programa de comparación de similitud de secuencias (por ejemplo, Clustal X) se procede a construir los árboles filogenéticos que indican la proximidad de la secuencia con otros existentes en la base de datos. Muchos programas sirven tanto para manejar las secuencias como para construir las relaciones filogenéticas, como el software ARB (Ludwig et al. 2004).⁸

Técnica 25. Evaluación de la diversidad de los hongos acuáticos

La identificación de los hifomicetos acuáticos se basa en la identificación de las esporas al microscopio

Esta metodología se basa en la identificación de los hongos acuáticos a partir de la observación de esporas (conidios). En los ríos, los conidios se pueden encontrar dispersos en la columna de agua o concentrarse en las espumas, principalmente después de zonas de corriente elevada o en períodos de lluvia (Gessner et al. 2003). Los conidios constituyen la fase asexual de los hongos. La morfología de los conidios es generalmente sigmoide o tetrarradiada, lo que facilita su identificación. Además del análisis morfológico de los conidios, son cada vez más habituales las técnicas moleculares para evaluar la diversidad de los hongos acuáticos, en particular la DGGE y RFLP (técnica 24), ya que no todas las especies

⁶ BLAST fue desarrollada inicialmente por el NCBI (National Center for Biotechnology Information). Más información sobre esta herramienta en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> o <http://www.ebi.ac.uk/blast/>

⁷ Más información en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

⁸ Más información en <http://www.arb-home.de/>

de hongos esporulan en condiciones de laboratorio. La utilización de cebadores específicos de la región ITS del rDNA confirma que las comunidades de hifomicetos acuáticos que colonizan sustratos vegetales están mayoritariamente dominadas por Ascomycota, seguido de Basidiomycota y de Chytridiomycota (Bärlocher 2007).

MATERIAL Y EQUIPAMIENTO

- Frascos de vidrio con tapa de rosca (10-50 mL).
- Cucharas.
- Botellas de vidrio de 1 L.
- Bolsas de plástico (con mallas de 0,5 a 10 mm).
- Placas de Petri de 9 cm y de 5 cm de diámetro.
- Agitador.
- Bombas de acuario con tubos de silicona.
- Sistema de filtración conectado a un sistema de vacío o a una trompa de agua.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Microscopio óptico (160-400 aumentos).
- Microscopio invertido para los aislamientos (100-200 aumentos).
- Aguja de disección pequeña.
- Filtros con poro 5-8 μm (Millipore).
- Autoclave.
- Mechero Bunsen.
- Tubos de polipropileno para criopreservación (2 mL, Sarstedt).
- Cámara de flujo laminar.
- Bolsas de plástico tipo Zip lock para transporte de hojas.
- Nevera portátil.

REACTIVOS

- Azul de triptano en lactofenol a 60% (lactofenol: 10 mL de fenol, 10 mL de ácido láctico y 10 mL de agua desionizada) o azul de algodón (*cotton blue*) en ácido láctico a 0,1%.
- Agua desionizada.
- Agua del río filtrada y esterilizada en autoclave (120 °C, 20 min).
- Agua-agar (2% p/v agar en agua desionizada, esterilizar en autoclave, verter asépticamente en placas de Petri de 9 cm de diámetro y dejar solidificar).
- MEA (1% p/v de extracto de Malta y 1,5% p/v de agar en agua desionizada, esterilizar en autoclave, verter asépticamente en placas de Petri de 5 cm de diámetro y dejar solidificar).
- MEA con antibiótico (MEA preparado como antes, adicionar asépticamente solución de estreptomina y/o cloranfenicol (0,1% de concentración final)

previamente esterilizada por filtración, verter asépticamente en placas de Petri de 5 cm de diámetro y dejar solidificar).

- FAA (etanol 70%, ácido acético glacial, 37% formaldehído, 1:3:1 / v/v/v).
- Etanol 96%.
- Formaldehído 37%.
- Glicerol (10-30%) esterilizado en autoclave.

PROCEDIMIENTO

Toma de muestras

Las esporas de hifomicetos son especialmente abundantes en las espumas que se forman naturalmente en los ríos

Los hifomicetos acuáticos se pueden encontrar en ríos de pequeño orden bordeados por vegetación, aunque también en grandes ríos (Pascoal et al. 2005). La selección de los sitios y tiempos de muestreo deben hacerse de acuerdo con los objetivos del estudio, y así los hongos acuáticos se pueden muestrear de distinta manera:

- a) a partir de las espumas,
- b) a partir de la columna de agua,
- c) a partir del material vegetal acumulado en el lecho fluvial.

a) Muestreo de los hongos acuáticos a partir de las espumas

Las espumas concentran un elevado número y diversidad de conidios (fig. 11.7), permitiendo conocer la diversidad de estos hongos, aunque no su abundancia.

1. Recoger una muestra de espuma densa mediante una cuchara y transferirla a un frasco pequeño con tapa de rosca.
2. Eliminar el exceso de agua a fin de concentrar la muestra.
3. Transportar la espuma con sus conidios en una nevera a 4 °C y proceder lo más rápido posible a su observación, para evitar que las esporas germinen.
4. Parte de las espumas puede ser fijada con una gota de FAA, lo que permite preservar las muestras durante años. Alternativamente, las espumas pueden ser fijadas durante algunos meses con etanol al 96% o con formaldehído al 2-4%.

Para muestras cuantitativas de conidios es preferible filtrar agua

b) Muestreo de los hongos acuáticos a partir de la columna de agua

1. Recoger 1 L de agua del sitio de muestreo.
2. Transportar en una nevera a 4 °C hasta el laboratorio.

Esta técnica es cuantitativa, pero tiene la desventaja de necesitar un gran volumen de agua para encontrar una muestra representativa de la diversidad local.

c) Muestreo de los hongos acuáticos asociados a detritus vegetales

1. Preparar bolsas de plástico (malla 0,5-10 mm) que contengan hojas senescentes y dejar colonizar en el río durante dos semanas (véase técnica 26).



Figura 11.7:
Espuma en el río donde se concentra gran densidad de conidios de hifomicetos acuáticos

2. Alternativamente, se pueden recoger detritus vegetales del lecho de los ríos, tales como hojas en descomposición.
3. Los detritus vegetales deben ser colocados en sacos de plástico y transportados en la nevera a 4 °C hasta el laboratorio.

Procedimiento en el laboratorio

a) Espumas

1. Colocar una gota de espuma en el portaobjetos y dejar secar al aire.
2. Colocar una gota de azul de algodón o azul de triptano en el cubreobjeto, y aplicarlo directamente sobre el portaobjetos.
3. Observar al microscopio óptico (entre 160 y 400 aumentos).

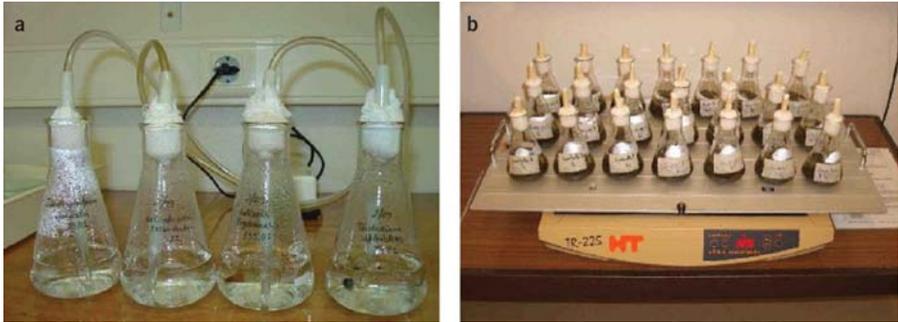
b) Agua

1. Filtrar de 250 a 1000 mL de agua, dependiendo de la densidad de conidios en suspensión, a través de filtros (47 mm de diámetro, y 5-8 μm de poro, Millipore). No se aconseja filtrar volúmenes muy grandes, ya que la acumulación de sedimentos dificulta identificar los conidios.
2. Cortar el filtro de acuerdo con el tamaño del portaobjetos.
3. Teñir el filtro con azul de algodón o azul de triptano.
4. Colocar el cubreobjeto.
5. Observar al microscopio óptico.

c) Material vegetal

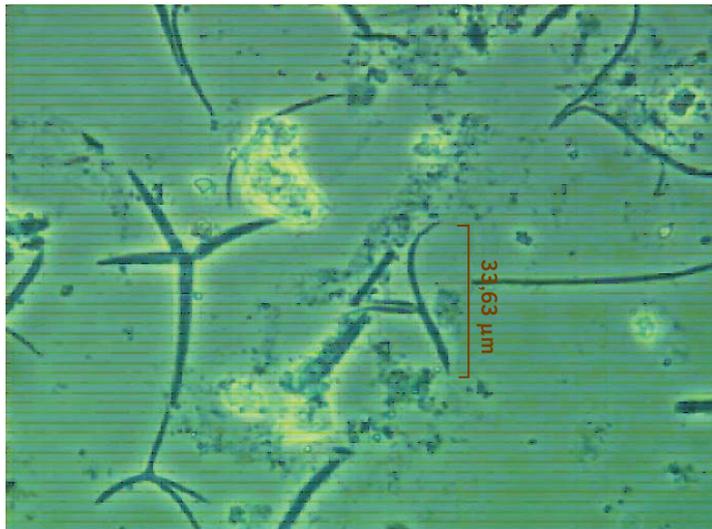
1. Lavar las hojas con agua desionizada para eliminar los sedimentos.

Figura 11.8:
Frascos con aireamiento de bombas de acuario (a) o en agitador (b)



2. Colocar las hojas en frascos Erlenmeyer con agua del río previamente filtrada y esterilizada o agua desionizada esterilizada.
3. Airear los frascos mediante bombas de acuario o un agitador para inducir la esporulación (fig. 11.8).
4. Una vez transcurridas 24-48 horas, filtrar volúmenes adecuados de agua (filtros de 5-8 μm de poro).
5. Cortar el filtro de acuerdo con el tamaño de los portaobjetos.
6. Añadir colorante (azul de algodón o azul de triptano) al filtro.
7. Cubrir con los cubreobjetos.
8. Observar al microscopio óptico.

Figura 11.9:
Conidios de hifomicetos acuáticos provenientes de espumas observadas al microscopio óptico



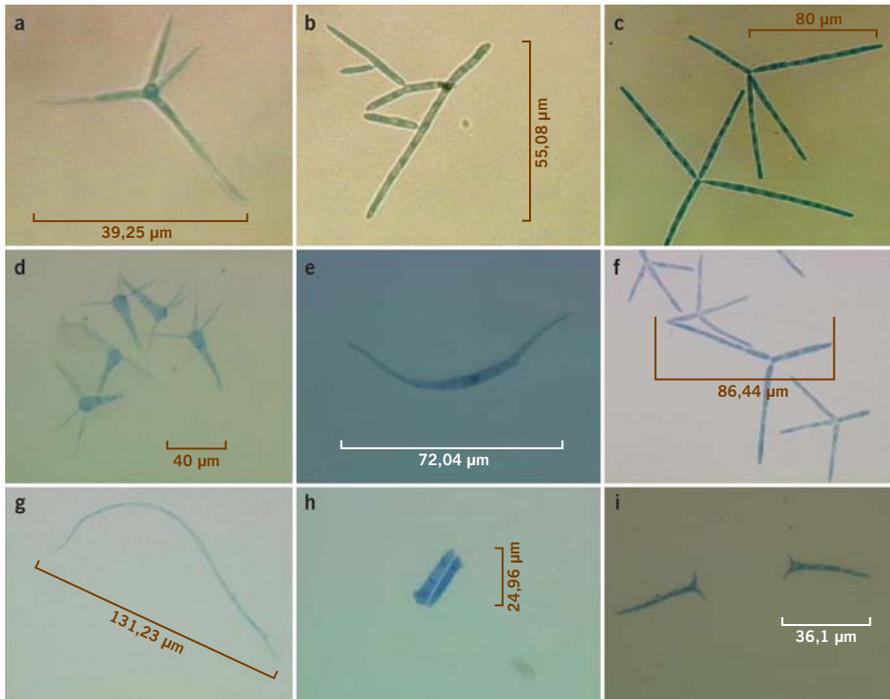


Figura 11.10:
Conidios de hifomicetos acuáticos de la colección del Departamento de Biología de la Universidad de Minho (Braga, Portugal)

Nota: a) *Alatospora acuminata*. b) *Varicosporium elodeae*. c) *Gencilospora grandis*. d) *Clavariopsis aquatica*. e) *Lunulospora curvula*. f) *Articulospora tetracladia*. g) *Anguillospora filiformis*. h) *Heliscus lugdunensis*. i) *Heliscus submersus*.

Identificación

La identificación se hace al microscopio óptico con una ampliación que, generalmente, varía entre 160 y 400 aumentos, dependiendo del tamaño de los conidios. Los conidios tienen dimensiones que pueden variar entre 12 µm y 400 µm (figs. 11.9 y 11.10). Las formas sigmoides son las más difíciles de identificar. Existen pocas claves de identificación para hifomicetos acuáticos; se aconseja consultar Ingold (1975) o Gulis et al. (2005) para climas templados, o Santos-Flores y Betancourt-López (1997) para climas tropicales. Algunos hongos son difíciles de identificar sobre la base solamente del análisis de los conidios. Para el estudio más detallado de la taxonomía, ecofisiología o toxicología de los hongos acuáticos, es preferible mantenerlos en cultivos puros.

Aislamiento de los hongos en cultivo puro

El aislamiento requiere entrenamiento y tiempo:

1. Esparcir una gota de la suspensión de conidios provenientes de las espumas o de los detritus vegetales en cajas de Petri con agua-agar.
2. Observar los conidios al microscopio invertido.

La identificación de esporas al microscopio tiene sus limitaciones. Para ir más allá hay que aislar los hongos en cultivos puros

3. Seleccionar el conidio que queramos, y cortar el agar a su alrededor con una aguja de disección.
4. Transferir el pedazo de agar con el conidio a una caja de Petri con MEA y antibiótico.
5. Incubar a 15-18 °C y monitorizar el crecimiento del hongo.
6. Cuando el hongo tenga cerca de 1 cm, y si no se observa contaminación por bacterias, transferir un pedazo del cultivo a MEA y otro pedazo a un frasco Erlenmeyer con agua para inducir la esporulación (como se indica anteriormente).
7. Controlar los conidios liberados de cada cultivo puro durante cerca de dos semanas mediante la observación microscópica de una gota de la suspensión teñida (fig. 11.10).
8. Si se sospecha de contaminación bacteriana, transferir de nuevo un pedazo del cultivo a una nueva placa de Petri con antibiótico.
9. Efectuar tantos aislamientos de conidios a partir del agua-agar como sea posible. Se pueden colocar las restantes placas de agua-agar a 8-10 °C para retrasar el crecimiento de los hongos.
10. Cuando se obtenga un cultivo puro en MEA, se pueden almacenar pedazos del cultivo en frascos de vidrio con tapón de rosca esterilizados y que contengan agua destilada estéril a 18 °C. También se pueden guardar pedazos de los cultivos en tubos de criopreservación estériles con glicerol (10-30%) y a -80 °C.

Técnica 26. Tasa de esporulación

La tasa de esporulación mide la actividad reproductora de los hongos

Las tasas de esporulación de hifomicetos acuáticos informan sobre la actividad reproductora de los hongos en hojas en descomposición. En general las hojas son colonizadas inmediatamente después de caer en el agua del río. Los hifomicetos crecen rápidamente y en poco tiempo empiezan a canalizar energía para la reproducción, de lo que resulta la producción de una gran cantidad de esporas. Esta actividad depende de la calidad del sustrato y de la cantidad de nutrientes o contaminantes en el agua. La tasa de esporulación baja muy rápidamente después de la primera o segunda semana en descomposición. Aunque se pueden usar sustratos naturales para obtener esporulación en laboratorio, es recomendable poner hojas senescentes en bolsas y depositarlas durante un tiempo determinado en el río para que sean colonizadas por los hongos y proceder a la esporulación en condiciones de laboratorio.

MATERIAL

- Bolsas de plástico (con mallas de 0,5 a 10 mm).
- Hojas de árbol senescentes.

- *Spray* para remojar las hojas.
- Bandejas de plástico o aluminio.
- Cuerdas para amarrar las bolsas en el río.
- Sacabocados o tijeras.
- Pinzas.
- Frascos Erlenmeyer de 250 mL.
- Papel de aluminio.
- Agua de río filtrada, agua destilada esterilizada o agua con nutrientes.
- Agitador orbital o aireador de acuario.
- Conexiones en «T».
- Puntas desechables de pipetas de 5 mL.
- Detergente líquido.
- Sistema de filtración.
- Filtros con poros de 5 μm (Millipore MF o equivalente).
- Estufa (50 °C).
- Balanza, ± 1 mg de precisión.
- Microscopio (recomendado ocular de 10X y objetivo de 40X; el objetivo de 16X puede ser útil para una visión general de los filtros).
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Azul de triptano en lactofenol a 60% (lactofenol: 10 mL de fenol, 10 mL de ácido láctico y 10 mL de agua desionizada) o azul de algodón (*cotton blue*) en ácido láctico a 0,1%.
- Bolsas de plástico tipo Zip lock para transporte de las hojas.
- Nevera portátil.

PROCEDIMIENTO

Preparación del material

Recoger hojas senescentes de árboles, ya sea directamente de los árboles durante la senescencia, o del suelo del bosque de ribera. Es mejor usar hojas de un único árbol para minimizar la variabilidad. En caso de usar hojas del suelo deben ser recientemente caídas, ya que rápidamente son colonizadas por hongos terrestres. Si la caída de hojas es continua, lo mejor es usar trampas, que pueden ser plásticos colocados directamente en el suelo o amarrados entre árboles (fig. 11.11), en las que se dispone alguna piedra en su centro para que las hojas se deslicen hacia él. Se deben hacer agujeros en esta parte central a fin de impedir la acumulación de agua, que podía alterar la calidad de las hojas. Después de ser recogidas, las hojas se deben secar al aire y guardar en lugar seco.

Para el estudio de los heterótrofos sobre hojas es importante utilizar hojas a punto de caer, o recién caídas

Preparación de las hojas para colocación en el río

1. Poner unos 3 g de hojas, o entre 2 y 8 hojas, en una bandeja de plástico o aluminio.

Figura 11.11:
Trampas para recolección de
hojas senescentes
de árboles



Foto: A. Encalada.

2. Humedecer las hojas con un *spray* a fin de que queden flexibles y no se fragmenten con la manipulación.
3. Poner las hojas dentro de las bolsas y guardar en frío hasta que sean puestas en el agua. No se deben dejar más de 24 horas para evitar la actividad microbiana.
4. Amarrar las bolsas en grupos de cuatro y disponerlas en zonas de acumulación natural de hojas (fig. 11.12). Amarrar a un tronco en la orilla o a piedras.

Figura 11.12:
Hojas en las bolsas antes
de ser colocadas en el río



Foto: M.F. Feio.

5. Las tasas de esporulación se pueden medir al cabo de una fecha determinada, por ejemplo, una semana. Sin embargo, para conocer la evolución de la actividad de hifomicetos acuáticos, se disponen varias bolsas en el río, que se recolectan en fechas determinadas. Por ejemplo, después de 2, 5, 10, 20, 40 y 60 días (véase técnica 20). El tiempo adecuado varía en función de las condiciones ambientales.

Procedimiento en el laboratorio

1. Sacar las bolsas del agua e introducir las en una bolsa tipo Zip lock con un poco de agua del río. Transportar las bolsas hasta el laboratorio en frío (nevera portátil).
2. En el laboratorio, lavar las hojas suavemente con agua destilada o agua del río para eliminar sedimentos o invertebrados. Debe evitarse usar agua de la red ya que tiene cloro y puede inhibir la actividad microbiana.
3. Cortar pedazos de hojas (cerca de 10 cm²) mediante tijeras o sacabocados (véase fig. 11.3) y colocarlos en frascos Erlenmeyer. Sacar de cada bolsa de 5 a 8 trozos o círculos que deberán ser recogidos de todas las hojas, para minimizar las variaciones entre hojas.
4. Poner las muestras en un frasco Erlenmeyer usando pinzas finas.
5. Limpiar el material de preparación con alcohol cuando se pase de una muestra a otra a fin de evitar contaminaciones con hifas y esporas.
6. Añadir a los frascos Erlenmeyer 15 mL de agua destilada o agua del río filtrada (0,5 µm de poro).
7. Poner los frascos Erlenmeyer en un agitador orbital a una velocidad que provoque una ola de cerca de 1 cm de alto. Si no hay agitador orbital, conectar una bomba aireadora de acuarios, usando una punta desechable de pipeta de 5 mL con el objetivo de crear una pequeña turbulencia (véase la fig. 11.8; técnica 25). Para comparar resultados es imprescindible usar siempre las mismas condiciones, ya que la tasa de esporulación depende de la turbulencia.
8. Mantener estas condiciones durante 24 a 48 horas. Es importante anotar el tiempo exacto, pues los resultados se expresan por unidad de tiempo. Es también de máxima importancia controlar la temperatura. Para ello, se puede mantener una temperatura similar a la del río donde el material fue recogido, o bien usar una temperatura constante próxima al promedio anual de las aguas en el río. Esta última opción permite comparar resultados de experimentos hechos en cualquier época del año.

Las hojas se incuban en el río, y posteriormente en el laboratorio, en un agitador orbital

Preparación para la observación

1. Al final del período de incubación, sacar los discos de hojas con unas pinzas largas, e introducirlos en el horno en cajas hechas con papel de aluminio. Secar a 50-60 °C hasta peso constante (en general, de 2 a 3 días).
2. Añadir 1 o 2 gotas de detergente a los frascos Erlenmeyer, donde se encuentra la suspensión de esporas.

3. Filtrar (5 μm de poro) un volumen apropiado de la suspensión, limpiando varias veces el Erlenmeyer (en caso que todo el volumen sea filtrado) con agua, así como las paredes del vaso de filtración.
4. Colocar el filtro en una placa de Petri pequeña, añadir unas gotas de azul de triptano hasta que todo el filtro quede húmedo, pero sin que se inunde.
5. Secar a 50-60 $^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente una hora. Los filtros así preparados se pueden guardar durante meses.

Conteos

1. Colocar el filtro en un portaobjetos. Si el filtro es mayor que el portaobjetos, cortar el filtro por la mitad.
2. Poner un cubreobjetos y observar a 400X. Contar el número de esporas por cada campo de microscopio (fig. 11.13).
3. Contar un mínimo de 100 esporas y 30 campos de microscopio.
4. Determinar el área del campo de microscopio, el área del filtro donde están retenidas las esporas (ligeramente más pequeña que el área total del filtro).
5. Las *tasas de esporulación* E (número de esporas por día y por mg de hoja) se estiman mediante la expresión:

$$E = \frac{n A/a}{t p} \quad (11.3)$$

donde n : número promedio de esporas por campo de microscopio, a : área del campo de microscopio (mm^2), A : área del filtro (mm^2), t : tiempo (días), y p : peso total (mg) de los discos de hojas (alternativamente, área total de los discos).

Figura 11.13:
*Espora de Casaresia
sphagnorum*

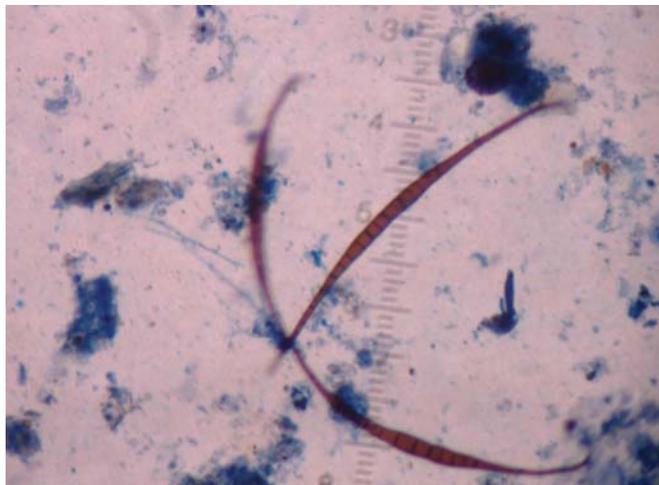


Foto: V. Ferreira.

Otras consideraciones

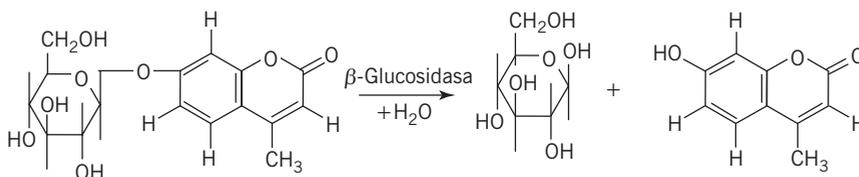
El número de esporas producido depende de las condiciones a las que las hojas estuvieron expuestas, de la calidad del sustrato y del tiempo de incubación. Valores entre 75 y 7000 esporas por g de hoja y por día han sido descritos en la literatura (Suberkropp 2001, Bärlocher 2005).

Técnica 27. Actividades enzimáticas extracelulares

Las enzimas extracelulares son sintetizadas principalmente por bacterias y hongos pero también por algunas algas y protozoos. Estas enzimas están ligadas a la superficie de la célula microbiana (o en el espacio periplasmático en las bacterias gramnegativas) y actúan fuera de la célula (Chróst 1991). En general, la expresión «actividad enzimática extracelular» se refiere a las enzimas ligadas a las células, pero también a las posibles enzimas libres (formando parte de la matriz polimérica en el biofilm o ligadas a partículas detríticas). El término *ectoenzima* se refiere específicamente a las enzimas ligadas a las células. Estas enzimas descomponen moléculas de alto peso molecular a moléculas de bajo peso molecular, que pueden incorporar directamente los microorganismos para ser metabolizadas y usar como fuente de materia orgánica (C, N y P). La tasa de descomposición de la materia orgánica depende directamente de esta actividad enzimática.

Las actividades enzimáticas extracelulares son una expresión del metabolismo microbiano heterotrófico

En la descomposición de la materia orgánica intervienen tanto enzimas hidrolíticas como oxidativas (peroxidasas, fenoloxidasas, responsables de la descomposición de lignina). En este capítulo se describe la técnica para la medida de actividades enzimáticas hidrolíticas mediante fluorescencia. Esta técnica se basa en la utilización de compuestos complejos (sustratos artificiales), que contienen el enlace sobre el cual actúa la enzima cuya actividad queremos medir. En un extremo de este enlace hay una molécula fluorescente (metilumbeliferona, MUF, o aminometilumarina, AMC), que emite fluorescencia solamente cuando está libre (gracias a la acción de la enzima; fig. 11.14). Las muestras se incuban con este sustrato artificial y se mide la fluorescencia final (es decir, los enlaces que han sido rotos por causa de la actividad de las enzimas presentes en la muestra). Los sus-



Nota: El sustrato artificial 4-metilumbeliferil-β-D-glucósido se descompone en D-glucosa y MUF gracias a la actividad de la (β-D- glucosidasa).

Figura 11.14: Diagrama de la reacción que tiene lugar durante la medición de la actividad de la enzima β-glucosidasa

Cuadro 11.7:
Enzimas extracelulares más habituales en estudios de ecología fluvial

Enzima	Sustrato artificial	Relacionada con el metabolismo de	Concentración
β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21)	MUF- β -D-glucopiranosido (o MUF- β -D-glucósido)	C (último paso de la descomposición de celulosa, celobiosa o pequeños oligómeros con enlaces β -D-glucosa)	0,01-0,5 mM
β -D-xilosidasa (EC 3.2.1.37)	MUF- β -D-xilopiranosido (o MUF- β -D-xilósido)	C (último paso de la descomposición de hemicelulosa, descomposición de xilobiosa o xilooligosacáridos)	0,01-0,5 mM
Celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91)	MUF-celobiósido	C (degradación de celulosa)	0,1-5 mM
Leucina-aminopeptidasa (EC 3.4.11.1)	Leu-AMC (L-leucina-4-metil-7-cumarinilamida)	N, C (descomposición de péptidos)	0,01-0,5 mM
Fosfatasa (EC 3.1.3.1-2)	MUF-fosfato	P (descomposición de ésteres de fosfato)	0,01-0,5 mM
β -N-acetilglucosaminidasa	MUF-N-acetil- β -D-glucosaminida	Degradación y síntesis de la pared fúngica. Degradación de quitina por parte de bacterias	0,01-0,5 mM
Quitinasa	MUF- β -N,N',N''-triacetilquitotriósido (MUF-[GlnNAc] ³)	Descomposición de quitina	0,01-0,5 mM

Nota: Se incluye el nombre de la enzima y el código de la EC (*Enzyme Commission*, clasificación universal de las enzimas), el sustrato artificial que se utiliza para su medición, el metabolismo en el cual está involucrada la enzima y el rango de concentración de sustrato artificial habitualmente utilizado en estudios en sistemas acuáticos.

tratos artificiales más utilizados y que existen en el mercado se resumen en el cuadro 11.7. En la mayoría de estudios se miden actividades enzimáticas extracelulares potenciales, es decir, en condiciones de saturación de la enzima, lo cual permite comparar muestras en distintas condiciones y en función del tiempo, pero dificulta acercarse a la actividad real en la naturaleza. Por ello, previamente al protocolo hay que realizar la cinética enzimática para determinar qué concentración utilizar para el estudio.

MATERIAL

- Viales de 100-125 mL de vidrio ámbar (o de polietileno) para guardar las soluciones de sustrato artificial y de los patrones madre de MUF y/o AMC.
- Viales de vidrio (de 15-30 mL) o frascos de centrífuga (tipo Falcon de 15 mL) para realizar la incubación.
- Matraces de 100 mL para preparar las soluciones patrón.
- Matraces de 1000 mL para preparar la solución tampón.

- Agitador para incubar los viales junto con los patrones y blancos, con control de temperatura.
- Centrífuga (necesaria para medidas en muestras con material en suspensión como suele ocurrir con el sedimento).
- Pipetas automáticas.
- Sustratos artificiales de la o las enzimas (cuadro 11.7).
- Patrón de MUF o AMC (según la actividad medida).
- Glicina (en polvo).
- Hidróxido sódico (lentejas).
- Agua Milli-Q.

PREPARACIÓN PREVIA DEL MATERIAL

Preparación de los sustratos artificiales fluorescentes

Los sustratos artificiales fluorescentes se diluyen en agua destilada y autoclavada y en viales ámbar (o cubiertos de la luz) para obtener una concentración de 10 mM. Esta solución concentrada se guarda en el congelador ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), se descongela y vuelve a congelar de inmediato cada vez que se utiliza. Algunos sustratos artificiales de MUF son de difícil disolución, como la MUF- β -glucósido y la MUF-celobiosido, y es necesario añadir 1-2 mL de hidroximetil éter en el sustrato en polvo para facilitar su disolución en agua y dejarlo unas 10-12 horas, en fresco ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a oscuras para minimizar la fotodegradación. En algún caso también será necesario sonicar la solución (fracciones de 5 minutos máximo con el fin de evitar el aumento de temperatura) para mejorar la disolución del sustrato en agua.

Preparación de patrones concentrados de MUF y AMC

Soluciones de MUF y AMC se disuelven con agua destilada y autoclavada a una concentración de $10\ 000\ \mu\text{M}$ y se guardan al congelador. Se descongelan cada vez que sea necesario preparar soluciones patrón.

Preparación de la solución tampón de glicina 0,05 M, pH = 10,4

Para obtener 1000 mL se toman 196,5 mL de glicina 0,2 M (18,76 g en 250 mL) y 803,5 mL de NaOH 0,2 M (8 g en 1000 mL). La solución tampón se prepara con agua destilada y se controla el pH final. Se puede guardar a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio no expuesto a la luz.

Determinación previa de la concentración de sustrato artificial: cinéticas enzimáticas

Para medidas rutinarias se utilizan concentraciones de sustrato artificial en condiciones de saturación. Para analizar las actividades enzimáticas extracelulares potenciales hay que analizar previamente el comportamiento cinético de esta actividad. Para ello hay que realizar incubaciones a concentraciones crecientes del sustrato artificial (por ejemplo, 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mM, en función

Es esencial determinar la cinética de la enzima cuya actividad queremos medir

de la muestra y la enzima que estemos midiendo, véase el cuadro 11.7). Los resultados se ajustan a una curva hiperbólica de Michaelis-Menten y se calcula la constante de saturación (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}). Estos valores permiten decidir la concentración de saturación a utilizar en los ensayos de medidas potenciales. En la mayoría de trabajos con medidas de actividades enzimáticas potenciales esta concentración de saturación se encuentra alrededor de los 0,3 mM para comunidades bentónicas (un poco superior para la celobiohidrolasa, hasta 1 mM).

PROCEDIMIENTO

Recogida de muestras en el campo

El procedimiento de muestreo es básicamente el mismo que el descrito para el conteo de bacterias. Para las muestras bentónicas, debe considerarse un mínimo de cinco réplicas para cada actividad.

1. Muestreo según el cuadro 11.1. Las muestras bentónicas se guardan en agua del río filtrada (por filtros de nailon de 0,2 μm de diámetro para evitar contaminar la muestra bentónica con bacterias planctónicas) con un volumen conocido para que queden cubiertas (4-10 mL es suficiente). Es mejor utilizar agua del mismo río para no alterar las condiciones osmóticas y de nutrientes. Si el río es de cabecera y tiene una densidad bacteriana en transporte muy baja, es posible utilizar directamente agua del río sin filtrar.
2. Guardar las muestras bentónicas o de agua en viales estériles y en frío (nevera portátil) hasta el laboratorio. Empezar la incubación tan pronto como sea posible (el mismo día de muestreo o como máximo el día siguiente, guardando siempre las muestras en frío). Antes de empezar la incubación, sacar las muestras de la nevera para que adquieran la temperatura ambiente.

Extracción de la muestra

Siempre que se pueda se utiliza la comunidad microbiana intacta, y no un extracto en suspensión

Para medir las actividades enzimáticas de las comunidades adheridas o de biofilm (como cualquier otra medida metabólica) es preferible utilizar la comunidad microbiana intacta y no un extracto en suspensión. Por ello, se utilizan sustratos artificiales colonizados o muestras de hojarasca y sedimento (cuadro 11.1). En casos de muestras epífitas es muy complicado obtener un círculo de muestra representativa del total (fig. 11.3), por lo que, solamente en estos casos, se extrae la comunidad microbiana adherida.

Sumergir la muestra en un vial con un volumen conocido que la cubra, con agua del río filtrada por 0,2 μm de poro y sonicar en un baño de ultrasonidos (por ejemplo, tres veces 2 minutos, comprobar al microscopio si aún se observan algas adheridas, mantener siempre el mismo tiempo de sonicación). Tomar una sub-

muestra del líquido extraído para el análisis de la actividad. Tomar también una muestra para el control de la fluorescencia de la muestra.

Incubación

1. Preparar los materiales a incubar: muestras (bentónicas con un volumen conocido de agua y/o muestras de agua o del extracto de una muestra epifítica), blanco (agua Milli-Q, para cada actividad a medir, que permite controlar la degradación abiótica del sustrato artificial), control (muestra de agua del río para controlar la fluorescencia del agua), patrones de MUF o de AMC (en función de la actividad a medir). Es indicado que el volumen sea el mismo en todas las muestras a incubar.
2. Añadir a las muestras y al blanco un volumen del sustrato artificial (por ejemplo, de MUF-fosfato para medir fosfatasa) para tener la concentración final de saturación obtenida con la curva de saturación previa. En las muestras control no hay que añadir sustrato artificial alguno para la actividad (fluorescencia natural del agua).
3. Colocar las muestras en un agitador, a oscuras, y con control de la temperatura. La temperatura de incubación puede ser la misma que la del río o, alternativamente, se pueden realizar las incubaciones siempre a temperatura estándar de laboratorio (20 °C). El tiempo de incubación es de alrededor de 1 hora. Para muestras con actividades muy altas pueden utilizarse tiempos de incubación menores y también tiempos más largos para muestras poco activas. La linealidad de la actividad enzimática con el tiempo se mantiene durante los primeros 90 minutos, por lo que es conveniente no realizar incubaciones más largas. Es importante calcular con exactitud el tiempo de incubación para tener una buena medida de la actividad, y conviene utilizar siempre el mismo tiempo de incubación para las muestras del mismo río.
4. Añadir tampón de glicina 0,05 M de pH = 10,4, que desnaturaliza las proteínas y detiene la reacción enzimática. Este tampón básico también convierte el MUF y el AMC en sus formas aniónicas más fluorescentes. Se añade el tampón a todas las muestras, controles, blancos y patrones con una relación $\frac{1}{2}$ v/v tampón/muestra.
5. En caso de tener muestras turbias (por ejemplo, muestras de sedimento), después de añadir el tampón, centrifugar levemente (por ejemplo, 4 minutos a 2000-3000 rpm). Tomar el sobrenadante para medir la fluorescencia.

La incubación se detiene con tampón de glicina

Medida de la fluorescencia

Medir la fluorescencia a 365 nm de excitación y 455 nm de emisión para el MUF y 364/445 excitación/emisión para el AMC en el fluorímetro, con cubeta de cuarzo de 10 mm. La cuantificación de la fluorescencia se realiza con soluciones patrones de MUF y AMC, y calculando la recta de calibración. La intensidad de la fluorescencia del blanco del sustrato y del blanco del agua se resta de todas las

muestras para corregir la posible hidrólisis no enzimática del sustrato y la presencia de compuestos fluorescentes en el agua.

Cálculo de las actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas se expresan como nmoles (o μ moles) de MUF o AMC liberados por hora y cm^2 de biofilm (epilítico) o de superficie proyectada del sustrato que se mide (epipsámico, epifítico) o por peso seco (epifítico) o por L (agua). En algunos casos (excluyendo la fosfatasa, que también es algal), la actividad enzimática específica se puede calcular por célula bacteriana, a pesar de que no se conoce la fracción de esta comunidad que, efectivamente, contribuye a la actividad metabólica analizada (Karner et al. 1992). También se puede expresar la actividad enzimática por unidad de biomasa microbiana (contenido de carbono microbiano del biofilm) o por el contenido de proteínas.

Las actividades enzimáticas pueden variar en función de múltiples factores, y especialmente de la cantidad y calidad de materia orgánica. El rango de valores es muy amplio y varía en función de la enzima que se mida (Romaní y Marxsen 2002).

11.3. Bibliografía

- ARTIGAS J., ROMANÍ A.M., y SABATER S. «Organic matter decomposition by fungi in a Mediterranean forested stream: Contribution of streambed substrata». *Annales de Limnologie* 40 (2004): 269-277.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A., y STRUHL K, eds. *Current protocols in molecular biology*. Nueva Jersey: Wiley, 2008.
- BALDY V., y GESSNER M.O. «Towards a budget of leaf litter decomposition in a first-order woodland stream». *Comptes rendus de l'Academie des Sciences III-Vie*, 320: 747-758, 1997.
- BÄRLOCHER F. «Sporulation by aquatic hyphomycetes». En M.A.S. Graça, F. Bärlocher, y M.O. Gessner, eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Dordrecht: Springer, 2005: 185-188.
- BÄRLOCHER F. «Molecular approaches applied to aquatic hyphomycetes». *Fungal Biology Reviews* 1 (2007): 19-24.
- BRATBAK G., y DUNDAS I. «Bacterial dry matter content and biomass estimations». *Applied and Environmental Microbiology* 48 (1984): 755-757.
- CHRÓST R.J. *Microbial enzymes in aquatic environments*. Nueva York: Springer-Verlag, 1991.
- DAVIS M.W., y LAMAR, R.T. «Evaluation of methods to extract ergosterol for quantification of soil fungal biomass». *Soil Biology and Biochemistry* 24 (1992): 189-198.
- DORIGO U., VOLATIER L., y HUMBERT J.F. «Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities». *Water Research* 39 (2005): 2207-2218.
- FREESE H.M., KARSTEN U., y SCHUMANN R. «Bacterial abundance, activity, and viability in the eutrophic river Warnow, Northeast Germany». *Microbial Ecology* 51 (2006): 117-127.
- FROMIN N., HAMELIN J., TARNAWSKI S., ROESTI D., JOURDAIN-MISEREZ K., FORESTIER N., TEISSIER-CUVELLE S., GILLET F., ARAGNO M., y ROSSI P. «Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns». *Environmental Microbiology* 4 (2002): 634-643.

- GESSNER M.O., y CHAUVET E. «Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes». *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993): 502-507.
- GESSNER M.O., y CHAUVET E. «Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter». *Ecology* 75 (1994): 1807-1817.
- GESSNER M.O., y SCHMITT A.L. «Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentration in plant tissue colonized by fungi». *Applied and Environmental Microbiology* 62 (1996): 415-419.
- GESSNER M.O., BÄRLOCHER F., y CHAUVET E. «Qualitative and quantitative analyses of aquatic hyphomycetes in streams». En Tsui C.K.M., y Hyde K.D., eds. *Freshwater mycology*. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2003: 127-157.
- GESSNER M.O., GULIS V., KUEHN A., CHAUVET E., y SUBERKROPP K. «Fungal decomposers of plant litter in aquatic ecosystems». En C.P. Kubicek, y I.S. Druzhinin, eds. *Environmental and microbial relationships*. 2.ª ed. Berlín: Springer-Verlag, 2007: 301-324.
- GULIS V., MARVANOVA L., y DESCALS E. «An illustrated key to the common temperate species of aquatic hyphomycetes». En M.A.S. Graça, F. Bärlocher, y M.O. Gessner, eds. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*. Dordrecht: Springer, 2005.
- HENDEL B., y MARXSEN J. «Extracellular enzyme activity associated with degradation of beech wood in a central european stream». *International Review Of Hydrobiology* 85 (2000): 95-105.
- INGOLD C.T. *An illustrated guide to aquatic and water-borne hyphomycetes (Fungi imperfecti) with notes on their biology*. Ambleside: Freshwater Biological Association Scientific Publication N.º 30, 1975.
- KARNER M., FUKS D., y HERNDL G. «Bacterial activity along a trophic gradient». *Microbial Ecology* 24 (1992): 243-257.
- KOWALCHUK G.A., DE BRUIJN F.J., HEAD I.M., AKKERMANS A.D., y VAN ES LAS J.D. *Molecular microbial ecology manual*. Nueva York: Springer, 2004.
- LUDWIG W., STRUNK O., WESTRAM R., RICHTER L., MEIER H., YADHUKUMAR, BUCHNER A., LAI T., STEPPI S., JOBB G., FÖRSTER W., BRETTSCHE I., GERBER S., GINHART A.W., GROSS O., GRUMANN S., HERMANN S., JOST R., KÖNIG A., LISS T., LÜSSMANN R., MAY M., NONHOFF B., REICHEL B., STREHLOW R., STAMATAKIS A., STUCKMANN N., VILBIG A., LENKE M., LUDWIG T., BODE A., y SCHLEIFER K.H. «Arb: A software environment for sequence data». *Nucleic Acids Research* 32 (2004): 1363-1371.
- NORLAND S. «The relationships between biomass and volume of bacteria». En P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, y J.J. Cole, eds. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993: 303-307.
- PASCOAL C., y CÁSSIO F. «Linking fungal diversity to the functioning of freshwater ecosystems». En K.R. Sridhar, F. Bärlocher, y K.D. Hyde, eds. *Novel techniques and ideas in mycology*. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2008.
- PASCOAL C., MARVANOVA L., y CÁSSIO F. «Aquatic hyphomycete diversity in streams of North-West Portugal». *Fungal Diversity* 19 (2005): 109-128.
- PORTER K.G., y FEIG Y.S. «The use of dapi for identifying and counting aquatic microflora». *Limnology & Oceanography* 25 (1980): 943-948.
- PUSCH M., FIEBIG D., BRETTAR I., EISENMANN H., ELLIS B.K., KAPLAN L.A., LOCK M.A., NAEGLI M.W., y TRAUNSPURGER W. «The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters». *Freshwater Biology* 40 (1998): 453-495.
- RODRIGUEZ G.G., PHIPPS D., ISHIGURO K., y RIDGWAY H.F. «Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria». *Applied and Environmental Microbiology* 58 (1992): 1801-1808.
- ROMANÍ A.M., FISCHER H., MILLE-LINDBLOM C., y TRANVIK L. «Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: Differential extracellular enzyme activities». *Ecology* 87 (2006): 2559-2569.

- ROMANÍ A.M., y MARXSEN J. «Extracellular enzyme activities in epilithic biofilms of the breitenbach». *Archiv für Hydrobiologie* 155 (2002): 541-555.
- SANTOS-FLORES C.J., y BETANCOURT-LÓPEZ C. «Aquatic and water-borne hyphomycetes (*Deuteromycotina*) in streams of Puerto Rico (including records from other neotropical locations)». *Caribbean Journal of Science, Special Publication 2* (1997): 1-116.
- SMITH E.M., y DEL GIORGIO P.A. «Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities?» *Aquatic Microbial Ecology* 31 (2003): 203-208.
- STAHL P.D., y PARKIN, T.B. «Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass». *Soil Biology and Biochemistry* 28 (1996): 847-855.
- SUBERKROPP K. «Fungal growth, production, and sporulation during leaf decomposition in two streams». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001): 5063-5068.
- ZWART G., CRUMP B.C., KAMST-VAN AGTERVELD M., HAGEN F., y HAN S.K. «Typical freshwater bacteria: An analysis of available 16s rrna gene sequences from plankton of 500 lakes and rivers». *Aquatic Microbial Ecology* 28 (2002): 141-155.