



## Tema 5. Cuantificación de la actividad microbiana.

---

- Introducción
- Métodos de medida de la actividad microbiana
  - Actividades generales
  - Actividades específicas
  - Medidas relacionadas con el crecimiento
- Métodos de medida de la actividad depredadora
- Mortalidad bacteriana



## Enfoque del estudio de actividades.

---

- Actividad a nivel de población.
  - Actividad atribuible al conjunto de la población
  - P.e. Producción de CO<sub>2</sub>
- Actividad a nivel celular o individual.
  - Porcentaje o número de células que manifiestan determinada actividad
  - P.e. Porcentaje (o número) de células que respiran



## Enfoque del estudio de actividades.

---

➤ Actividad real.

Las condiciones preexistentes no se modifican durante el ensayo

➤ Actividad potencial.

La determinación de la actividad implica modificación de una o varias de las condiciones preexistentes

Concentración de nutrientes

Temperatura de incubación

Eliminación de poblaciones

Sustrato no habitual

Efecto botella



## Enfoque del estudio de actividades.

---

➤ Actividades específicas. Actividades concretas.

Hidrólisis de macromoléculas

Cuantificación de la actividad enzimática

➤ Actividades no específicas.

Actividad heterótrofa

Transporte de electrones

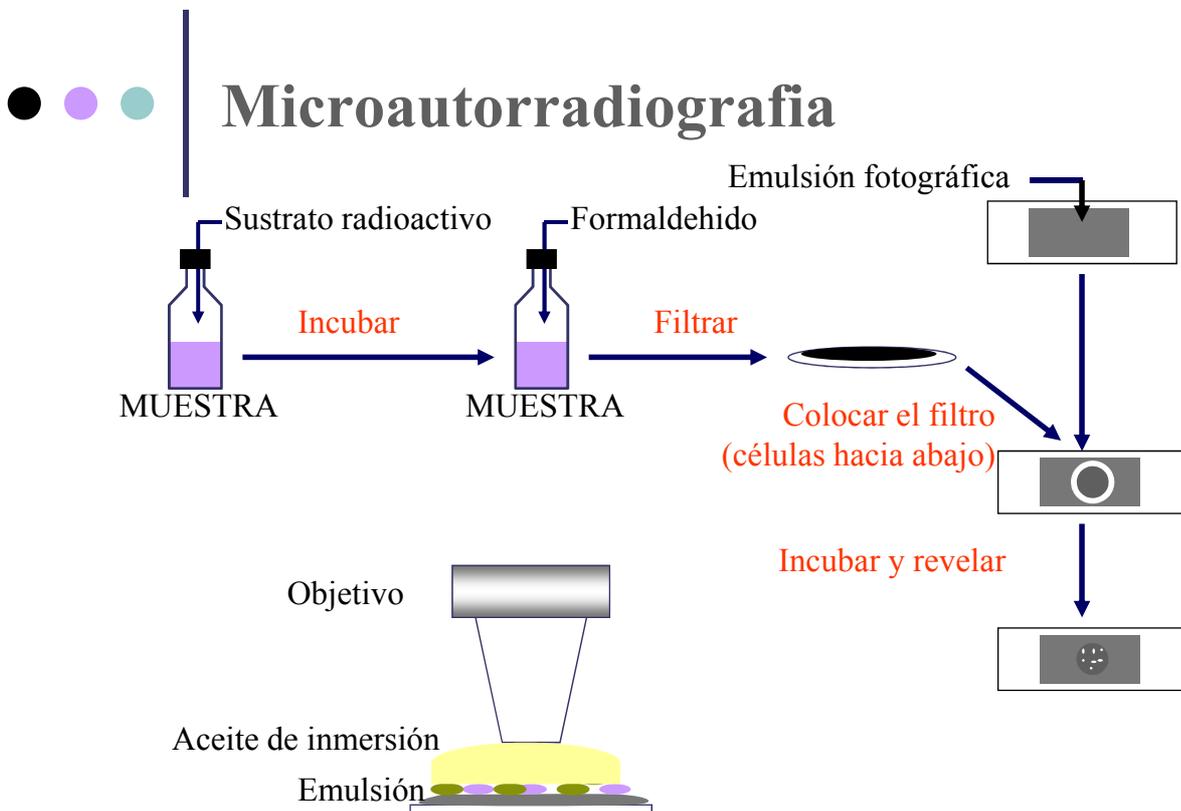
➤ Resultado global de la actividad.

Velocidad de crecimiento

Velocidad de eliminación

# Técnicas de cuantificación de actividad.

- Pool de adenilato y carga energética.
- Toma de sustratos.
  - Microautorradiografía
  - Potencial autótrofo
  - Potencial heterótrofo
- Integridad de la membrana celular
- Actividad de cadena de transporte de electrones.
- Actividad de enzimas específicos.
- Actividades relacionadas con el crecimiento.
  - Aumento del número de microorganismos
  - Recuento de microcolonias
  - Frecuencia de células en división
  - Bacterias con capacidad de elongación
  - Velocidad de síntesis de ADN. Incorporación de timidina- $H^3$
- Estimación de predación sobre bacterias.

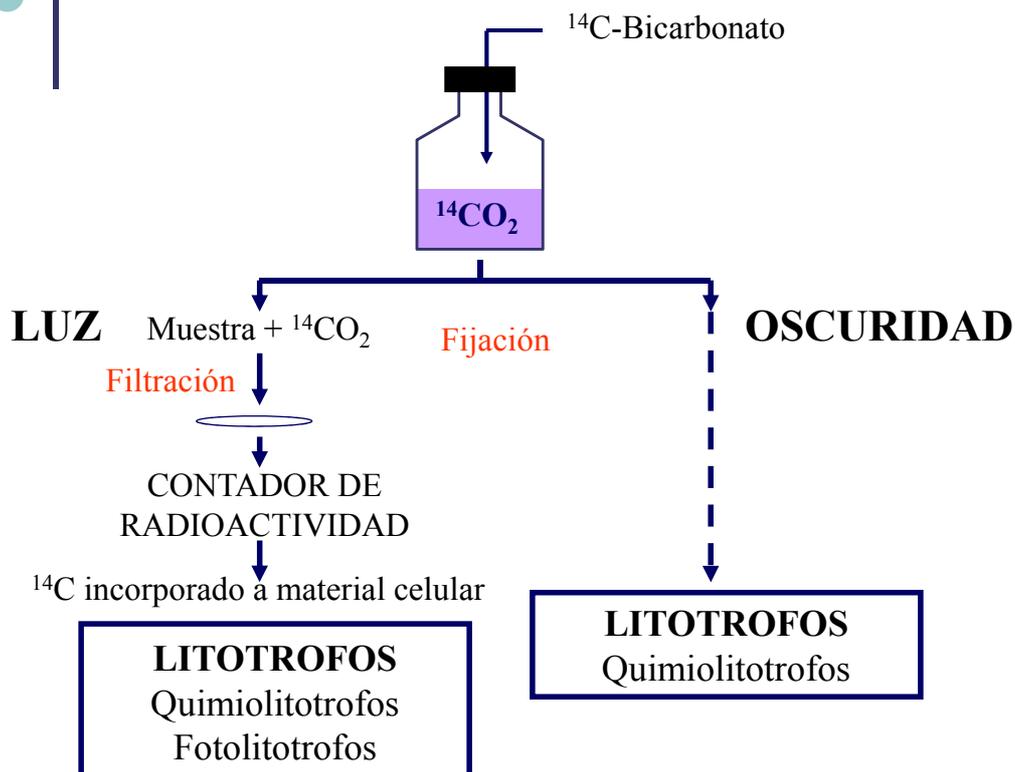


# Potencial autotrófico.

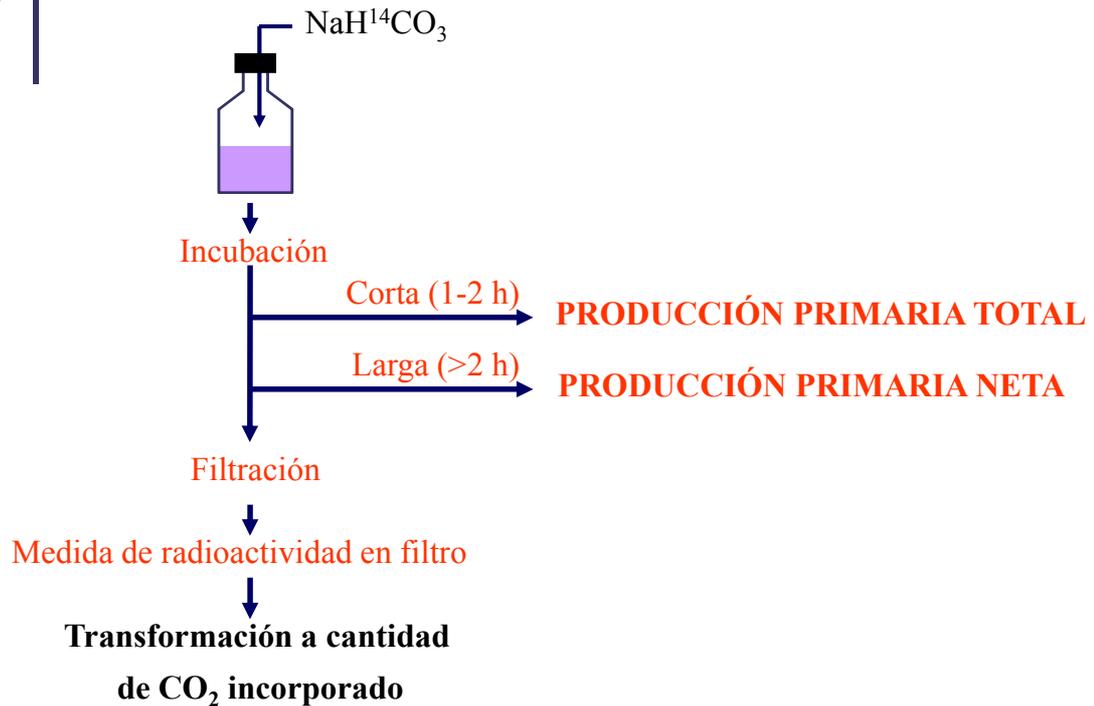
- Incorporación de  $\text{CO}_2$  autotrófica y heterotrófica. Incubación con  $\text{C}^{14}\text{-CO}_2$
- Previo al estudio:
  - Descartar asimilación no bacteriana de  $\text{CO}_2$ . **Fraccionamiento de la muestra.**
  - Diferenciar incorporación debida a bacterias autotrofas y Cianobacterias de la incorporación debida a bacterias no fotótrofas. **Incubar en paralelo en oscuridad y con iluminación.**

$$[\text{CO}_2]_{\text{inc Luz}} - [\text{CO}_2]_{\text{inc Osc}} = [\text{CO}_2]_{\text{inc Luz Autotróficamente}}$$

## Actividad primaria



## Actividad primaria



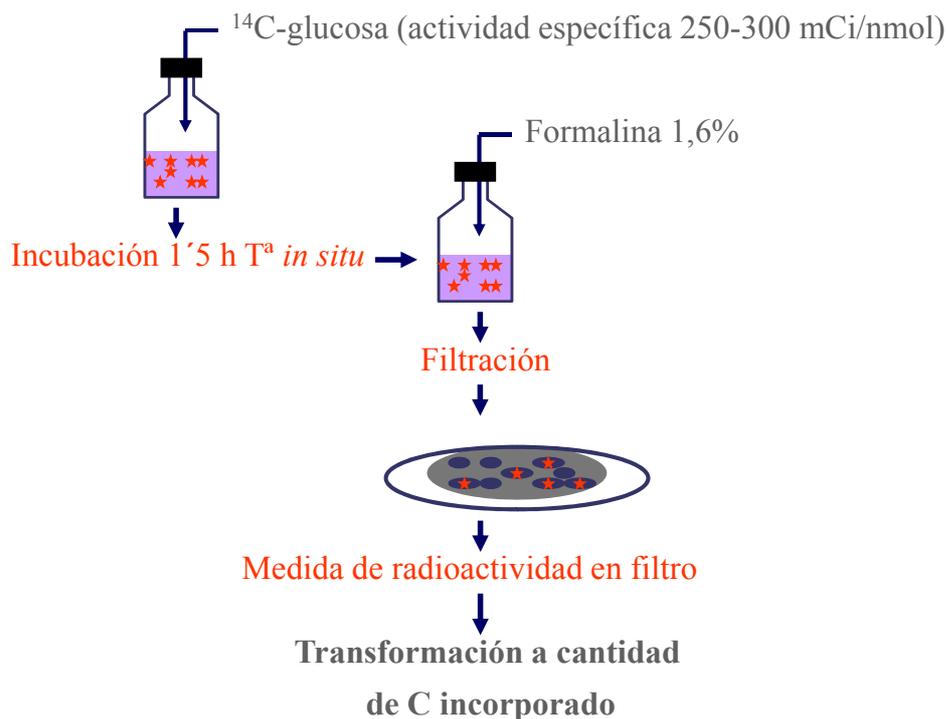
## Actividad potencial heterotrofa.

- Medir las velocidades de toma de sustratos marcados
- Incorporación de compuestos de bajo Pm
- Concentraciones saturantes de sustrato
- Elección de sustratos (no *naturales*)

## Actividad potencial heterotrofa. Incorporación de glucosa.

- Sustrato universal.  
En todos los sistemas naturales se encuentra pero en baja concentración.
- Concentración añadida baja + tiempo de incubación corto = actividad bacteriana.
- Medida relativa, ¿otros sustratos?

## Actividad potencial heterotrofa



## Actividad potencial heterotrofa. Fórmula de Parsons y Strickland.

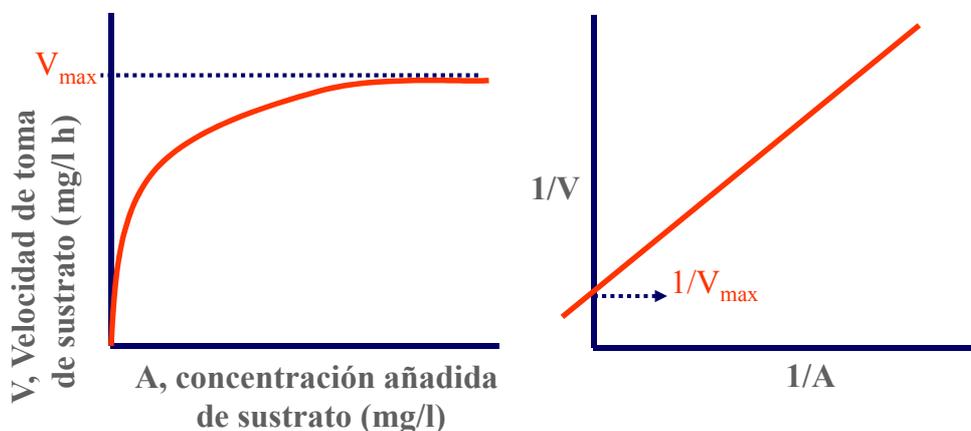
---

$$V = \frac{c f (S_n + A)}{C n t}$$

- $V$  = velocidad de toma del sustrato (mg/l h).
- $c$  = radioactividad del filtro (dpm).
- $f$  = factor de corrección por si existe toma discriminada de un isótopo dado (suponemos  $f = 1$ ).
- $S_n$  = concentración *natural* del sustrato (mg/l).
- $A$  = concentración añadida del sustrato (mg/l).
- $C$  = desintegraciones por minuto (dpm) que produce 1  $\mu$ Curio de  $^{14}\text{C}$ . Es constante.
- $n$  = número de  $\mu$ Curios añadidos en  $A$ .
- $t$  = tiempo de incubación (h).

## Actividad potencial heterotrofa.

---





## Actividad potencial heterotrofa. Incorporación de glucosa.

---

- $V_{\max}$  = Velocidad máxima de toma de sustrato a concentraciones saturantes  
**Potencial heterótrofo de la población bacteriana del sistema**
- Sensible a cambios ambientales
- Gran valor para comparar diferencias estacionales y espaciales
- Supone que todos los miembros de la población responden de la misma manera



## Actividad potencial heterotrofa. Incorporación de glucosa.

---

- $V_t$  = Afinidad por el sustrato ( $K_m$ ,  $K_s$ )
- $T_t$  = Tiempo requerido por la población heterotrofa estudiada para tomar una cantidad de sustrato igual a la concentración de sustrato existente en la muestra.  
Tiempo de recambio.
- $V_{\max}/\text{Densidad}$  = Actividad heterótrofa específica (mg/bacteria h). Aproximación a actividad celular.

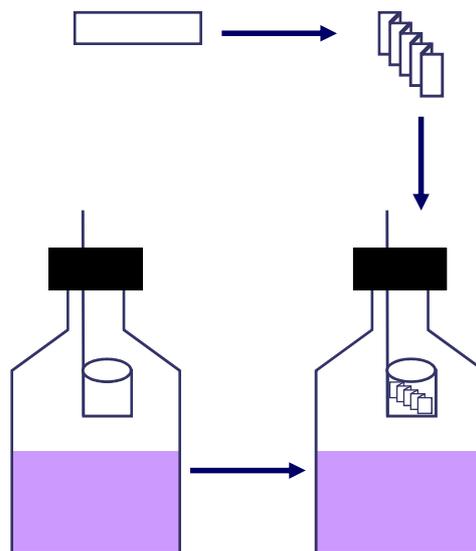
## Actividad potencial heterotrofa. Incorporación de glucosa.

---

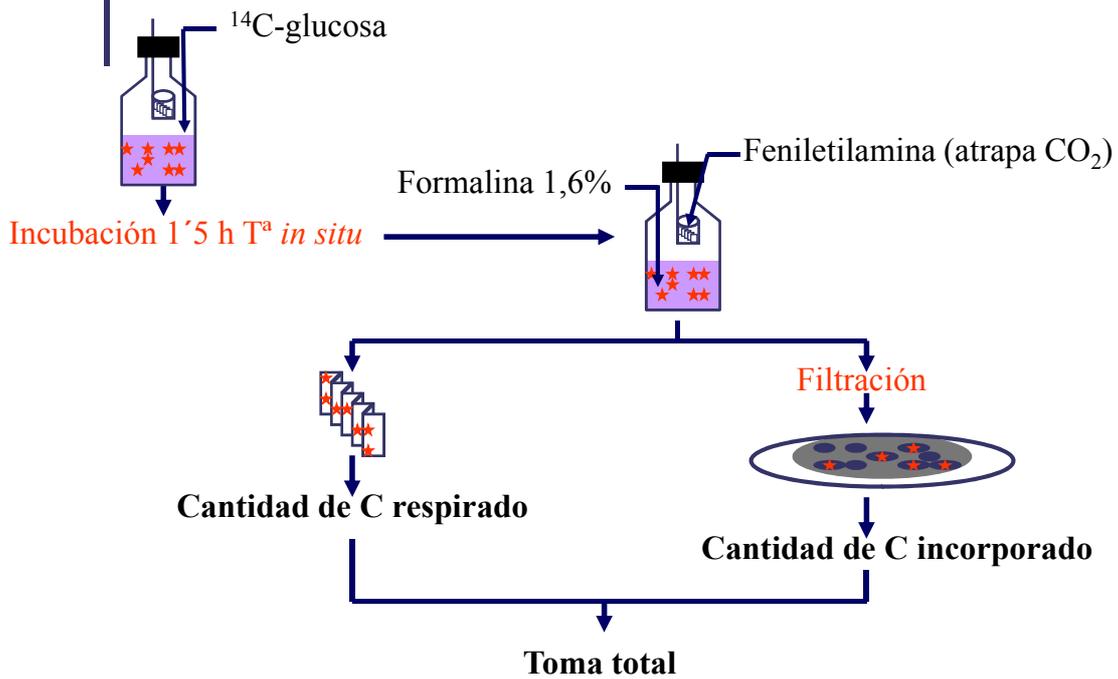
- Sustrato (fracción) asimilado.
- ¿Fracción respirada?
- ¿Toma total?



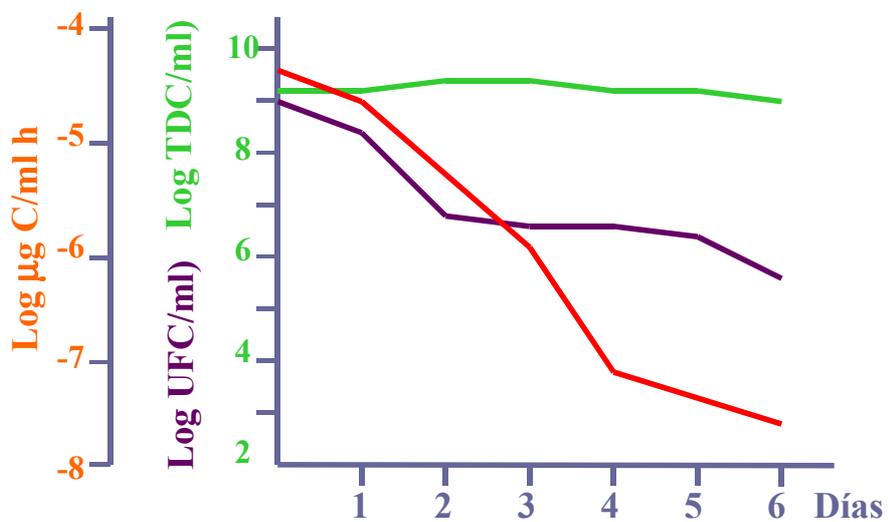
### Actividad potencial heterotrofa



# Actividad potencial heterotrofa

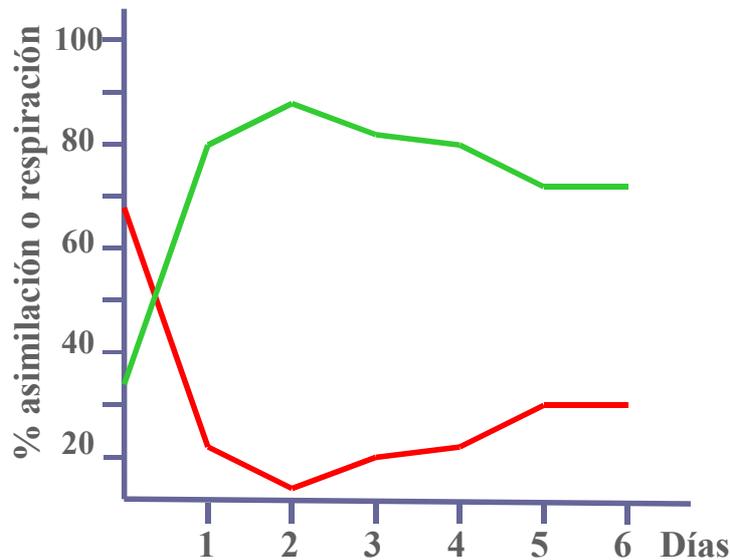


# Actividad potencial heterotrofa.





## Actividad potencial heterotrofa.



## Actividad potencial heterotrofa. Incorporación de glucosa.

- Se supone que todos los miembros de la población microbiana responden de la misma manera frente al sustrato
- Se pueden producir sustancias volátiles diferentes al  $\text{CO}_2$
- Se han propuesto diferentes sustratos marcados (radioactivos):
  - Glucosa y otros carbohidratos
  - Glutamato y otros aminoácidos
  - Productos producidos fotosintéticamente por algas a partir de  $^{14}\text{CO}_2$
  - Compuestos especializados
- Se han propuesto sustratos no radioactivos:
  - Sustratos fluorogénicos/cromogénicos
    - 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino-2-dioxiglucosa (fluorogénico)



## Potencial heterotrofo.

---

- Actividad a nivel poblacional o individual?
- Actividad real o potencial?
- Actividad específica, no específica o resultado global de la actividad?



## Potencial heterotrofo.

---

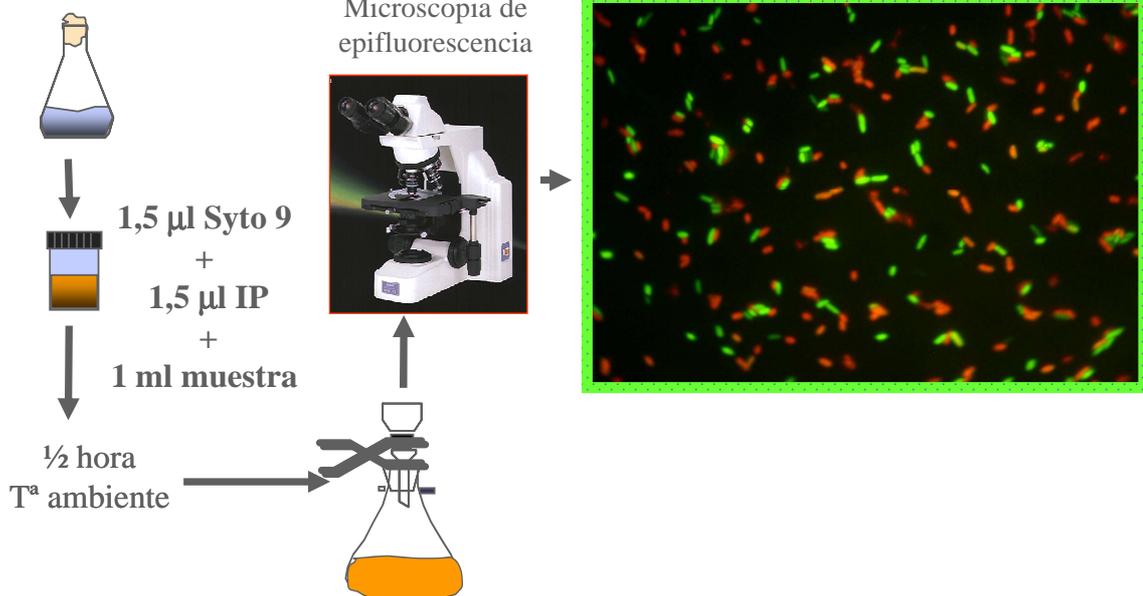
- Actividad a nivel **poblacional** o individual?
- Actividad real o **potencial**?
- Actividad específica, **no específica** o resultado global de la actividad?

# Integridad de la membrana citoplasmática

- Combinación de colorantes
  - Diferente espectro de emisión
  - Diferente capacidad de penetrar la membrana
- Kit Live/Dead BacLight
  - SYTO9 – penetra membranas de células dañadas e intactas. Fluorescencia verde
  - Ioduro de propidio – penetra membranas de células dañadas. Fluorescencia roja.
- Células intactas o MEMB+
- Células dañadas o MEMB-
- Células totales = Verdes + Rojas

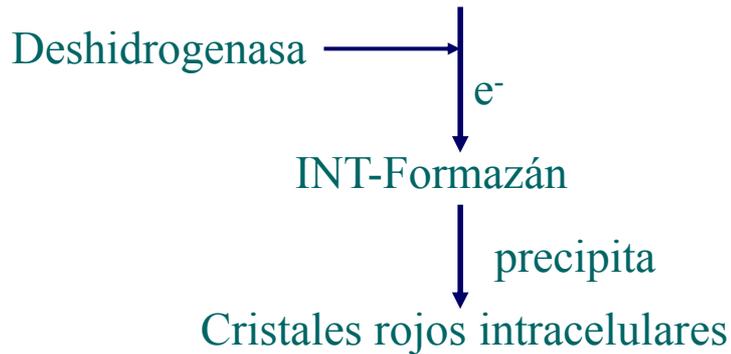
## Integridad de la membrana citoplasmática

### MUESTRA

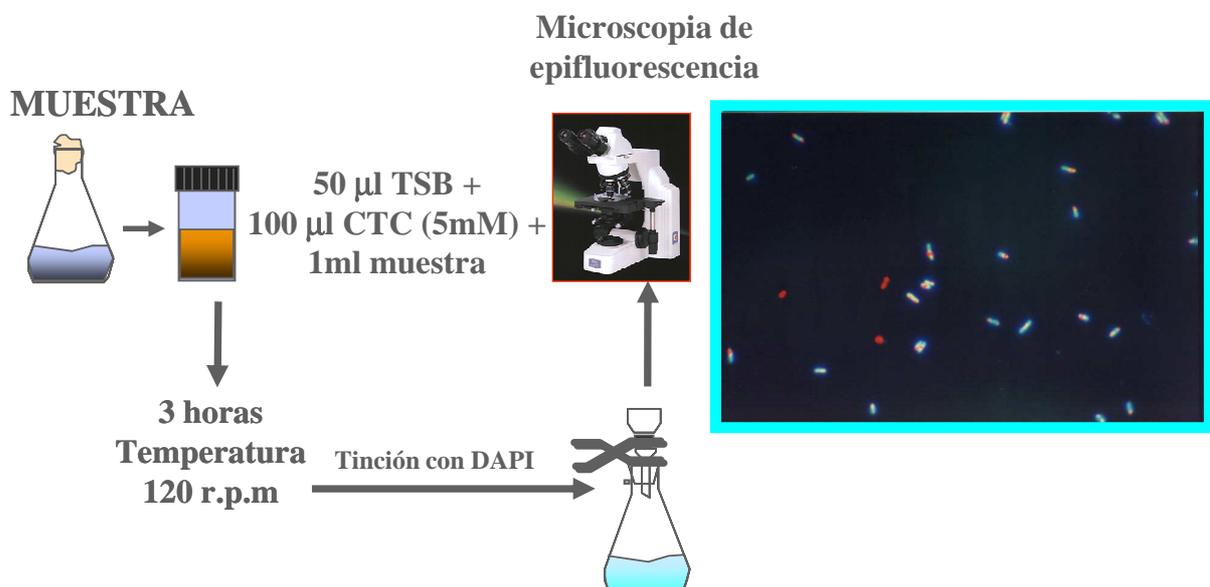


## Cadena de transporte de electrones funcional

- INT: cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio
- CTC: cloruro de 5-ciano-2,3-ditoliltetrazolio  
INT<sub>oxidado</sub> Incoloro. Soluble



## Cadena de transporte de electrones funcional





## Cadena de transporte de electrones funcional

- Células CTC<sup>+</sup>: Células azules con acúmulos rojos.
- Células CTC<sup>-</sup>: Células azules sin acúmulos rojos
- Células totales = Células azules con y sin acúmulos rojos



## Actividades enzimáticas

- Atribuibles a una amplia fracción
  - Deshidrogenasa
  - Estearasa
  - Fosfatasa
  - .....
- Atribuibles a una pequeña fracción
  - Celulasa
  - Quitinasa
  - Nitrogenasa



## Actividades enzimáticas

---

- Secretadas (Filtrar muestra)
  - Sobrenadante = Extracelulares
  - Filtro = Ectoenzimáticas
- Intracelulares



## Actividades enzimáticas. Métodos

---

- Métodos químicos tradicionales
- Marcaje radioactivo
- Métodos cromogénicos
- Métodos fluorogénicos

# Actividades enzimáticas

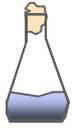
Actividad	Sustrato	Técnica
Fosfatasa	Nitrofenol-P MUF-P	Colorimetría Fluorimetría
Proteasa	Gelatina <sup>125</sup> I-Albumina	Hidrólisis. Gelatina residual Cantidad de isótopo liberado
Amilasa	Almidón	Almidón residual
Quitinasa	Quitina <sup>14</sup> C-Quitina/ <sup>3</sup> H-Quitina	Azúcares Cantidad de isótopo liberado
Celulasa	Carboxil-celulosa	Variación de viscosidad/Azúcares
Deshidrogenasa	INT	Colorimetría (INT-Formazán)
Nitrogenasa	Acetileno	Etileno
Nitrato reductasa	Nitrato	Nitrato residual/Nitrógeno/Óxido nítrico
β-D-Galactosidasa	MUF-Galactosa	Fluorimetría
β-D-Glucuronidasa	MUF-Clucurónico	Fluorimetría

## Porcentaje de células en división. Frecuencia de células en división (FDC)

- En preparaciones de microscopía de epifluorescencia, enumerar:
  - Células con tabique de constricción (células en división)
  - Todas las células
- Calcular porcentaje de células en división
- **Difícil de realizar, subjetivo, problemas con las agrupaciones**

## Porcentaje de células en división. Frecuencia de células en división (FDC)

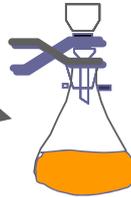
MUESTRA



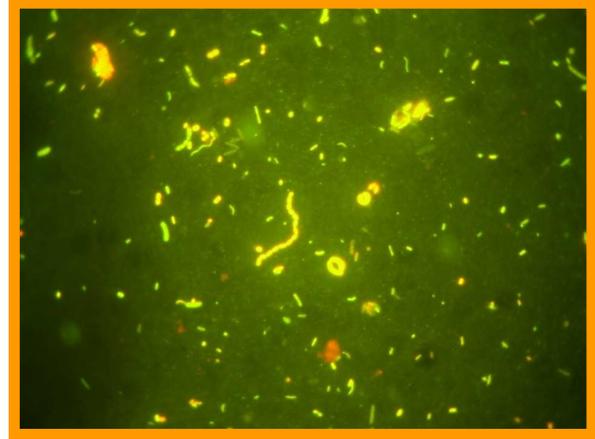
1 ml de muestra  
+  
2 ml de AO



2 minutos  
Temperatura  
ambiente

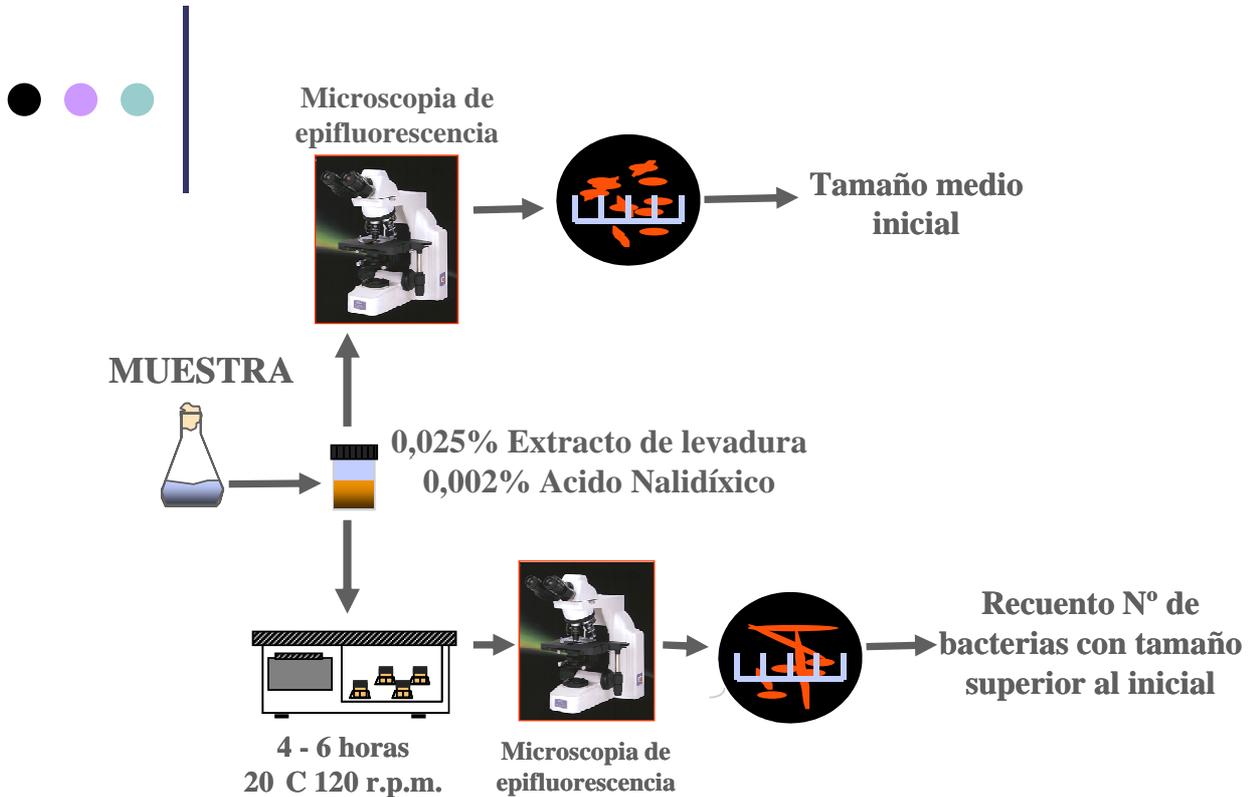


Microscopia de  
epifluorescencia



## Bacterias con capacidad de elongación. Bacterias con actividad biosintética. Direct Viable Count (DVC)

- Bacterias con capacidad de incorporar nutrientes y de elongarse en presencia de un inhibidor de la división celular (capacidad biosintética)
  - Nutrientes en pequeña cantidad. Nutrientes simples o mezclas complejas de amplia utilización
  - Inhibidores de la replicación del ADN: ácido nalidíxico, ciprofloxacino, ....

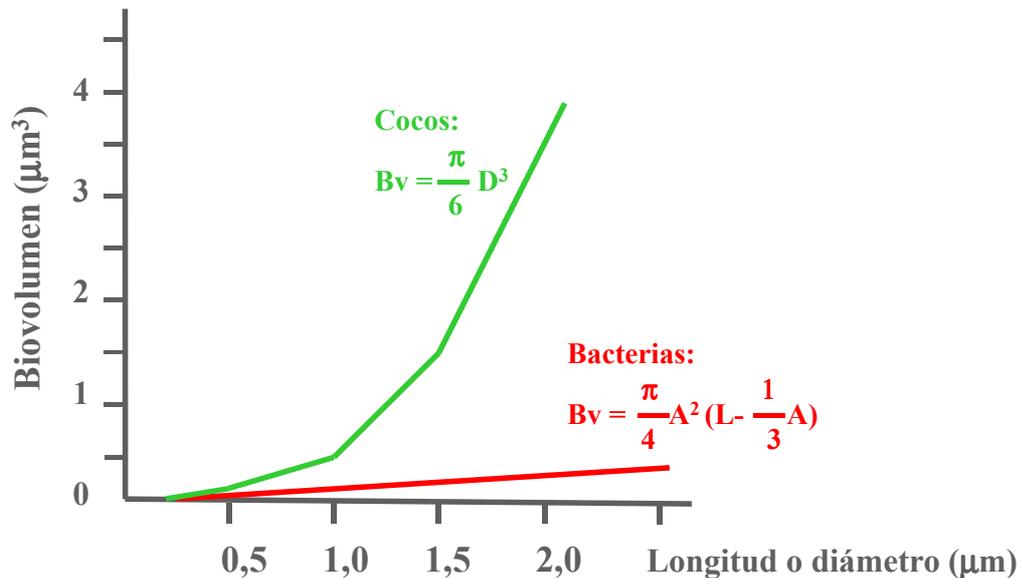


## Bacterias con capacidad de elongación. Bacterias con actividad biosintética. Direct Viable Count (DVC)

- Bacterias con capacidad de incorporar nutrientes y de elongarse en presencia de un inhibidor de la división celular (capacidad biosintética)
  - Nutrientes en pequeña cantidad. Nutrientes simples o mezclas complejas de amplia utilización
  - Inhibidores de la replicación del ADN: ácido nalidixico, ciprofloxacino, ....
  - ¿A partir de que tamaño se considera elongación y, por tanto, activas?

## Bacterias con capacidad de elongación. Bacterias con actividad biosintética. Direct Viable Count (DVC)

---

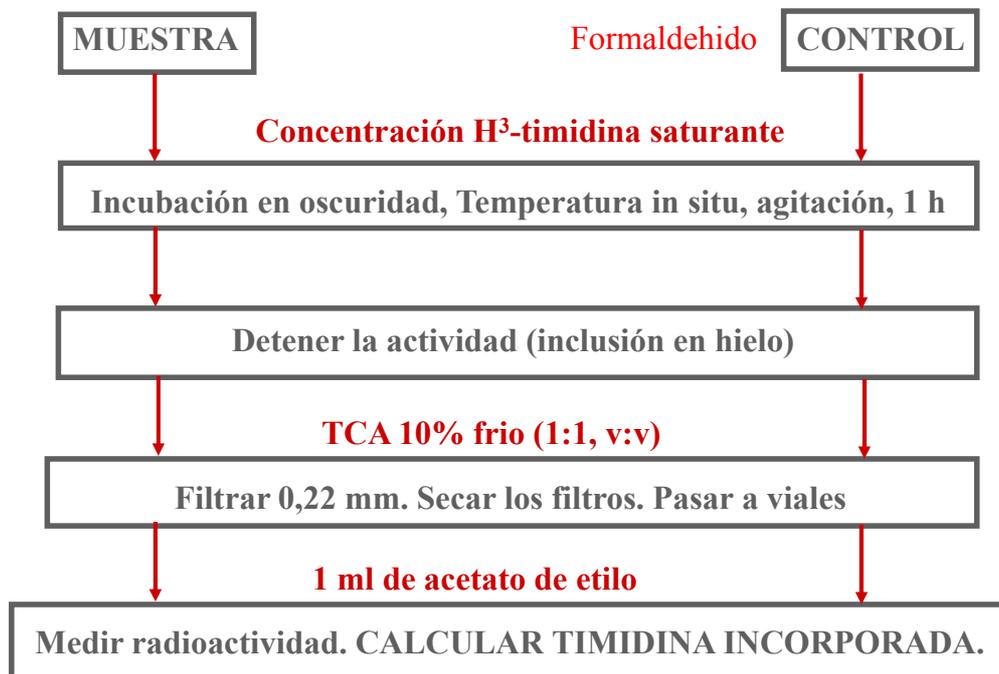


## Velocidad de síntesis de ADN a partir de incorporación de $\text{H}^3$ -Timidina. Producción bacteriana.

---

- Las bacterias son los **únicos** microorganismos que **incorporan timidina a bajas concentraciones y cortos periodos de tiempo**
- Las bacterias que no están creciendo, no incorporan timidina
- Las bacterias que están creciendo toman timidina

## Medidas indirectas. Ensayos bioquímicos



## Métodos de estimación de depredación sobre bacterias

- Variación en las velocidades de crecimiento bacteriano en presencia y ausencia de depredadores
  - Inhibidores metabólicos
- Ingestión de partículas marcadas
  - Bolas de látex
  - Bacterias radioactivas
  - Bacterias fluorescentes



## Métodos de estimación de depredación sobre bacterias. Bacterias fluorescentes

---

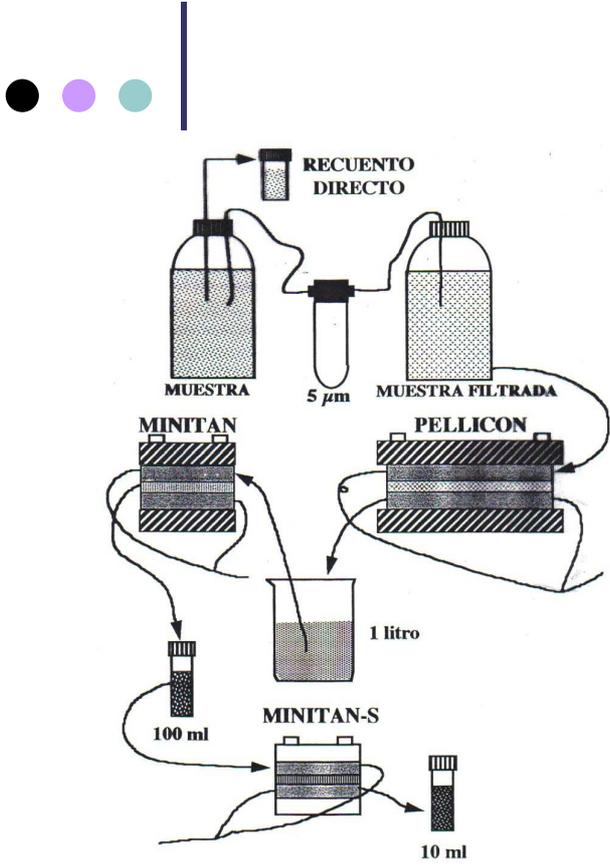
- Amplia información acerca del fenómeno
- Fácil visualización durante largos periodos de tiempo
- Fácil conservación



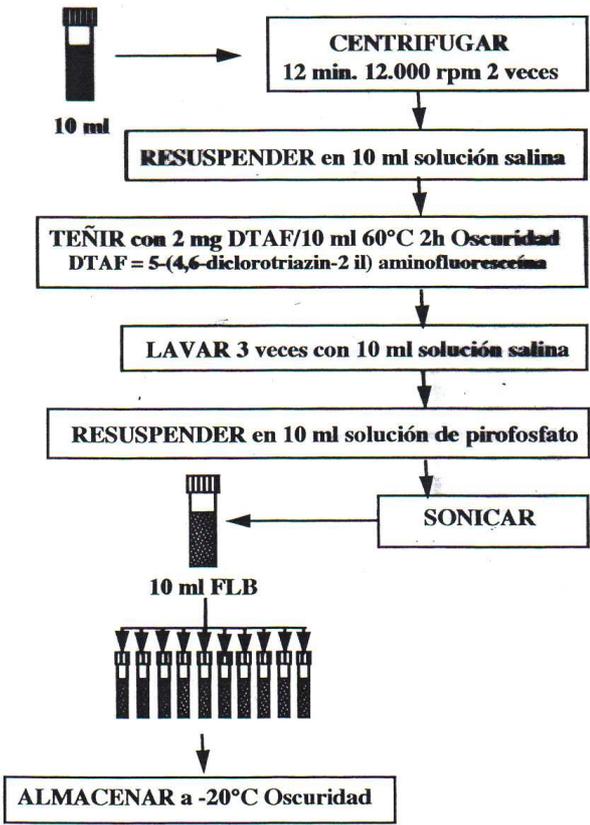
## Métodos de estimación de depredación sobre bacterias. Bacterias fluorescentes

---

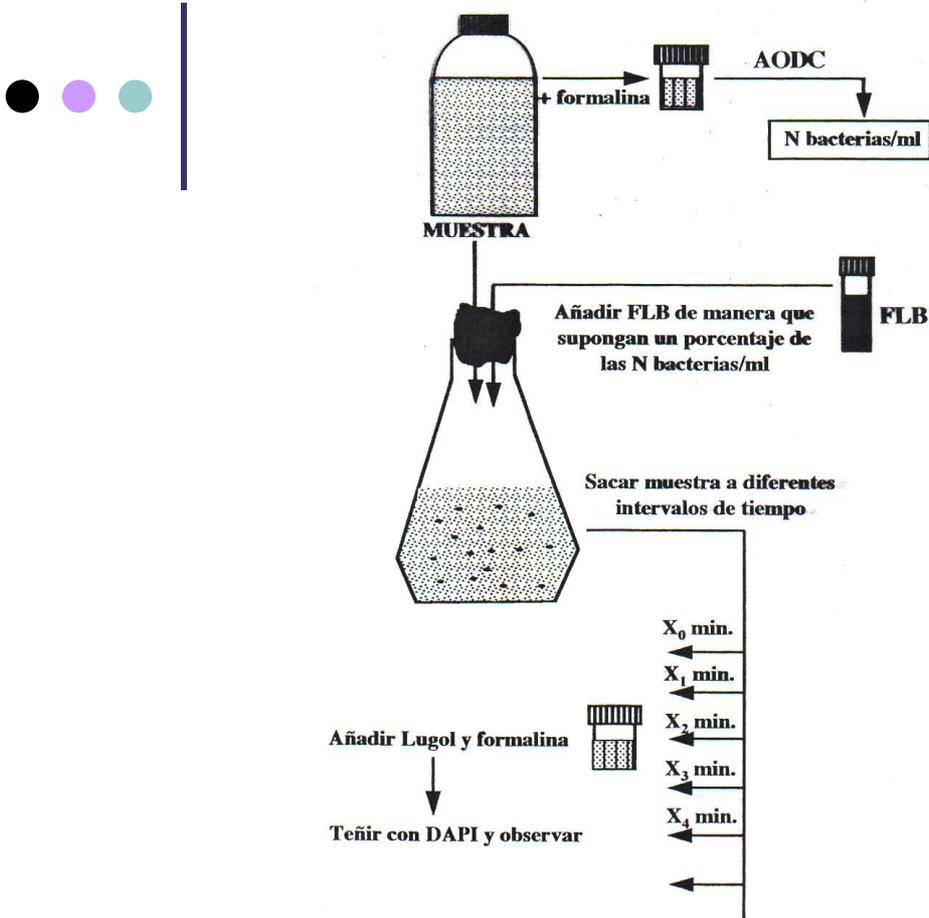
- Introducir fluorocromos en las células
  - **FLB (Fluorescently Labelled Bacteria)**
    - Preparación compleja
    - Células muertas (discriminación de presas)
    - Poblaciones naturales
  - **RSB (Rhodamine Stained Bacteria)**
    - Preparación compleja
    - Células vivas
    - Poblaciones naturales
- La propia célula produce marcaje fluorescente
  - **GFP (Green Fluorescent Protein)**
    - Biología molecular
    - Células vivas
    - Pocas especies disponibles

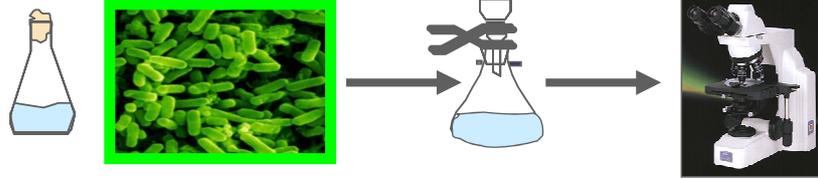


**PREPARACION DE FLB (Fluorescently labeled bacteria)**

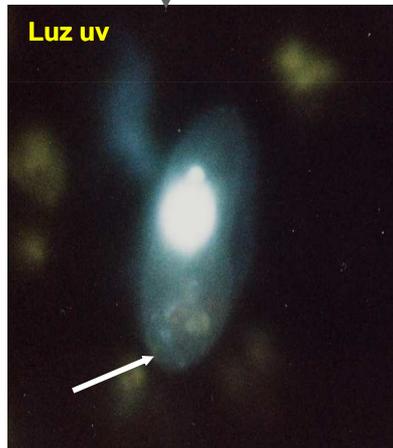


PARA SU UTILIZACION: DESCONGELAR Y SONICAR





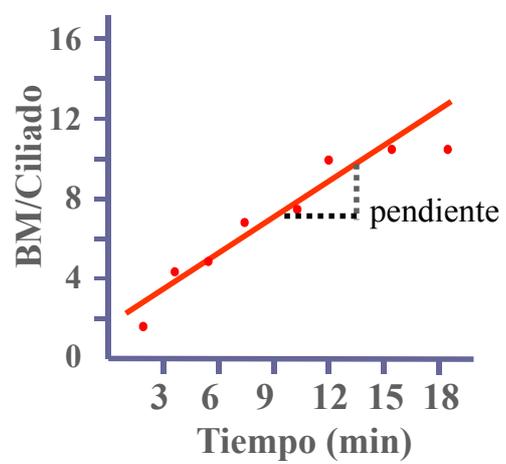
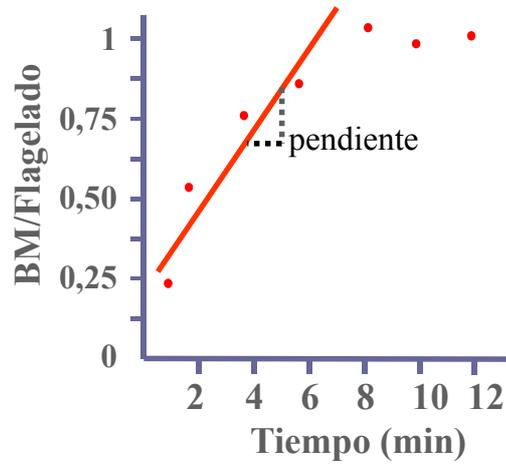
MUESTRA + *E. coli* (GFP)



protozoo



bacterias teñidas



\*BM = Bacteria marcada



Pendiente  
BM/Flagelado h

Pendiente  
BM/Ciliado h

Conocido este valor y el porcentaje de bacterias marcadas (BM) añadidas (respecto a la población de bacterias naturales, N) podemos calcular:

Bacterias totales/Flagelado h

Bacterias totales/Ciliado h

**Velocidad de depredación** o número de bacterias naturales ingeridas por flagelado o ciliado en la unidad de tiempo



Bacterias totales/Flagelado h

Bacterias totales/Ciliado h

Velocidad de depredación o número de bacterias naturales ingeridas por flagelado o ciliado en la unidad de tiempo

Conocido este valor y la densidad de protozoos flagelados y ciliados (protozoo/ml de muestra) podemos calcular:

Bacterias totales/ml h

Bacterias totales/ml h

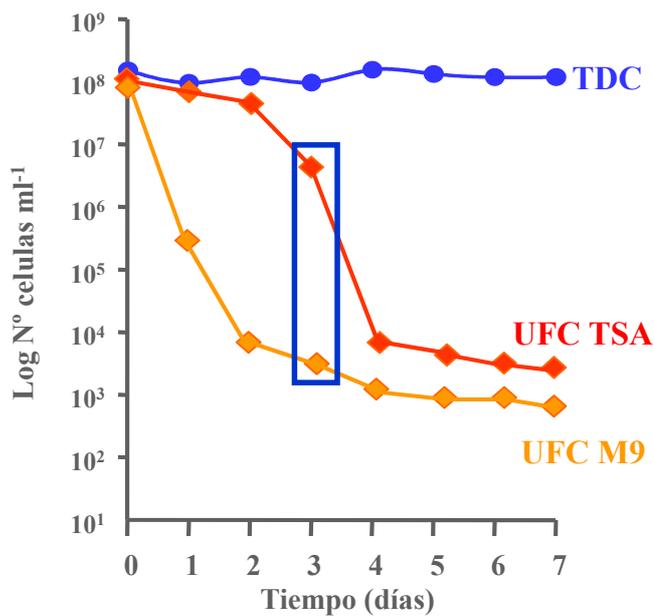
**Velocidad de depredación de la comunidad** o número de bacterias naturales ingeridas en la unidad de tiempo por la comunidad flagelados o ciliados presentes en la muestra de agua

## Velocidad de aclaramiento ( $V_A$ )

Volumen de agua filtrada por protista en unidad de tiempo.

$$V_A = \frac{\text{Velocidad de ingestión}}{\text{Densidad de FLB}} = \frac{\text{FLB} / \text{Protista h}}{\text{FLB/l}}$$

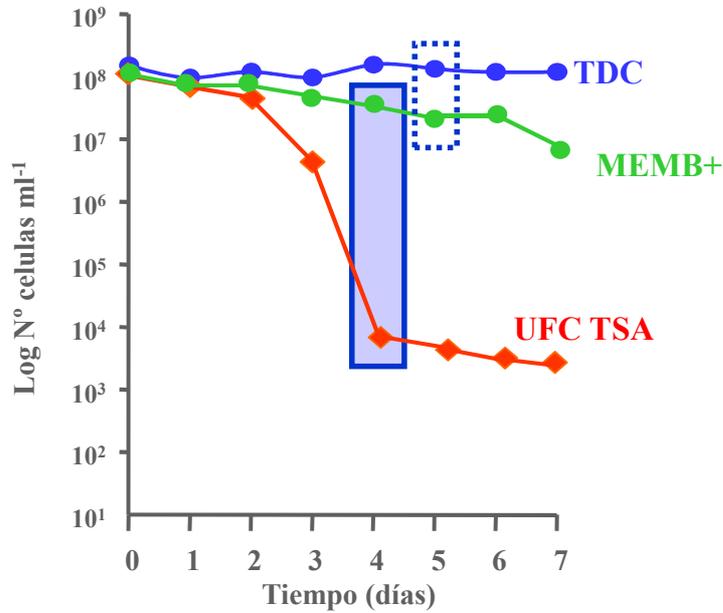
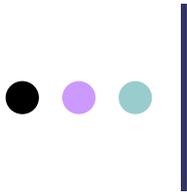
$$V_A = \frac{1}{\text{Protista h}}$$



UFC TSA vs UFC M9

Células cultivables no lesionadas

Células cultivables lesionadas o recuperables

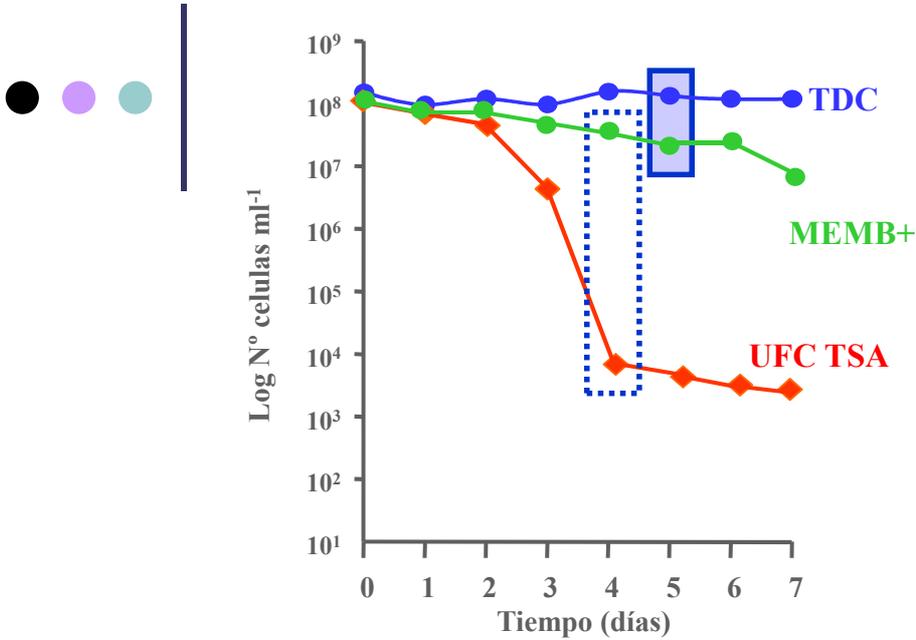


**MEMB+ vs UFC**  
Células viables no cultivables (VBNC)

**TDC vs MEMB+**  
Células no viables (NV)

## Estado Viable No cultivable (VBNC)

- Estado en el que la célula no es capaz de multiplicarse, formando colonias sobre medios sólidos, aunque sí manifiesta otras actividades celulares
- Razones de la existencia del estado VBNC
  - Estrategia de supervivencia a largo plazo (ciclo de vida). Similar a formación de esporas
  - Proceso degenerativo. Primer paso de una cadena de acontecimientos que terminan en muerte. *Muerte celular programada?*



MEMB+ vs UFC  
Células viables no cultivables (VBNC)

TDC vs MEMB+  
Células no viables (NV)

## Estado No Viable (NV)

- Estado en el que la célula mantiene su integridad/morfología pero no manifiesta actividad
- Explicaciones de la existencia del estado NV
  - No manifiesta actividad porque no usamos/disponemos de la técnica adecuada para cuantificarla/detectarla
  - Son células muertas



## Concepto de muerte bacteriana

---

- Células que han perdido su integridad celular
- Células que presentan lesiones irreversibles en el genoma = ¿NV?