



PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN METAGENÓMICO BACTERIANO DEL LANGOSTINO *Macrobrachium carcinus* L

[PROTOCOL FOR EXTRACTION OF BACTERIAL METAGENOME DNA TO PRAWN *Macrobrachium carcinus* L]

J. Ulises González-de la Cruz¹, H. Delfín-González², Ma. C. de la Cruz-Leyva¹;
R. A. Rojas-Herrera³, M. Zamudio-Maya^{3*}

¹División Académica Multidisciplinaria de los Ríos (DAMR), Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). Km 1 de la carretera Tenosique-Estapilla. Tenosique Tabasco, México. jose.gonzalez@damr.ujat.mx

²Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UADY. Km. 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, AP 4-116, Mérida Yucatán, México. gdelfin@uady.mx

³Campus de Ciencias Exactas e Ingenierías, Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Periférico Norte Kilometro 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburna de Hidalgo Inn, C.P. 97203. Mérida Yucatán, México. Te.: 52(999) 946-0956; Fax. 52(999) 946-0994.

*E-mail_marcela.zamudio@uady.mx

* Corresponding author

RESUMEN

En este trabajo se adecuó un protocolo para la extracción de ADN metagenómico (ADNm_g) bacteriano del sistema digestivo (intestino, estómago y hepatopáncreas) del langostino *Macrobrachium carcinus* L., tomando como referencia la metodología de extracción de ADN bacteriano de suelos y sedimentos (Rojas-Herrera *et al.*, 2008). Esta metodología constaba de lisis enzimática, física, mecánica y química; después de una serie de ensayos se suprimió la lisis enzimática. Sin embargo, el éxito de la extracción del ADN_{mg} fue influenciado principalmente por la preparación de las muestras analizadas; en particular el hepatopáncreas donde fue necesario eliminar la grasa mediante choques térmicos de temperaturas y separación de las fases mediante centrifugación con la muestra congelada. La eficacia del ADN aislado fue verificada mediante la fragmentación por electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE), después de la amplificación con iniciadores universales. En general, se tuvo una baja diversidad (19 filotipos) entre los diferentes órganos analizados de 13.5±1 (intestinos) a 11.7±0.96 (estómagos). Los índices de Shannon-Weaver (2.45), Simpsons (10.88) y equidad (0.972) obtenidos de la digitalización de la imagen del gel, proponen que los filotipos que conforman la microflora del sistema digestivo de *M. carcinus*, se distribuyen irregularmente entre los diferentes órganos analizados.

Palabras claves: *M. carcinus*, ADN metagenómico, diversidad bacteriana, DGGE

SUMMARY

In this work we adapted a protocol for the extraction of metagenomic DNA (ADNm_g) bacteria in the digestive system (intestines, stomach and hepatopancreas) of *Macrobrachium carcinus* L., with reference to the method of extracting bacterial DNA from soils and sediments (Rojas-Herrera *et al.*, 2008). This methodology consisted of enzymatic, physics, mechanics and chemistry after a series of tests was abolished enzymatic lysis. However, the success ADN_{mg} extraction was influenced mainly by the preparation of the samples, in particular the hepatopancreas, where it was necessary to remove the fat by thermal shock temperature and phase separation by centrifugation with the sample frozen. The effectiveness of isolated DNA fragmentation was verified by gel electrophoresis in denaturing gradient (DGGE) after amplification with universal primers. In general, it had a low diversity (19 phylotypes) between the different organs analyzed of 13.5 ± 1 (intestines) to 11.7 ± 0.96 (stomach). The Shannon-Weaver index (2.45), Simpsons (10.88) and equity (0.972) obtained from the digitization of the image of the gel, suggested that the phylotypes that form the gut microflora *M. carcinus*, is distributed unevenly between the different organs analyzed.

Keywords: *M. carcinus*, metagenomic DNA, bacterial diversity, DGGE

INTRODUCCIÓN

Los métodos moleculares de huellas genéticas (T-RFLP, RAPD, DGGE) emergieron como una herramienta biotecnológica, que revolucionó el estudio de la diversidad microbiana en las muestras ambientales (Boon *et al.*, 2002; Lyautey *et al.*, 2005; McIntosh *et al.*, 2008) y alimentarias (Ampe *et al.*, 1999; Ercolini, 2004). Sin embargo, el protocolo de aislamiento del ácido nucleico es uno de los puntos críticos en este tipo de investigaciones (Tang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 1996), debido a la heterogeneidad de las muestras (Giacomazzi *et al.*, 2005; Somerville *et al.*, 1989).

Para eliminar estas interferencias se recurre frecuentemente al uso de *kits* comerciales para la extracción de ADN de cultivo celulares (Brunvold *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2006), rotíferos (Dooms *et al.*, 2007) y sedimentos (Bouchon *et al.*, 1998; Goarant *et al.*, 1999).

En crustáceos también se han utilizado *kits* comerciales basados en lisis celular y precipitación del ADN (Li *et al.*, 2007; Paspasyrou *et al.*, 2005), para estudiar las comunidad bacteriana asociada en su habitad (Durand *et al.*, 2009; Kutako *et al.*, 2007; Payne *et al.*, 2007). No obstante, se ha reportado que el uso de estos *kits* puede sesgar los resultados (Carrigg *et al.*, 2007; Kozdroj y Van Elsas, 2000; Liphay *et al.*, 2004).

Esto ha llevado como se mencionó anteriormente a la necesidad de adecuar y/o diseñar técnicas de extracción de ADN que aseguren el éxito de la PCR y posterior estudios, considerando las características de las muestra (Burke *et al.*, 2009; Somerville *et al.*, 1989), como la de los ambientes desérticos (Bonilla-Rosso *et al.*, 2010), lagos eutróficos (Tang *et al.*, 2009), sedimentos con hidrocarburos (Maciel *et al.*, 2009) y camarones (Paspasyrou *et al.*, 2005).

El langostino de agua dulce o pigua *M. carcinus* es una especie nativa del atlántico y se distribuye desde la Florida hasta Brasil, pasando por América central y las Antillas (Chace y Hobbs, 1969). En México habita en los ríos caudalosos del estado de Tabasco, donde se captura por pesquería artesanal sobreexplotada, debido a su elevado valor comercial. Sin embargo, los estudios realizados en langostinos no reportan datos sobre la existencia de un protocolo de extracción de ADN bacteriano del sistema digestivo de *M. carcinus*. El conocimiento de la comunidad bacteriana en este langostino podría apoyar en el establecimiento de programas de sanidad, adecuados en la detección de agentes patógenos que frecuentemente provocan enfermedades o muerte al organismo en el hábitat. Generará información de apoyo para los estudios de

identificación de cepas benéficas con efecto probiótico; ambos panoramas lograrían aprovecharse en esquemas de cultivo en cautiverio.

Por lo cual, en el presente trabajo se dio a la tarea de adecuar un protocolo de extracción de ADNmg que permita el estudio de la comunidad bacteriana presente en el intestino, estómago y hepatopáncreas de *M. carcinus*, utilizando PCR-DGGE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación de la muestra

Se recolectaron un total de 58 muestras de langostinos de ambos sexos *M. carcinus* L (Figura 1) (NOM-109-SSA1-1994) durante la temporada 2008-2009 en el río Usumacinta, localizado en el municipio de Tenosique de Pino Suárez Tabasco al sur de México, entre los paralelos 17°28.5' de latitud norte y los 91°25.6' de latitud oeste. Las muestras previamente empaquetadas en bolsas de polietileno y congeladas fueron transportadas al laboratorio donde se extrajo el tracto digestivo. Los órganos debidamente identificados como intestino (HIInt ó MIInt), estómago (HEst ó MEst) y hepatopáncreas HHep ó MHep se almacenaron en condiciones estériles en solución salina al 2% a -20° C, hasta su uso. La letra H ó M que precede estas siglas corresponden al sexo hembra o macho del organismo muestreado.

Preparación de la muestra

Las muestras de intestino (0.3-0.1 g según el tamaño del langostino), estómago (1 g) y hepatopáncreas (1 g) se resuspendieron en 1 ml de amortiguador TEN (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0). En el caso del hepatopáncreas fue necesario eliminar los altos contenidos de grasa: 1 g de muestra se macero y agitó vigorosamente, se incubó a 65° C por 10 min y se centrifugó a 10,000 xg por 10 min a 40° C; se en fría a -10° C por 10 min. Nuevamente, se centrifugó a 10,000 xg por 10 min a 4° C. Al final se formaron 3 fases, una sólida con alto contenido de grasa en la parte superior, una líquida y la pastilla; se recuperó 1ml de la fase acuosa inferior y la pastilla para la extracción del ADNmg.

Extracción de ADN

El aislamiento del ADNmg bacteriano del sistema digestivo (intestino, estómago y hepatopáncreas) de *M. carcinus*, se obtuvo con el protocolo de Rojas-Herrera *et al.* (2008) eliminando la etapa de lisis enzimática del proceso de extracción.

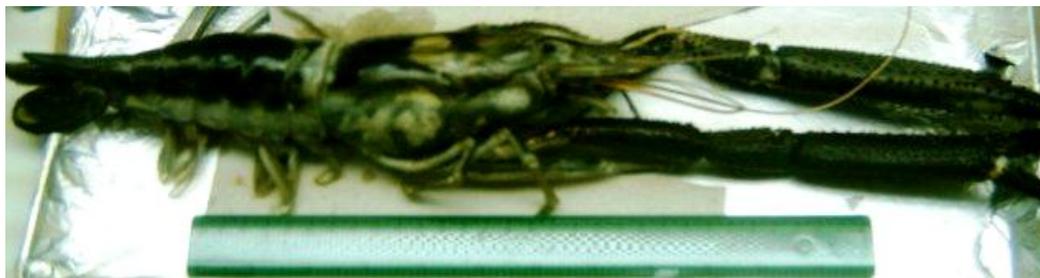


Figura 1. Langostino macho adulto, *M. carcinus* capturado en la cuenca alta del río Usumacinta, ubicado en el municipio de Tenosique Tabasco, México.

Las muestras se sometieron a un choque térmico a -10°C por 15 min y 5 min a 65°C (se repitió tres veces). Posteriormente, se adicionó 1ml de SDS al 20% (p/v), se incubó 30 min a 30°C y se centrifugó a $10\ 000\ \text{xg}$ 20 min a 30°C . Se adicionó 500 μl de acetato de potasio 5 M y se incubó a 65°C por 5 min y 15 min en baño de hielo-alcohol a -10°C . Se centrifugó a $16\ 000\ \text{xg}$ por 30 min a 4°C . Al sobrenadante se agregó 200 μl de óxido de silicio (SiO_2) y se centrifugó a $16\ 000\ \text{xg}$ por 3 min a 25°C . La pastilla se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% (v/v), se centrifugando cada vez con las condiciones antes citadas. Se adicionó 50 μl de agua destilada estéril a la pastilla, se resuspendió por incubación en un baño a 55°C por 5 min y se centrifugó a $16\ 000\ \text{xg}$, 5 min. El ADN extraído se conservó a -20°C para análisis posteriores.

La verificación del ADN se realizó en gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio (0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$); se inyectó en el pozo del gel, la muestra de ADN junto con solución acarreadora en relación 1:1. Se utilizó un marcador molecular (*Lambda* Him III Lader) de referencia. La electroforesis se corrió con amortiguador TAE (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0) por 3 h a 60 V. El gel se observó en un transiluminador UV y la imagen se almacenó en un equipo foto-documentador (Gel Doc XR system (BioRad), utilizando el programa *Quantity One* (BioRad imaging systems).

Amplificación del ADN

Se amplificó la región V3 del gen ARNr 16S utilizando los iniciadores gc338f (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGCTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') (Lane, 1991) y 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). La secuencia subrayada en el iniciador gc338f corresponde a la grapa GC (Muyzer *et al.*, 1993).

La mezcla de reacción contenía: 100 ng de ADN de la muestra, 2.5 μl de amortiguador (NH₄) 1X, 0.2 mM de la mezcla de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad Ca.), 0.2 mM de cada iniciador, 4 mM de MgCl_2 (Promega),

0.1% de albúmina de suero bovina (BSA) y 1U de *Taq* polimerasa DNA (InvitrogenTM).

La amplificación térmica de PCR inició con la desnaturalización a 94°C por 5 min (1 ciclo), un "Touchdown" utilizando 10°C por encima de la temperatura de alineación (65°C) esta temperatura fue decreciendo 1°C por minuto hasta llegar a 55°C y de ahí, se aumentó a 72°C por un minuto (10 ciclos). Nuevamente, se desnaturalizó a 94°C por 1 min, se alineó a 55°C por 1 min, la extensión se sintetizó a 72°C por 1 min (20 ciclos) y una extensión final a esta temperatura por 10 min.

La verificación de los amplicones se realizó en gel de agarosa al 1.5% (p/v) siguiendo las condiciones antes descritas a excepción del amortiguador de corrida de la electroforesis, ya que en este caso se utilizó Tris borato-EDTA (TBE) 0.5 X.

DGGE.

La separación de los amplicones se llevó a cabo por DGGE en un equipo DcodeTM *Universal Mutation Detection System* (BioRad), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los amplicones de 200 pb se separaron en un gel de poliácridamida al 8% (p/v) con un gradiente desnaturalizante de 30 a 60% de urea-formamida (100% corresponde a 7 M urea y un 40% de formamida (v/v). El volumen de carga fue 100 μl de amplicón a 1000 ng en una relación 1:1 (producto de PCR:amortiguador de carga). La electroforesis se corrió en amortiguador TAE 1X a 60 V por 22 h a 60°C (Muyzer *et al.*, 1993).

El gel se teñió en solución de SYBR GOLD (InvitrogenTM, Eugene Oregon USA) 0.5X (5 $\mu\text{l}/100\ \text{ml}$ de amortiguador TAE 1X) por 45 min y se observaron en un transiluminador UV. La imagen se almacenó en un foto-documentador Gel Doc XR system (BioRad), utilizando el programa antes mencionado.

Se cortaron las bandas únicas de los patrones de bandeado resultantes, mismas que se eluyeron en agua

estéril bidestilada por 24 h a 4° C. El ADN eluido se reamplificó por PCR bajo las condiciones mencionadas anteriormente, a excepción de que el BSA se excluye y se baja la concentración del MgCl₂ a 2.5 mM.

Digitalización de la imagen del DGGE

Utilizando el programa *Quantity One* (BioRad *imaging systems*) se realizó el análisis de la imagen, para detectar la intensidad relativa de los perfiles de bandeo generados y así, conseguir la curva densitométrica en base a la intensidad relativa del área de los picos de las bandas. Con la presencia (1) o ausencia (0) de la banda a través de los patrones de bandeos se generó una matriz binaria para obtener un dendograma de similitud, utilizando el método Euclidiano del vecino más cercano de las muestras analizadas con el programa estadístico computacional *Statgraphics Plus 3.0*.

Con los valores arrojados de las intensidades relativas del pico de las bandas a través de los perfiles de bandeo de DGGE, se determinaron los índices de diversidad de especies, índice de Shannon-Weaver, Simpson y homogeneidad (Magurran, 1998) basados en la taxonomía numérica (Sokal y Siseath, 1963), utilizando el programa *Species Diversity & Richness 3.02*© (PISCES *Conservation Ltd* 2002, *IRC House*, Pebandasnnington, Lymington, S041 8GN, UK. (www.pisces.conservation.com/)).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ausencia de protocolos de extracción de ADN metagenómico (ADNm_g) bacteriano estandarizados según las características físicas (estructura de la pared celular), químicas y biológicas (adherencia de los microorganismo) de las muestras alimentaria (Giacomazzi *et al.*, 2005) y ambientales, limita el conocimiento de la diversidad microbiana (Tang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 1996).

Lo cual se comprobó en este trabajo, donde utilizando la metodología de extracción de ADN bacteriano de suelos y sedimentos, únicamente se aisló fragmentaciones de ADN degradado a partir del intestino y estómago del langostino *M. carcinus* (datos no mostrados). En el caso del hepatopáncreas no se obtuvieron resultados; lo anterior puede inferir la presencia de posibles inhibidores en las muestras analizadas y que podría restringir la recuperación del ADN (Rojas-Herrera *et al.*, 2008).

En los órganos del sistema digestivos de langostino (*M. rosenbergii*) se encuentran sales de sodio, cloro, calcio, carbohidratos complejos, ácidos biliares y grasos (Ahearn, 1978). Tratar previamente las muestras forma parte de la adaptación de distintos

métodos de extracción, ya que facilita la extracción del ADN (Bouchon *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2009). Por lo que, en esta investigación se plantearon dos modificaciones primordiales a la metodología utilizada.

La primera, en la preparación de las muestras donde no se dieron lavados (la metodología original sugiere tres lavados), únicamente se resuspendieron las muestras de intestino y estómago antes de la extracción. Sin embargo, en el hepatopáncreas que contiene una gran cantidad de triglicéridos y fosfolípidos (Muriana *et al.*, 1993) fue necesario una maceración vigorosa para relajar los ácidos grasos, seguido de una incubación (65° C por 10 min) y una centrifugación (10,000 xg por 10 min a 40° C); con el propósito de romper y separar estas cadenas saturadas. La muestra se congeló (-10° C por 10 min) y se centrifugó (10,000 xg por 10 min a 4° C). Al final, se obtuvo una fase grasa, acuosa y pastilla recuperando estas dos últimas, para la posterior extracción del ADN metagenómico.

La segunda modificación fue directamente en el proceso de extracción, al suprimir la lisis enzimática, pues el sistema digestivo contiene naturalmente una importante carga de enzimas líticas que apoyan en el proceso digestivo (Sriket *et al.*, 2010).

A sí que, con el protocolo modificado se logró la extracción de ADN_mg de alto peso molecular del sistema digestivo de langostinos de agua dulce *M. carcinus* hembras y machos; después del tratamiento al que fueron sometidas las muestras y a la exclusión de la lisis enzimática en el proceso de aislamiento (Figura 2a).

Los ADN_mg extraídos registraron una concentración de 0.87, 0.81 y 0.68 mg/g de estómago, hepatopáncreas e intestino respectivamente. Se considera que los resultados de absorbancia se encontraron entre el rango de calidad confiable de 0.1 a 1.0 (Glasel, 1995), no siendo necesario realizar una purificación previa a la amplificación del gen ARNr 16S por PCR (Figura 2b).

PCR-DGGE e índices de diversidad.

La eficacia del protocolo propuesto para el estudio de la flora bacteriana del sistema digestivo de langostino se corroboró por DGGE al detectar un perfil de 19 bandas o filotipos (Figura 3).

El dendograma de vecino más cercano agrupó los patrones de bandeo obtenidos en tres clados hermanos interrelacionados, registrando una distancia euclidiana máxima de 1,6.

El clado 2 (*Grup 2*) concentro el 58.3 % de las muestras que exhibieron menor número de bandas (2 a

4 filotipos): H2Int, H1Est, H2Est, M1Est, M1Hep, M2Hep, M1Int. Por otro lado, el primer (*Grup 1*: H1Hep, H1Int, M2Est) y tercer clado (*Grup 3*: M2Int, H2Hep), agrupo las muestras que registraron el mayor numero de filotipos (6 a 9 bandas), que representan la comunidad bacteriana en la muestra analizada.

Las diferencias observadas respecto a la presencia/ausencia de bandas entre los perfiles de bandeado, pueden deberse a presiones ambientales o de diferencias fisiológicas de los individuos y composición de la matriz analizada; lo cual, influye en la microflora (Gamboa-Delgado *et al.*, 2003; Kevin y Fred, 1997; Little y Ebert, 2000; Mathew *et al.*, 2010; Sarathi *et al.*, 2007).

Por ejemplo, en peces se ha mencionado que la mayor diversidad y riqueza de especies bacterianas se encuentran en el intestino (Chace y Hobbs, 1969; Dall, 1967). En este estudio no se tuvo este patrón, pues en el intestino de langostino se registró variabilidad: muestras con mayores (H1Int, M2Int) y menores filotipos (H2Int, M1Int).

Tubiash *et al.* (1975) mencionaron que en la hemolinfa de los cangrejos machos existe una población bacteriana mayor que en las hembras. En este estudio no se presentó este comportamiento.

Hay una diversidad de factores que pueden influir en la composición microbiana; la disponibilidad de nutrientes en el medio y las enzimas extracelulares secretadas por las propias bacterias, juegan un papel importante en la asimilación de nutrientes en el sistema digestivo de los hospederos, lo cual influye en la modificación de la microflora original (Venkat *et al.*, 2004).

Lo anterior podría justificar la escasa presencia de filotipos en las muestras de langostinos machos,

independiente del órgano analizado (M1Est, M1Hep, M2Hep, M1Int).

Otros estudios han demostrado que existe una relación simbiótica con la flora bacteriana presente en los camarones, lo que sugiere que las hembras tienen necesidades nutricionales distintas, principalmente relacionadas con aspectos reproductivos y hormonales, que pueden influir en la comunidad bacteriana (Kevin y Fred, 1997; Little y Ebert, 2000).

En general, aunque los patrones de DGGE obtenidos de los órganos digestivos no exhibieron cambios notables tanto en el número como en la distribución de las bandas, el menor número de filotipos se encontró en las muestras de hepatopáncreas y se corroboró con los parámetros ecológicos estudiados.

La diversidad de los filotipos detectados se estimó con los valores de la intensidad de los picos de las bandas en los perfiles de bandeado. La diversidad beta (β) del sistema digestivo de la pigua registró un índice de Shannon-Weaver (H), Simpson (D) y equidad de 2.45, 10.88 y 0.972 respectivamente (Tabla 1).

Sin embargo, la diversidad alfa (α) infiere una mayor y menor riqueza de filotipos en intestino (13.5) y estómago (11.75). En todos los casos el intestino y hepatopáncreas fueron los que registraron los índices de H (2.54 y 2.41 respectivamente), D (12.10 y 10.58 respectivamente) y equidad más altos (0.976 y 0.973 respectivamente).

Los parámetro de diversidad analizados manifiestan que el estómago, es el órgano del sistema de la pigua menos abundante, menor distribuido y con la más baja diversidad.

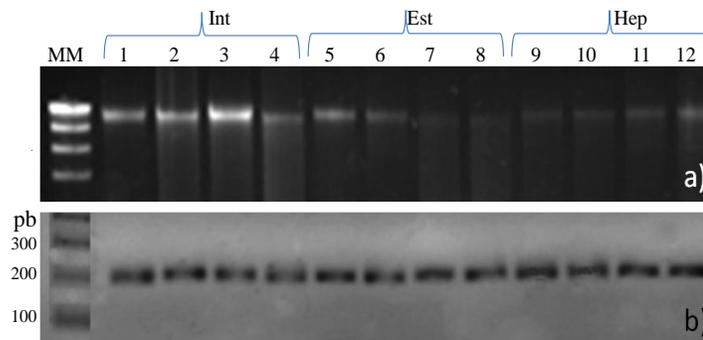


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) del ADNmg bacteriano (a) del intestino (carriles 1, 2, 3 y 4: F1Int, M1Int, F2Int y M1Int respectivamente), estómago (carriles 5, 6, 7 y 8: F1Est, M1Est, F2Est y M2Est respectivamente) y hepatopáncreas (carriles 9, 10, 11 y 12: F1Hep, M1Hep, F2Hep y M2Hep respectivamente) de *M. carcinus*. En el panel inferior sus respectivos productos de PCR (b). MM: marcador molecular.

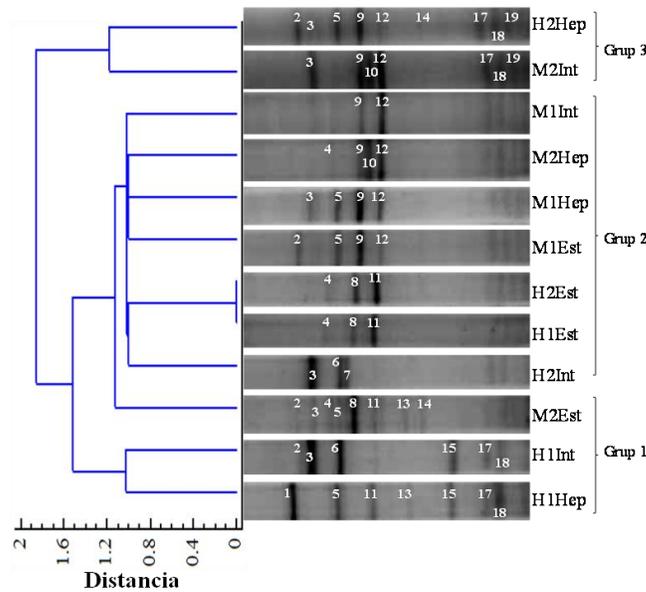


Figura 3. Dendrograma de distancia euclidiana generado con el método del vecino más cercano, utilizando una matriz binaria de presencia o ausencia de bandas en los perfiles de bandeo del DGGE obtenido del ADNmg bacteriano de intestino (Int), estómago (Est) y hepatopáncreas (Hep) de *M. carcinus* hembras (H1, H2) y machos (M1, M2). Los números en los perfiles indican el filotipo identificado (1 a 19).

Tabla 1. Índices de diversidad estimados de los patrones de bandeos generados por DGGE, a partir de amplicones de ADNmg bacterianos del sistema digestivo de pigua.

Órgano	Riqueza	H	Simpsons	Equidad
Int	13.5±1	2.54±0.08	12.1±0.98	0.976±0.004
Est	11.7±0.96	2.37±0.08	9.95±0.88	0.966±0.007
Hep	12±0.82	2.42±0.09	10.5±1	0.973±0.009
	19	2.45	10.88	0.972

De la Cruz-Leyva (2010) menciona que en ecología microbiana se ha investigado la diversidad bacteriana en diferentes ambientes (sedimentos marinos, lagunas, aguas residuales, costeras y subterráneas, ostras) y recursos pesqueros, comparando patrones de bandeo con técnicas de huellas genéticas (T-RFLP, RFLP, DGGE) para estimar la riqueza y composición de la comunidad (Boon *et al.*, 2002; Cho y Kim, 2000; Danovaro *et al.*, 2006; Villanueva *et al.*, 2007; La Valley *et al.*, 2009; Ramette, 2009). Sin embargo, los resultados generados de estas investigaciones presentan grandes discrepancias, por un lado, esto puede deberse a la estrategia metodológica utilizadas en el estudio (Anderson y Cairney, 2004) y por el otro, a la población que se estudia (bacterias). Las bacterias en general se adaptan y proliferan con tasas de crecimientos aceleradas e influenciadas con las condiciones ambientales expuestas. No obstante, lo más preocupante es la pericia (la detección y ajuste del contorno de la banda) y fundamentos (ecología poblacional) del investigador, que genera y describe estos resultados (de la Cruz-Leyva, 2010).

La adecuación del protocolo propuesto en esta investigación, resultó ser eficaz para la extracción de ADNmg bacteriano del sistema digestivo del langostino de agua dulce *M. carcinus*.

Teniendo en cuenta que los métodos de extracción no solo deben producir un ADN íntegro y de alto peso molecular, sino también contrarrestar los inhibidores de la PCR que aseguren el éxito del estudio de la comunidad bacteriana en la muestra de interés.

CONCLUSIONES

Los resultados demostraron la complejidad de la muestra del sistema digestivo de *M. carcinus* y comprobaron la efectividad de este protocolo para el aislamiento de ADNmg bacteriano, al detectar 19 filotipos durante el análisis del DGGE. Enfatizando la importancia que tiene el tratamiento de la muestra, para asegurar el éxito del protocolo de extracción. Por lo que se propone este protocolo en futuros estudios de la comunidad bacteriana asociada al sistema digestivo de este langostino.

REFERENCIAS

- Ahearn, G.A. 1978. Allosteric cotransport of sodium, chloride and calcium by the intestine of freshwater prawns. *Journal of Membrane Biology*. 42:281-300.
- Ampe, F., Ben, O.N., Moizan, C., Wachter, C., Guy, J-P. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:5464-5473.
- Anderson, I.C., Cairney, J.W.G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*. 6:769-779.
- Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., Top, E.M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rDNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 39:101-112.
- Bonilla-Rosso, G., Sousa, V., Eguiarte, L.E. 2008. Metagenómica, genómica y ecología molecular: La nueva ecología en el Bicentenario de Darwin. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 11: 41-51.
- Bouchon, D., Thierry, R., Pierre, J. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 265:1081-1090.
- Brunvold, L., Sandaa, R.A., Mikkelsen, H., Welde, E., Bleie, H., Bergh, I. 2007. Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture*. 272:319-327.
- Burke, C., Kjelleberg, S., Thomas, T. 2009. Selective Extraction of Bacterial DNA from the Surfaces of Macroalgae. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:252-256.
- Chace, F.A., Hobbs, J.R. 1969. The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of the West Indies with special reference to Dominica. *Bulletin US National Museum*. 292:1-258.
- Cho, J-C., Kim, S-J. 2000. Increase in Bacterial Community Diversity in Subsurface Aquifers Receiving Livestock Wastewater Input. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:956-965.
- Carrigg, C., Rice, O., Kavanagh, S., Collins, G., O'Flaherty, V. 2007. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77:955-964.
- Dall, W. 1967. The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae* Racek & Dall (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): *Australian Journal of Zoology*. 15:699-714.
- Danovaro, R., Luna, G.M., Dell'Anno, A., Pietrangeli, B. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:5982-5989.
- de la Cruz-Leyva, M.C. 2010. Estudio de la comunidad bacteriana asociada al pulpo mediante técnicas moleculares. Universidad Autónoma de Yucatán, CCBA. pp: 101-102.
- Dooms, S., Papakostas, S., Hoffman, S., Delbare, D., Dierckens, K., Triantafyllidis, A., De Wolf, T., Vadstein, O., Abatzopoulos, T.J., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2007. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) as a tool for the characterisation of *Brachionus* sp. strains: *Aquaculture*. 262:29-40.
- Durand, L., Zbinden, M., Cuff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E.G., Shillito, B., Cambon-Bonavita, M-A. 2009. Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *Fems Microbiology Ecology*. 71:291-303.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 56:297-314.
- Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C., Cahu, C. 2003. Digestive enzyme activity and food

- ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research*. 34:1403-1411.
- Glasel, J.A. 1995. Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios. *Biotechniques*. 18:62-63.
- Giacomazzi, S., F. Leroi, J-J Joffraud. 2005. Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied Microbiology*. 98:1230-1238.
- Goarant, C., Merien, F., Berthe, F., Mermoud, I., Perolat, P. 1999. Arbitrarily Primed PCR To Type *Vibrio* spp. Pathogenic for Shrimp. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1145-1151.
- Kevin, R.C., Fred, C.D. 1997. Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. *Microscopy Research and Technique*. 37: 116-135.
- Kozdroj, J., Van Elsas, J.D. 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:1405-1417.
- Kutako, M., Limpiyakorn, T., Luepromchai, E., Powtongsook, S., Menasveta, P. 2007. Inorganic Nitrogen Conversion and Changes of Bacterial Community in Sediment from Shrimp Pond after Methanol Addition. *Journal of Applied Sciences*. 9:2907-2915.
- Lane, D.J. 1991., 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. D. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, United Kingdom.
- La Valley, K.J., Jones, S., Gomez-Chiarri, M., Dealteris, J., Rice, M. 2009. Bacterial Community Profiling of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Comparison of Culture-Dependent and Culture-Independent Outcomes. *Journal of Shellfish Research*. 28:827-835.
- Li, P., Burr, G., Gatlin, D.M., Hume III, M.E., Patnaik, S., Castille, F.L., Lawrence, A.L. 2007. Dietary Supplementation of Short-Chain Fructooligosaccharides Influences Gastrointestinal Microbiota Composition and Immunity Characteristics of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Cultured in a Recirculating System. *Journal of Nutrition*. 137:2763-2768.
- Lipthay, J.R., Johnsen, K., Albrechtsen, H-J., Rosenberg, P., Aamand, J. 2004. Bacterial diversity and community structure of a sub-surface aquifer exposed to realistic low herbicide concentrations. *Fems Microbiology Ecology*. 49:59-69.
- Little, T.J., Ebert, D. 2000. Sex, linkage disequilibrium and patterns of parasitism in three species of cyclically parthenogenetic *Daphnia* (Cladocera: Crustacea): *Heredity*. 85:257-265.
- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J-L., Garabetian, F. 2005. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research*. 39:380-388.
- Maciel, B.M., Santos, A.C.F., Dias, J.C.T., Vidal, R.O., Gross, E., Cascardo, J.C.M., Rezende, R.P. 2009. Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. *Genetic and Molecular Research*. 1:375-388.
- McIntosh, D., Ji, B., Forward, B.F., Puvanendran, V., Boyce, D., Ritchie, R. 2008. Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture*. 275:42-50.
- Mathew, S., Ashok, K.K.N., Rangasamy, A., Pullanniyil, G.N.V.N., Koodenchery D. 2010. Biochemical studies on changes associated with enzymes of glucose metabolism in white spot syndrome virus (WSSV) infected with *Penaeus monodon* (Fabricius). *African Journal of Biotechnology*. 6:1944-1948.
- Muriana, F.J., Ruiz-Gutiérrez, V., Bolufer, J. 1993. Phospholipid fatty acid composition of hepatopancreas and muscle from prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Biochemistry*. 114:404-407.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.

- Applied and Environmental Microbiology. 59:695-700.
- NOM-109-SSA1. 1994. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para análisis microbiológicos. Normas Oficial Mexicana, Secretaría de Salud Pública. Dirección General de Normas, pp. 1-9.
- Papaspyrou, S., Gregersen, T., Cox, R.P., Thessalou-Lekaki, M., Kristensen, E. 2005. Sediment properties and bacterial community in burrows of the ghost shrimp *Pestarella tyrrhena* (Decapoda: Thalassinidea). Aquatic Microbial Ecology. 38: 181-190.
- Payne, M.S., Hall, M.R., Sly, L., Bourne, D.G. 2007. Microbial Diversity within Early-Stage Cultured *Panulirus ornatus* Phyllosomas: Applied and Environmental Microbiology. 73:1940-1951.
- Ramette, A. 2009. Quantitative Community Fingerprinting Methods for Estimating the Abundance of Operational Taxonomic Units in Natural Microbial Communities. Applied and Environmental Microbiology. 75:2495-2505.
- Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., Mena-Martínez, M.E. 2008. A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. Mol Biotechnol. 40:13-17.
- Sarathi, M., Ahmed, V.P.I., Venkatesan, C., Balasubramanian, G., Prabavathy, J., Hameed, A.S.S. 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. Aquaculture. 271:8-20.
- Sriket, C., Benjakul, S., Visessanguan, W. 2010. Characterisation of proteolytic enzymes from muscle and hepatopancreas of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). DOI:10.1002/jsfa.4145.
- Somerville, C.C., Knight, I.T., Straube, W.L., Colwell, R.R. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. Applied and Environmental Microbiology. 55:548-554.
- Tang, W., David, F.B., Wilson, M.M., Barwick, B.G., Leyland-Jones, B.R., Bouzyk, M. M. 2009. DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. Cold Spring Harbor Protocols. DOI:10.1101/pdb.prot5138.
- Tubiash, H.S., Sizemore R.K., Colwell, R.R. 1975. Bacterial Flora of the Hemolymph of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*: Most Probable Numbers. Applied and Environmental Microbiology. 29:388-392.
- Villanueva, L., Navarrete, A., Urmeneta, J., White, D.C., Guerrero, R. 2007. Analysis of diurnal and vertical microbial diversity of a hypersaline microbial mat. Archives of Microbiology. 188:137-146.
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology. 62:316-322.

Submitted December 17, 2010– Accepted January 31, 2011
Revised received June 08, 2011