



4. GAIA

INGURUNE URTARRAREN MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA ETA KUANTIFIKAZIOA



- **LAGINEN AURREPROZESAKETA**
- **ZENBAKETA ZUZENAK**
 - KONTAKETA-GANBERAK
 - SEDIMENTAZIO-GANBERAK
 - AGAR-GERUZAK
 - EPIFLUORESZENTZIA MIKROSKOPIOA
 - FLUXU-ZITOMETROA
- **ZENBAKETA EZ ZUZENAK**
 - ZELULA BIDERAGARRIEN KONTAKETA (ZELULA KULTIBAGARRIAK)
 - HAZKUNTZA-MEDIO SOLIDOETAN EGINDAKO ZENBAKETA
 - ZENBAKI PROBABLEENAREN TEKNIKA (MPN, *MOST PROBABLE NUMBER*)
 - BAKTERIO-POPULAZIOAK ABERASTEKO ETA HAUTATZEKO METODOAK
- **MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA**
 - TINDAKETA DIFERENTZIALAK
 - DETEKZIO MOLEKULARRA
 - ZUNDA GENETIKOAK
 - PCR POLIMERASA
 - FINGERPRINTING-A

MIKROORGANISMOEN ZENBAKETA



Lagin batean dauden mikroorganismo kopurua zehazki ezagutzea funtsezkoa izan daiteke, adibidez:

- Mikrobiologia klinikoan, hainbat patologia diagnostikatzeko eta tratatzeko
- Elikagai-industrian, elikagaien segurtasuna bermatzeko
- Uraren kalitatea bermatzeko
- ...

Gai honetan, mikroorganismoak zenbatzeko erabil daitezkeen teknikak aztertuko ditugu.

MIKROORGANISMOEN ZENBAKETA



Teknika zuzenak

Neurtu nahi dugun parametroaren determinazio zuzena

Teknika ez zuzenak

Mikroorganismoen kopuruarekin edo biomasarekin proportzionalki erlazionatuta dagoen parametro baten determinazio zuzena

TEKNIKA ZUZENAK



Neurtzeko parametroaren determinazio zuzena

Adibideak:

- Mikroorganismoen zenbaketa zuzena
- Pisu lehorraren kalkulua

ZENBAKETA ZUZENA



- Berehalako emaitzak, inkubaziorik gabe
- Mikroorganismoen kopuruaren kuantifikatzeko
- Dentsitatearen gain, biomasa eta aktibitatea estima daitezke.

- **EZ du baztertzen mikroorganismo bizirik eta hilen artean**
- **Zaila da detrituak eta mikroorganismoak bereiztea**
- **Mikroorganismoak tamaina eta konposizio ezberdineko partikulei lotuta egon daitezke**
- **Laginak EZIN dira erabili beste analisiak egiteko**

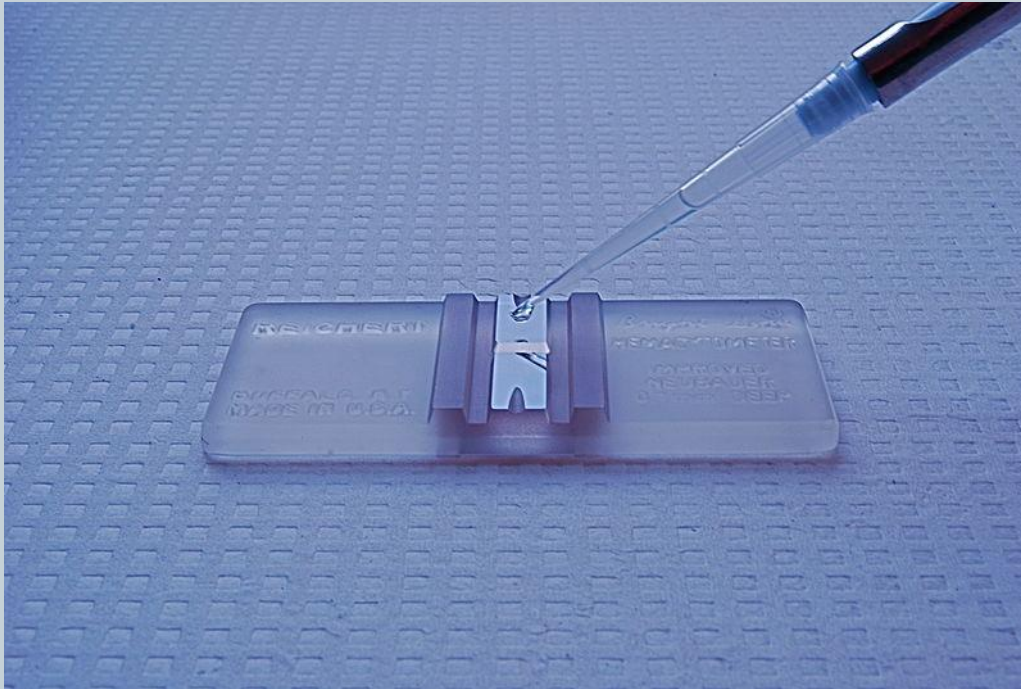
TEKNIKA ZUZENAK



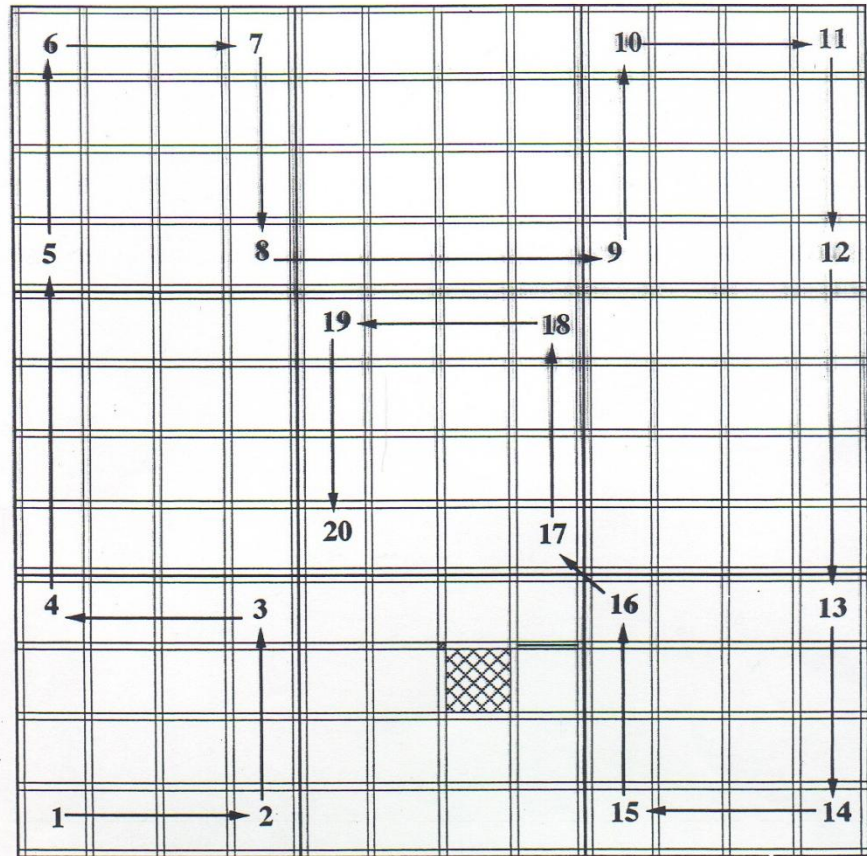
- **Kontaketa-ganberak**
- **Sedimentazio-ganberak**
- **Agar-geruza**
- **Epifluoreszentzia mikroskopioa**
- **Laser-ekorketa bidezko mikroskopioa konfokala**
- **Fluxu-zitometroa**

TEKNIKA ZUZENAK

Kontaketa-ganbera (Hemozitimetroa)



Kontaketa-ganbera



$4 \cdot 10^{-6}$ ml

10^{-6} ml

$5 \cdot 10^{-7}$ ml

Contar células en 1 a 20

Hacer media con X_1 a X_{20}

Dividir Valor medio entre volumen contenido en areas contaças

(P.e. Valor medio = 22 células

Tipo de Areas contadas = Cuadros grandes

N° m.o./ml de muestra = $22/4 \cdot 10^{-6}$

TEKNIKA ZUZENAK

Kontaketa-ganbera (Hemozitimetroa)



- **Mikroorganismo handiak zenbatzeko (protozoak, algak eta onddoak)**
- **Ganbera motak:**
 - **Petroff-Hauser ganbera: Bakterioak (0,5-10 mm)**
 - **Sedgewick-Rafter ganbera: Fitoplankton (>10 mm)**
 - **Palmer-Maloney ganbera (Hemozitimetroa): Nanoplankton**

TEKNIKA ZUZENAK

Kontaketa-ganberak



- Mikroorganismoen kopurua txikia bada, **lagina diluitu behar da.**
- Lagin homogeneoa. **Kontaketa egin aurretik, lagina astindu behar da homogeneizatzeko eta multzoak apurtzeko.**
- **Arazoak:** Akatsak hartutako bolumenetan
Mikroorganismoen mugikortasuna

TEKNIKA ZUZENAK

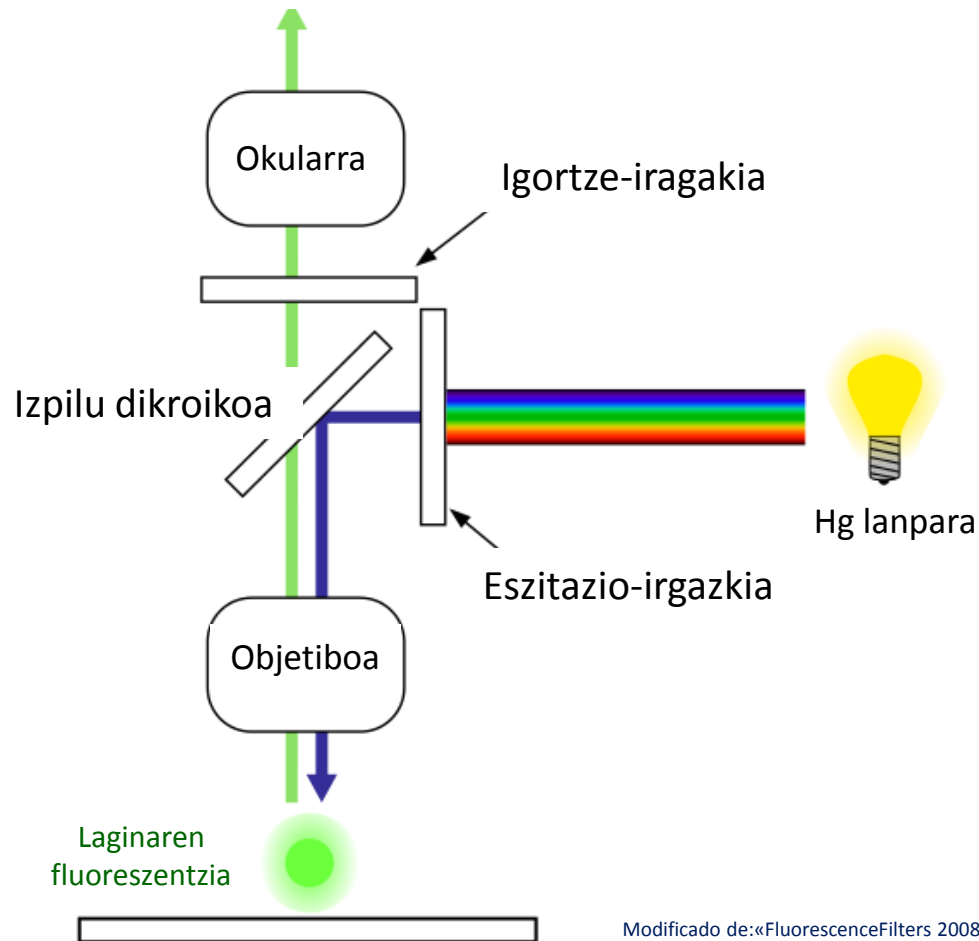
Epifluoreszentzia mikroskopiaoa



«Microscope And Digital Camera» de Original uploader was Zephyris at en.wikipedia - Transferred from en.wikipedia; transfer was stated to be made by User:Jacopo Werther..
Disponibile bajo la licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 vía Wikimedia Commons -
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscope_And_Digital_Camera.JPG#mediaviewer/File:Microscope_And_Digital_Camera.JPG

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa

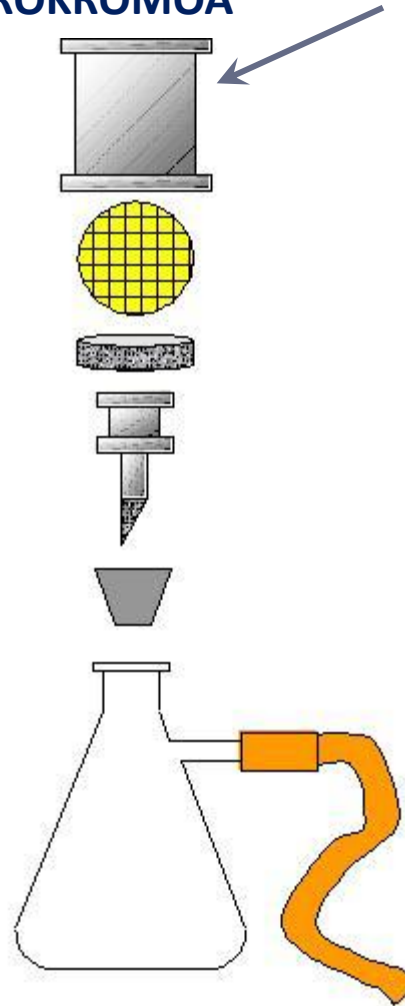


Modificado de: «FluorescenceFilters 2008-09-28 cs» de FluorescenceFilters_2008-09-28.svg: *derivative work: Henry Mühlpfordt (Disponible bajo la licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0-2.5-2.0-1.0 vía Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters_2008-09-28_cs.svg#mediaviewer/File:FluorescenceFilters_2008-09-28_cs.svg)

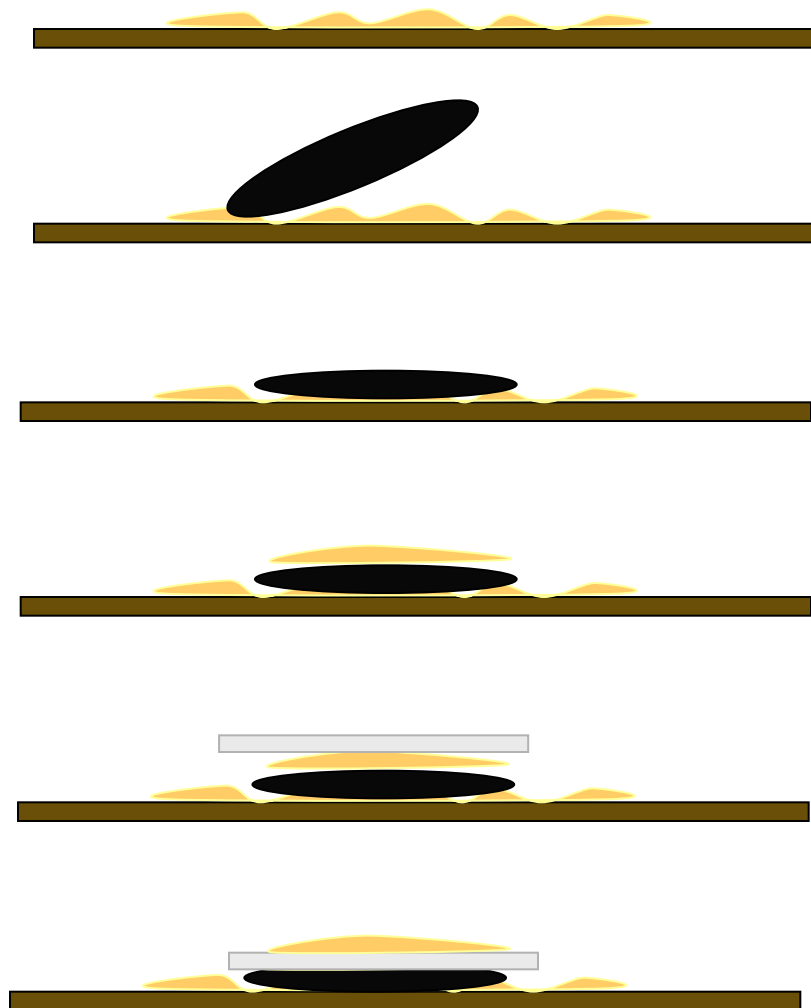
TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopia

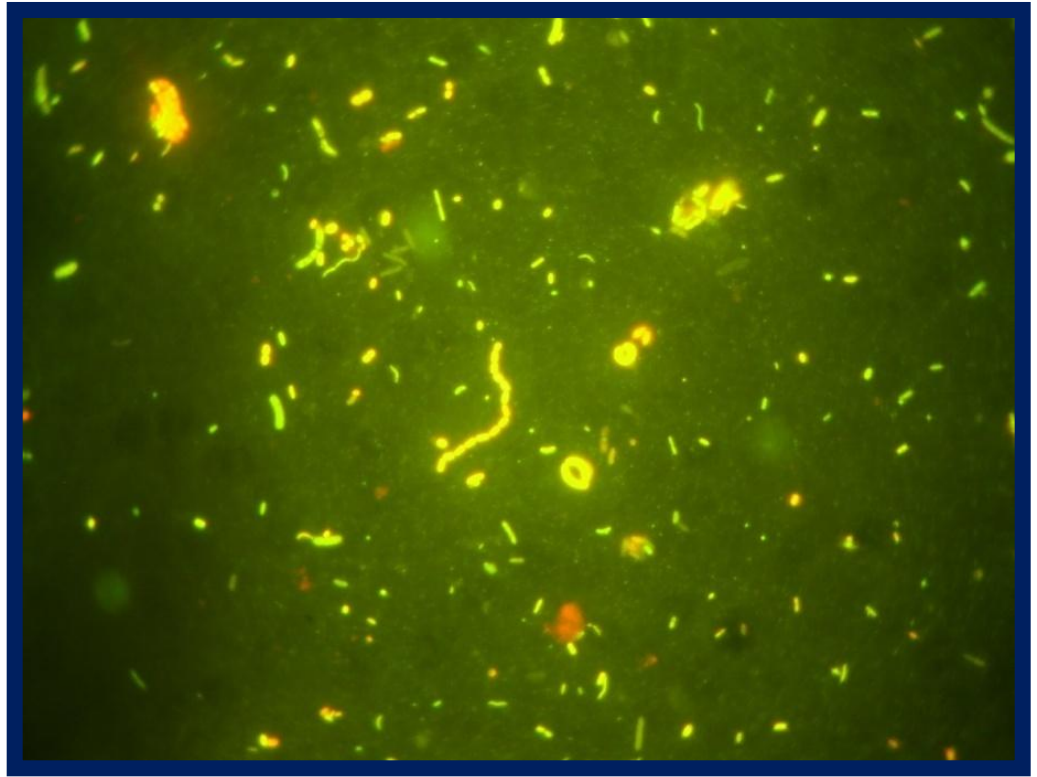
FLUOROKROMOA



Epifluoreszenztia mikroszkopia



BEHATU



TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



- **Murgil-olio berezia**
- **Mintz-iragazkiak**
 - **Poro-diametroa**
 - **Iragazkiaren kolorea**
 - **Iragazki mota**

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



Laginketa	Zenbaketa (zelulak/ml)	
	<i>Sartorius</i> iragazkiak (0,5 μm) (zelulosa esterrak)	<i>Nucleopore</i> iragazkiak (0,2 μm) (Polikarbonatoa)
Estuarioa	8,6 10 ⁵	X 2 1,7 10 ⁶
Iturburua	4,0 10 ⁵	X 1,8 7,2 10 ⁵
Erreka	1,7 10 ⁶	X 2,3 4,0 10 ⁶

Daley RJ, JE Hobbie. 1975. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceanog.* 20: 875-882

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



- **Murgil-olio berezia**
- **Mintz-iragazkiak**
- **Fluorokromoak**
 - **Fluorokromoaren arabera erabili behar diren iragazkiak aldatzen dira (ad. eszitazio-iragazkia)**

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



Akridina-laranja (AO)

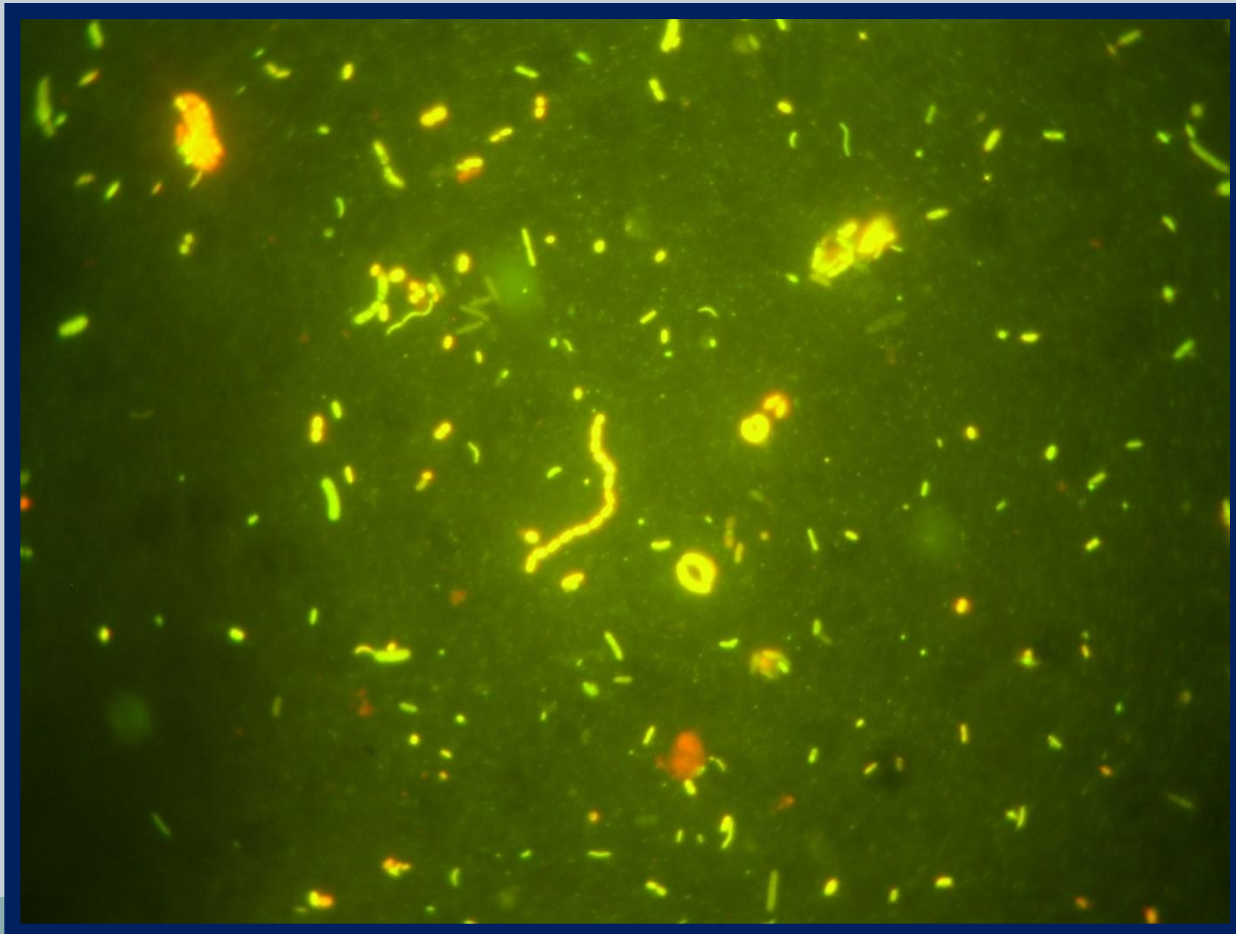
- 3,6-tetrametildiamino akridina
- Argi erasotzailea: **URDINA** (450-490 nm)
- Igorritako argia: **BERDEA** (520 nm)
- Nola ikusten dira zelulak? **BERDEz** edo **GORRIz/LARANJAz**
tindatuak

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



Akridina-laranja (AO)



TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



DAPI

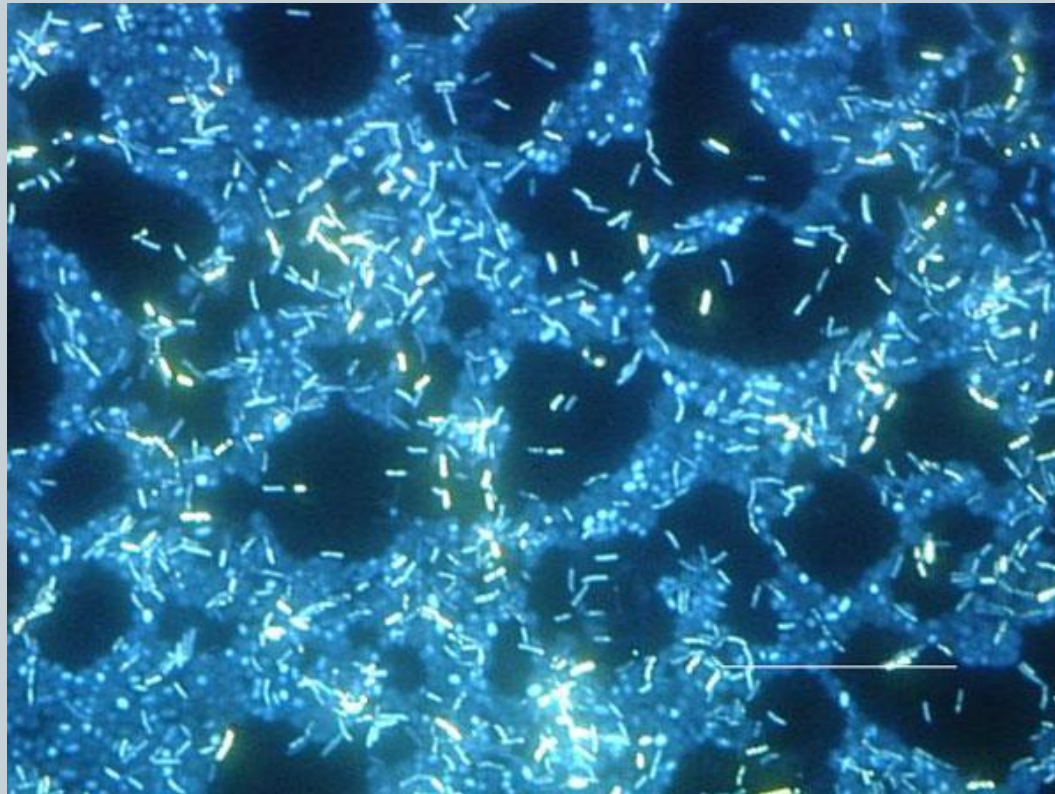
- 4,6-diamino 2 fenil indola
- Argi erasotzailea: **UV** (330-380 nm)
- Igorritako argia: **URDINA** (435 nm)
- Nola ikusten dira zelulak? **URDINAz** tindatuak

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



DAPI

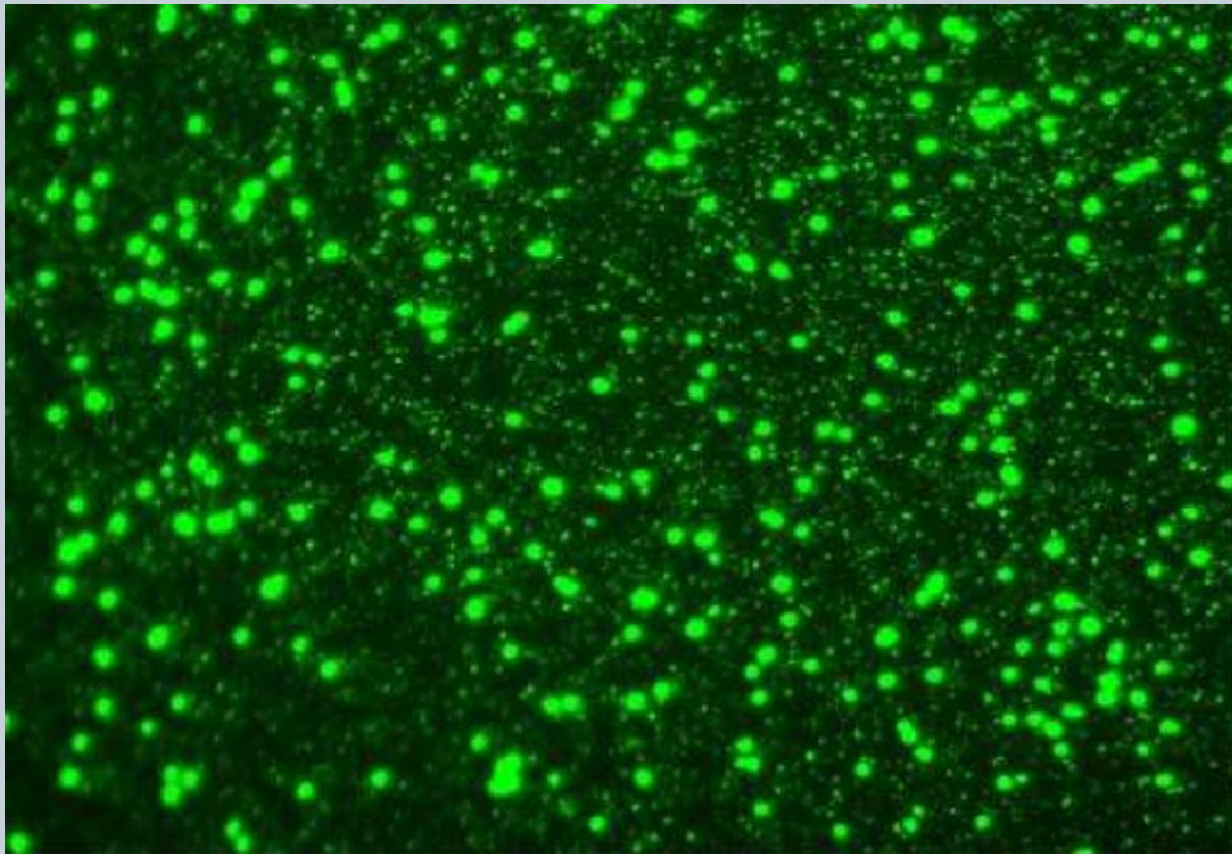


TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



SYBR Green



Fluorokromoa	Lotura	Eszitazioa/Igorpena	
Ethidium bromide	DNA-RNA	518 / 605	
Acridine orange	RNA-DNA	500 / 525	460 / 650
DAPI	DNA	358 / 461	
Hoescht 33342	DNA (AT)	350 / 461	
SYTO-13	DNA-RNA	488 / 514	
YOYO-1	DNA-RNA	491 / 509	
PicoGreen	dsDNA	480 / 520	
SYBR Gren I	DNA (RNA)	494 / 521	
SYBR Gren II	RNA (DNA)	494 / 521	
SYTO-9, 11, 16	DNA – RNA	480 / 510	300 / 520

Unidad de Microscopía CSIC:

<http://cicwebserver.dep.usal.es/confocal/web/WEB/apartados%20web%20%20micro/tablas%20fluorocromos.dwt>

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



- **Murgil-olio berezia**
- **Mintz-iragazkiak**
- **Fluorokromoak**
- **Mikroskopioaren faktorea**
 - **Eremu/Iragazki**
 - **Lauki/Iragazki**

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



- **Azkarra**
- **Hainbat habitat edo mikroorganismorekin erabil daiteke**
- **Biomasarekin erlazionatua**
- **Formak eta tamainak neur daitezke**
- **Arazoak**

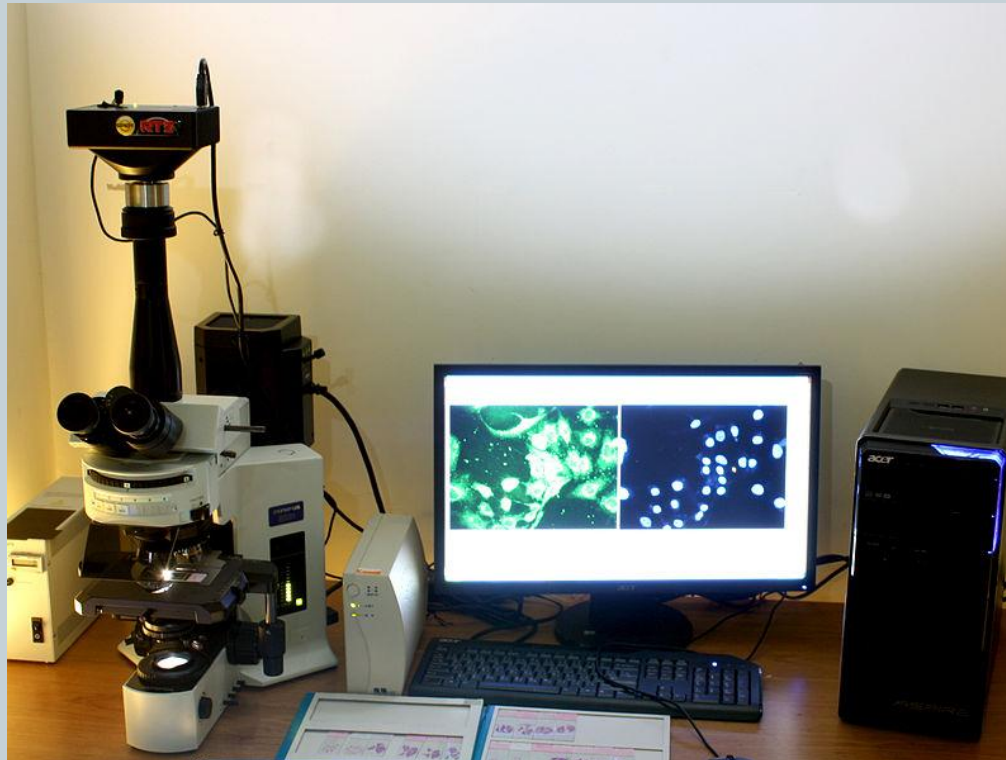
TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



Arazoak

- Gogaikarria – Irudien analisisia



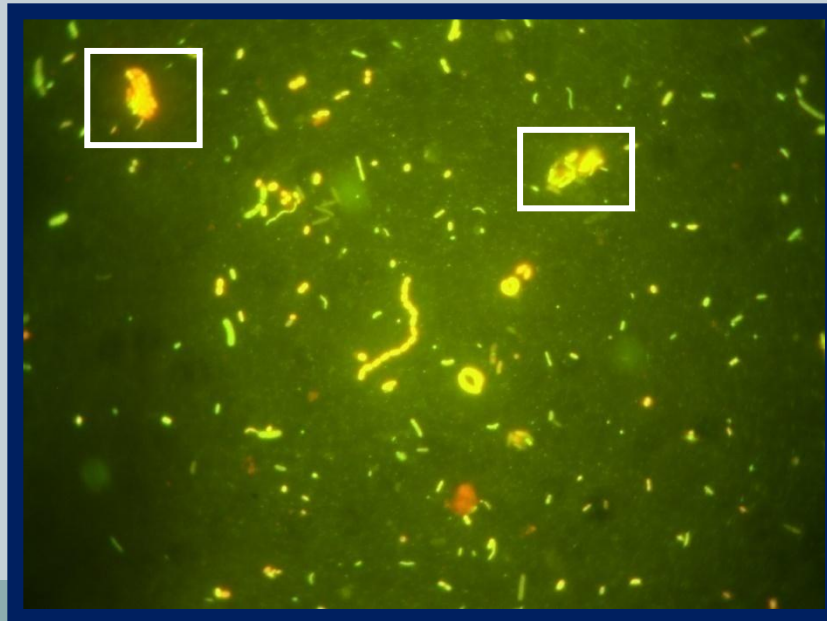
TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



Arazoak

- Gogaikarria – Irudien analisia
- Mikroorganismoak partikulei lotuta (agregatuak)
→ Homogenizazioa



TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



Arazoak

- Gogaikarria – Irudien analisisia
- Mikroorganismoak partikulei lotuta (agregatuak)
→ **Homogenizazioa**
- Ezin da bereizi zelula espezifikoaren artean
→ **Antigorputz fluoreszenteak**
- Ez du egoera fisiologikoari buruzko informaziorik ematen
→ **Beste metodo batzuekin konbina daiteke (5. gaia)**

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa

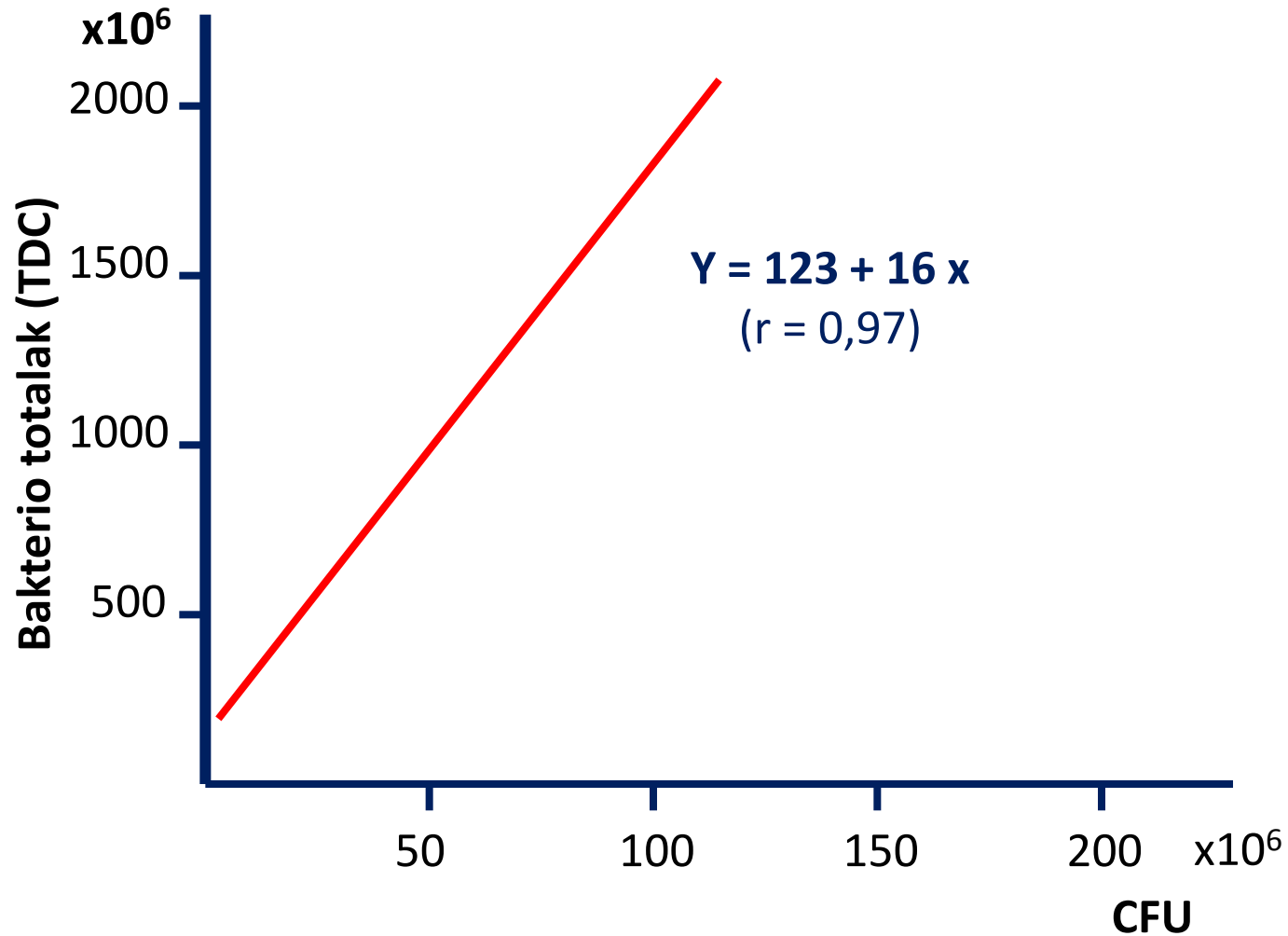
Lagina	Lurra		Itsasoko ura	
	TDC	CFU	TDC	CFU
A	$5,0 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^7$ (X 16)	$2,2 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^1$ (X 170)
B	$1,1 \cdot 10^9$	$6,2 \cdot 10^7$ (X 17,7)	$8,2 \cdot 10^4$	$7,6 \cdot 10^2$ (X 107)
C	$2,0 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^8$ (X 12)	$1,3 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^4$ (X 63)

TDC = *total direct counts* (zelula totalak)

CFU = *colony-forming units* (zelula kultibagarriak)

TEKNIKA ZUZENAK

Epifluoreszentzia mikroskopioa



TEKNIKA ZUZENAK

Fluxu-zitometroa



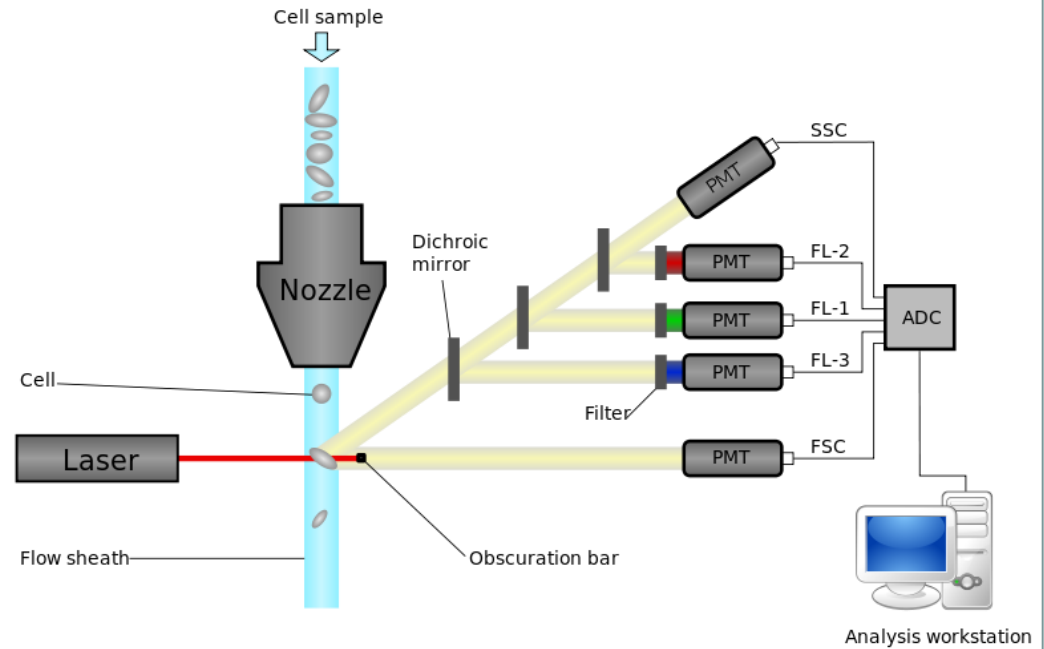
- Fluxu-zitometriaren bidez zeluletako argiaren barreiatze eta fluoreszentiaren igorpen ezaugarriak neur daitezke. Horretarako, zelulek banaka zeharkatzen dute laser batek igorritako argia. Gero, argiaren barreiatzea eta beste parametro batzuk neurtzen dira detektagailuen bidez.
- Partikula-kontagailuaren antzeko oinarria

TEKNIKA ZUZENAK

Fluxu-zitometroa



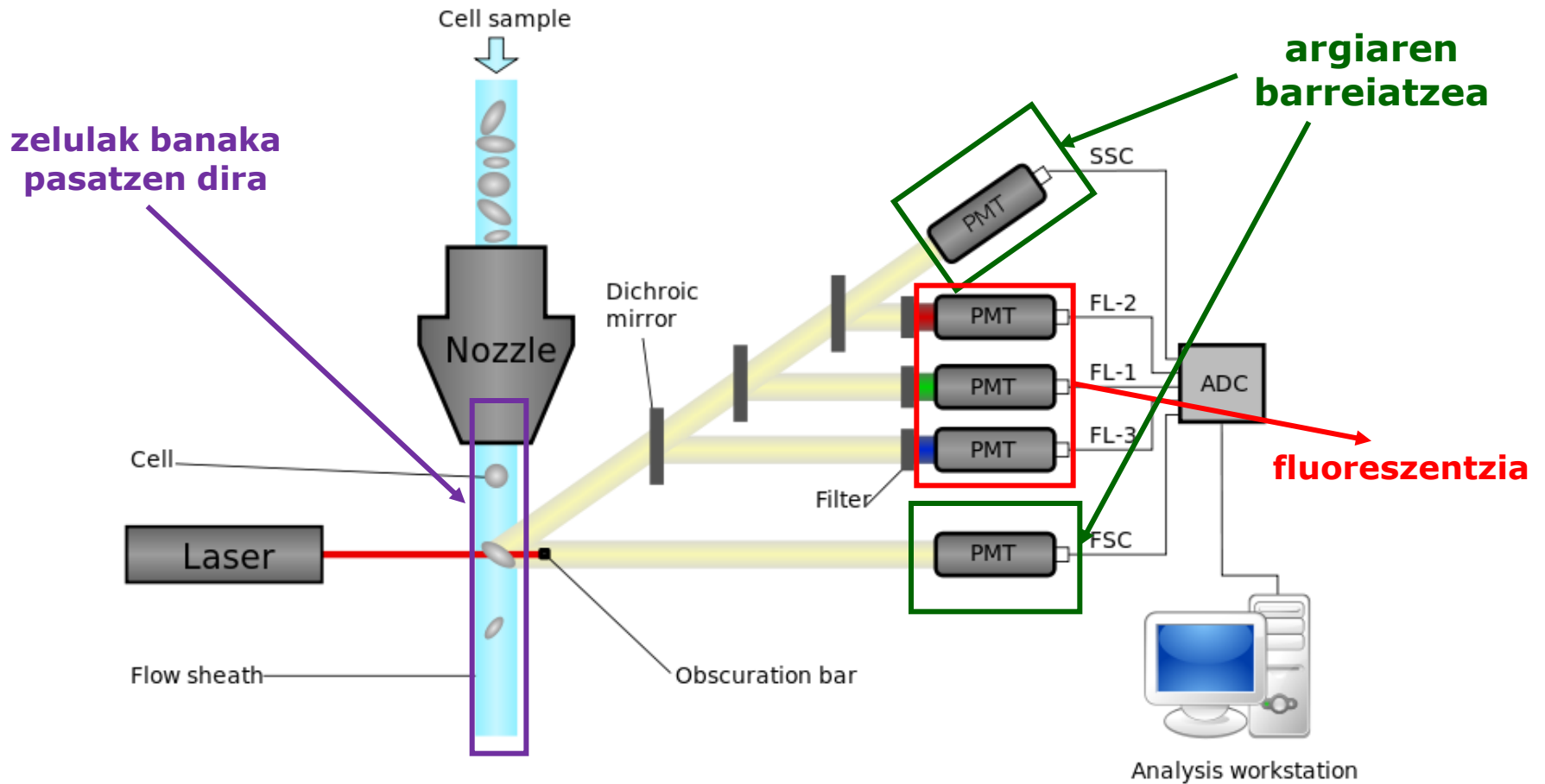
«FACS-toestel» de Biol - Trabajo propio. Disponible bajo la licencia Public domain
vía Wikimedia Commons - <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FACS-toestel.JPG#mediaviewer/File:FACS-toestel.JPG>



«Cytometer» de Kierano - Trabajo propio. Disponible bajo la licencia Creative Commons Attribution 3.0 via
Wikimedia Commons - <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cytometer.svg#mediaviewer/File:Cytometer.svg>

TEKNIKA ZUZENAK

Fluxu-zitometroa



TEKNIKA ZUZENAK

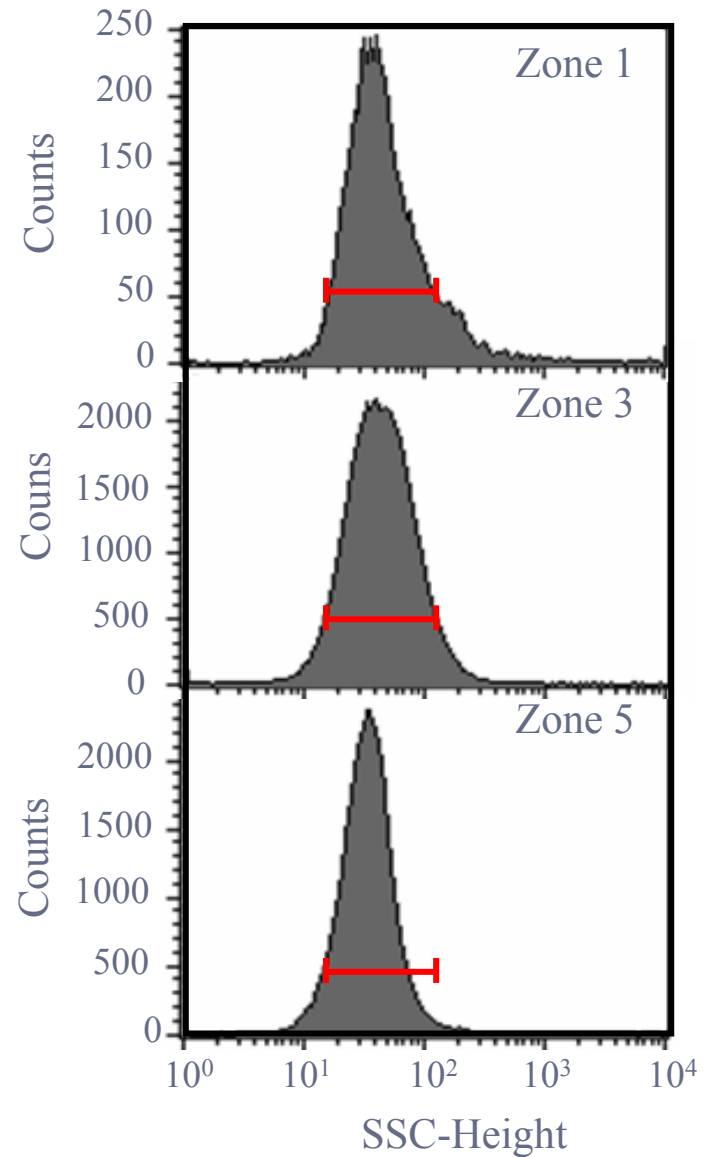
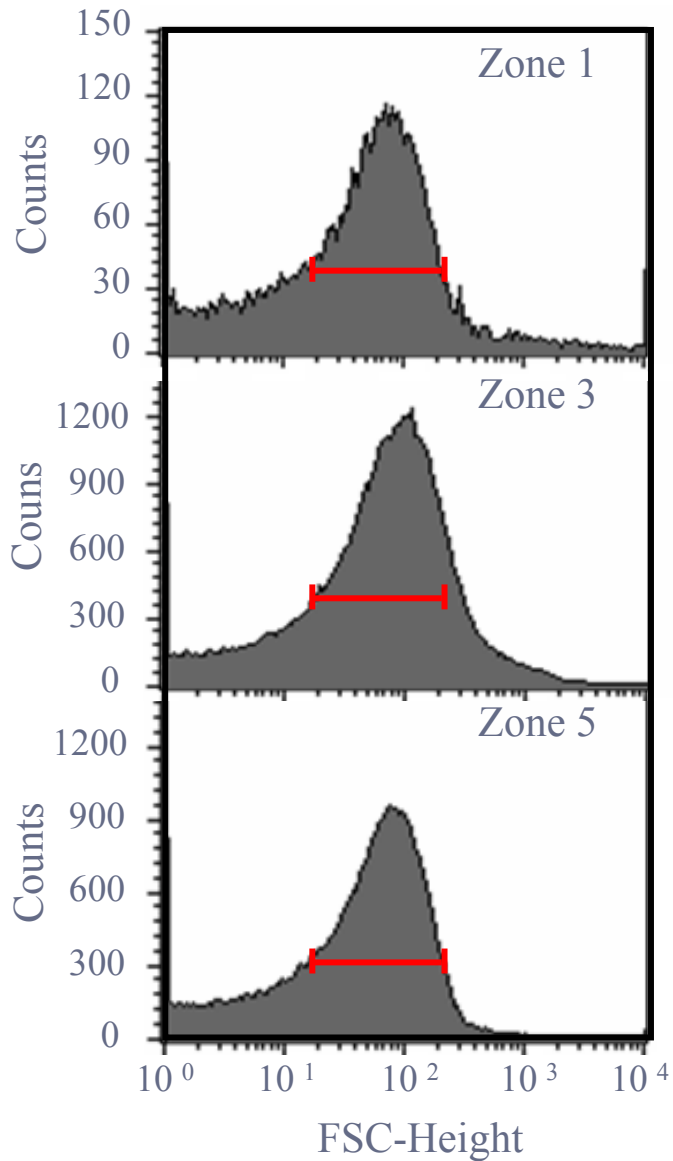
Fluxu-zitometroa



Neurtu ahal da:

- Barreiatutako argia (2 mota)
 - **Aurreko barreiatzea, FSL** (*forward scatter light*), tamainarekin erlazionatuta
 - **Alboko barreiatzea, SSL** (*side scatter light*), zelularen konplexutasunarekin eta barneko egiturekin erlazionatuta
- **Fluoreszentzia**

Fluxu-zitometria

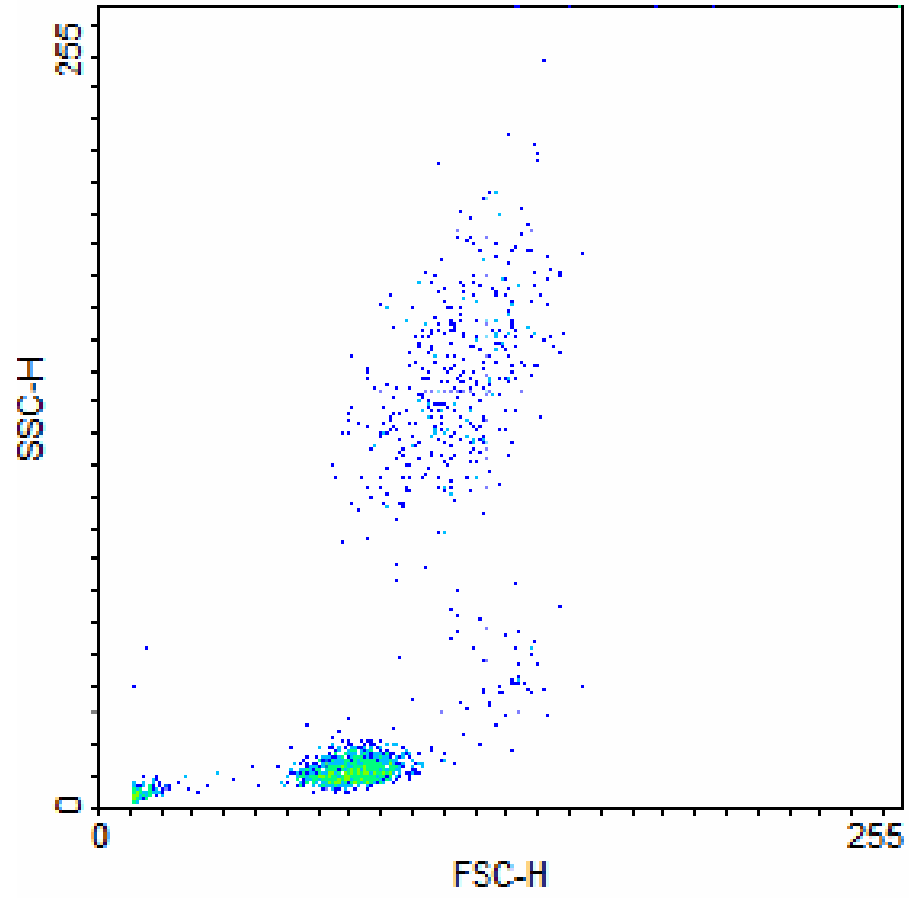


TAMAINA

BARNEKO KONPLEXUTASUNA

TEKNIKA ZUZENAK

Fluxu-zitometroa



TEKNIKA ZUZENAK

Fluxu-zitometroa



Partikulak eta mikroorganismoak bereiztu ahal dira.

Sistema batzuetan, zelulak fisikoki banan daitezke haien ezaugarrien arabera.

TEKNIKA ZUZENAK

Fluxu-zitometroa



- **Metodo azkarra.** Datuak berehala lortzen eta prozesatzen dira.
- **Sentikortasun handikoa**
- **Populazio edo zelula espezifikoaren bereizketa fisikoa.**
- **Arazoak.** Ekipoak oso garestiak dira
Prestaketa nekeza da
Zelulak ez dira ikusten

TEKNIKA EZ ZUZENAK



Mikroorganismoen kopuruarekin edo biomasarekin proportzionalki erlazionatuta dagoen parametro baten determinazio zuzena

- **Zelula kultibagarrien zenbaketa**
- **Uhertasunean oinarritutako metodoak**

TEKNIKA EZ ZUZENAK



- **Zelula bideragarrien kontaketa (zelula kultibagarriak)**
 - Hazkuntza-medio solidoetan egindako zenbaketak
 - Zenbaki probableenaren teknika (MPN)

- **Bakterio-populazioak aberasteko eta hautatzeko metodoak**

TEKNIKA EZ ZUZENAK

Kolonien kontaketa



- Kolonia bakoitza unitate kolonia-eratzaille batetik dator (UKE = CFU *colony-forming units*)
- Diluitzaile egokiaren aukeraketa
- Ereintza metodoaren aukeraketa
- Inkubazio-tenperaturaren aukeraketa
- Inkubazio-denboraren aukeraketa
- Hazkuntza-medioaren aukeraketa

TEKNIKA EZ ZUZENAK

Kolonien kontaketa

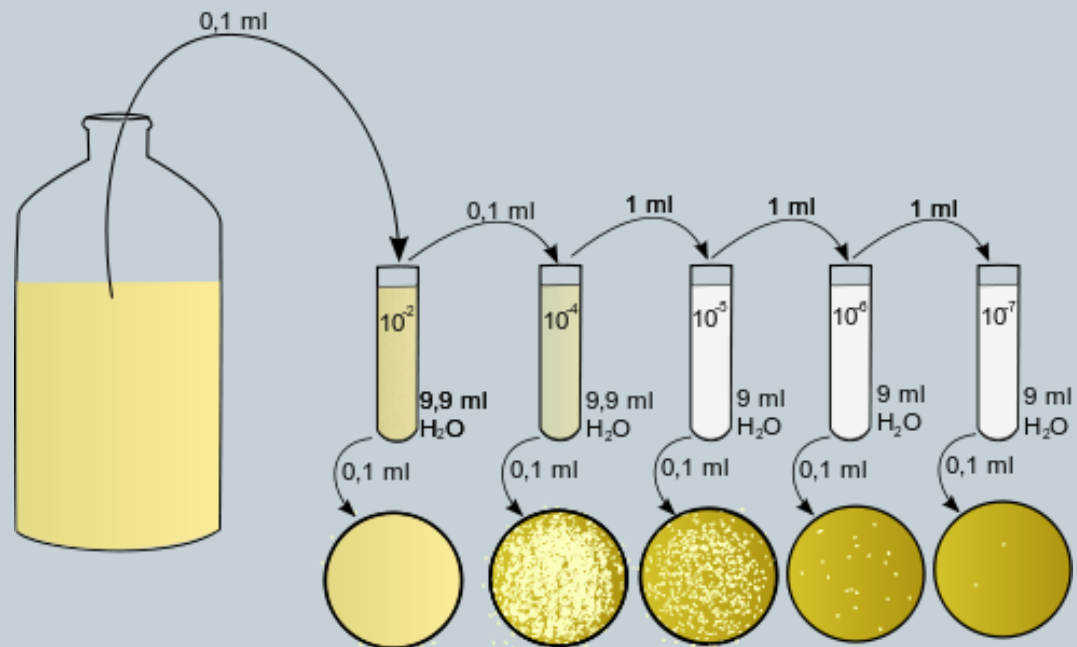


- **Kolonia bakoitza unitate kolonia-eratzaille baten dator (CFU)**
 - ➔ **Homogeneizatu**
- **Diluitzaile egokiaren aukeraketa**
- **Ereintza metodoaren aukeraketa**
- **Inkubazio-tenperaturaren aukeraketa**
- **Inkubazio-denboraren aukeraketa**
- **Hazkuntza-medioaren aukeraketa**

TEKNIKA EZ ZUZENAK

Kolonien kontaketa

- Kolonia bakoitza unitate kolonia-eratzaille baten dator (CFU)
- **Diluitzaile egokiaren aukeraketa**
 - Mota?
 - Diluzioa?
 - Temperatura?



TEKNIKA EZ ZUZENAK

Kolonien kontaketa



- Kolonia bakoitza unitate kolonia-eratzaille baten dator (CFU)
- Diluitzaile egokiaren aukeraketa
- **Ereintza metodoaren aukeraketa**
 - Barreiatze-metodoa?
 - Isurketa-metodoa?

TEKNIKA EZ ZUZENAK

Kolonien kontaketa



- Kolonia bakoitza unitate kolonia-eratzaille baten dator (CFU)
- Diluitzaile egokiaren aukeraketa
- Ereintza metodoaren aukeraketa
- **Inkubazio-tenperaturaren aukeraketa**
 - Inguruneko tenperatura?
 - Batezbesteko tenperatura?
 - Mikroorganismoaren arabera?

TEKNIKA EZ ZUZENAK

Kolonien kontaketa



- Kolonia bakoitza unitate kolonia-eratzailerik baten dator (CFU)
- Diluitzaile egokiaren aukeraketa
- Ereintza metodoaren aukeraketa
- Inkubazio-tenperaturaren aukeraketa
- **Inkubazio-denboraren aukeraketa**

TEKNIKA EZ ZUZENAK

Kolonien kontaketa



- Kolonia bakoitza unitate kolonia-eratzaille baten dator (CFU)
- Diluitzaile egokiaren aukeraketa
- Ereintza metodoaren aukeraketa
- Inkubazio-tenperaturaren aukeraketa
- Inkubazio-denboraren aukeraketa
- **Hazkuntza-medioaren aukeraketa**
 - Zelula guztiak zenbatzeko (posiblea bada)
 - Talde fisiologiko zehaztuak zenbatzeko
 - Hazkuntza-medio hautakorrak
 - Hazkuntza-medio bereizgarriak
 - Hazkuntza-medioak + antibiotikoak
 - Kaltetuak dauden zelula kultibagarriak zenbatzeko

TEKNIKA EZ ZUZENAK

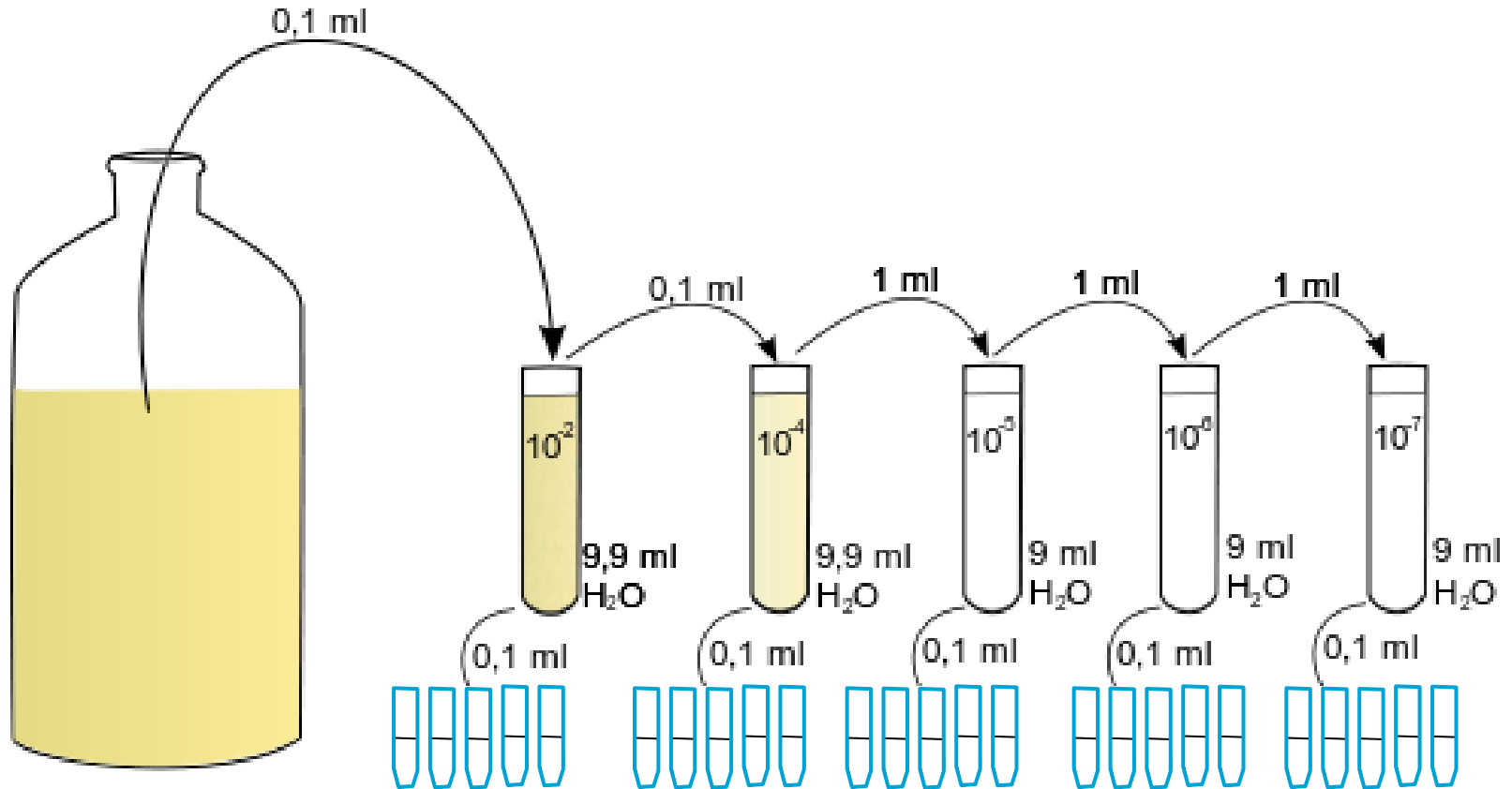
Kolonien kontaketa



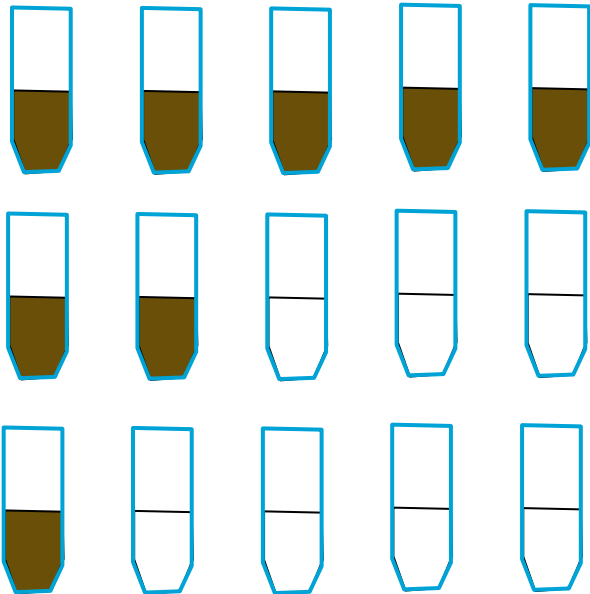
- Hazkuntza-medio **aberats eta ez hautakor** batean zenbatutako CFUak
 - **ZELULA KULTIBAGARRIAK (TOTALAK)**
- Hazkuntza-medio **minimo edo hautakor** batean zenbatutako CFUak
 - **KALTETUAK EZ DAUDEN ZELULA KULTIBAGARRIAK**
- CFU kultibagarriak – CFU kultibagarriak ez kaltetuak
 - **KALTETUAK DAUDEN ZELULA KULTIBAGARRIAK (BERRESKURAGARRIAK)**

TEKNIKA EZ ZUZENAK

Zenbaki Probableena (MPN)



MPN



5

2

1

nte Número más probable por g ó ml utilizando series de cinco tubos inoculados con 1, 0,1 y 0,01 ml ó g de muestra

Inoculación (ml ó g)	Resultados			NMP	Categoría		Límites de confianza			
	1	0,1	0,01		A	B	99 %		95 %	
Limite superior	0	0	1	0,2		×	<0,1	1,3	<0,1	1,0
	0	1	0	0,2	×		<0,1	1,4	<0,1	1,0
	1	0	0	0,2	×		<0,1	1,5	<0,1	1,1
9	1	0	1	0,4		×	0,1	1,9	0,1	1,5
	1	1	0	0,4	×		0,1	1,9	0,1	1,5
	1	2	0	0,6		×	0,1	2,3	0,2	1,8
13	2	0	0	0,4	×		0,1	2,2	0,1	1,7
	2	0	1	0,7		×	0,1	2,6	0,2	2,1
	2	1	0	0,7	×		0,1	2,6	0,2	2,1
20	2	1	1	0,9		×	0,2	3,1	0,3	2,5
	2	2	0	0,9	×		0,2	3,1	0,3	2,5
	3	0	0	0,8	×		0,1	3,1	0,3	2,5
21	3	0	1	1,1	×		0,2	3,7	0,4	2,9
	3	1	0	1,1	×		0,2	3,7	0,4	3,0
	3	1	1	1,4		×	0,4	4,3	0,6	3,5
23	3	2	0	1,4	×		0,4	4,3	0,6	3,5
	3	2	1	1,7		×	0,5	4,9	0,8	4,1
	3	3	0	1,7		×	0,5	5,0	0,8	4,1
36	4	0	0	1,3	×		0,3	4,9	0,5	3,9
	4	0	1	1,7	×		0,5	5,8	0,7	4,6
	4	1	0	1,7	×		0,5	5,9	0,7	4,7
37	4	1	1	2,1	×		0,6	6,8	0,9	5,5
	4	2	0	2,2	×		0,7	7,1	0,9	5,7
	4	2	1	2,6		×	0,8	8,1	1,2	6,6
44	4	3	0	2,7	×		0,9	8,3	1,3	6,8
	4	3	1	3,3		×	1,1	9,5	1,5	7,7
	4	4	0	3,4		×	1,2	9,8	1,5	8,1
47	5	0	0	2,3	×		0,6	11,6	0,9	8,7
	5	0	1	3,1	×		0,9	14,5	1,4	11,2
	5	1	0	3	×		1	16	1	12
80	5	1	1	5	×		1	20	2	15
	5	1	2	6		×	2	23	3	19
	5	2	0	5	×		1	22	2	17
80	5	2	1	7	×		2	27	3	21
	5	2	2	9		×	3	31	4	25
	5	3	0	8	×		2	32	3	25
120	5	3	1	11	×		3	38	4	30
	5	3	2	14	×		4	44	6	36
	5	4	0	13	×		3	50	5	39
130	5	4	1	17	×		5	61	7	48
	5	4	2	22	×		7	73	9	59
	5	4	3	28		×	9	87	13	70
180	5	4	4	35		×	12	101	16	83
	5	5	0	24	×		6	127	10	95
	5	5	1	30	×		10	180	10	130
200	5	5	2	50	×		10	250	20	200
	5	5	3	90	×		20	380	30	300
	5	5	4	160	×		40	700	60	530

Categoría A: Resultados normales, obtenidos en un 95 % de los casos.
 Categoría B: Resultados menos probables, obtenidos sólo en un 4 % de los casos. No deben utilizarse en decisiones importantes.
 Los resultados con una probabilidad inferior a la categoría B son siempre inaceptables y no figuran en la tabla.
 (J. C. de Man [1975] The probability of the most probable number. Eur. J. Appl. Microbiol. 1:72-77)

TEKNIKA EZ ZUZENAK

MPN



- **Probabilitatea. Metodo estatistikoa**
- **Diluitzaile egokiaren aukeraketa:**
 - **Mota**
 - **Diluzioa**
 - **Tenperatura**

TEKNIKA EZ ZUZENAK

MPN



- Probabilitatea. Metodo estatistikoa
- Diluitzaile egokiaren aukeraketa
- **Ereintza metodoaren aukeraketa**
 - Zenbat saio-hodi
 - Ereindako bolumena

TEKNIKA EZ ZUZENAK

MPN



- Probabilitatea. Metodo estadistikoa
- Diluitzaile egokiaren aukeraketa
- Ereintza metodoaren aukeraketa
- **Inkubazio-tenperaturaren aukeraketa**
- **Inkubazio-denboraren aukeraketa**
- **Hazkuntza-medioaren aukeraketa**
 - Zelula guztiak zenbatzeko (posiblea bada)
 - Talde fisiologiko zehaztuak zenbatzeko
 - Hazkuntza-medio hautakorrak
 - Hazkuntza-medio bereizgarriak
 - Hazkuntza-medioak + antibiotikoak

TEKNIKA EZ ZUZENAK

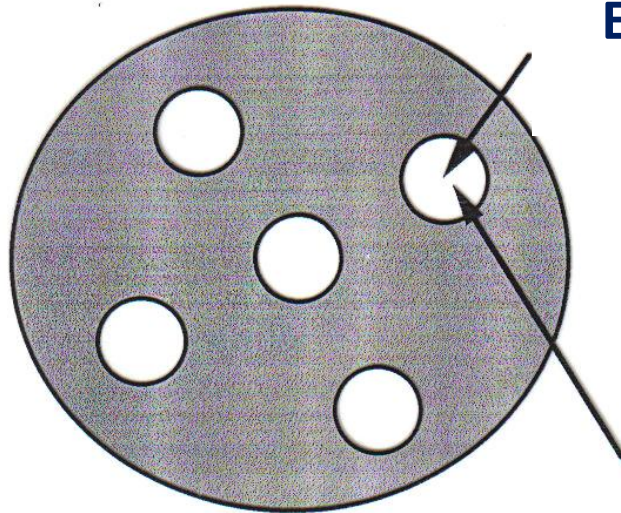
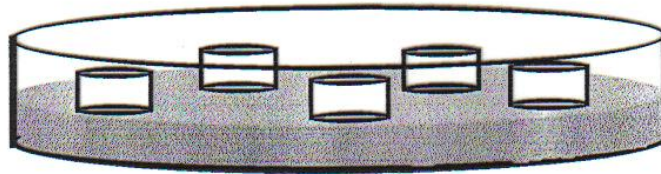
MPN



- **Bakterioak**
- **Protozoak. Singh metodoa.**
- **Birusak. Bakteriofagoak.**

PROTOZOEN ZENBAKETA

Singh metodoa



Erpen esekidura
(*E. coli*)

LAGINA

INKUBATU ETA EMAITZA IKUSI

ZENBAKETA EZ ZUZENAK



- **Bakterio-populazioak aberasteko eta hautatzeko metodoak**
 - **Aberastea**

MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA



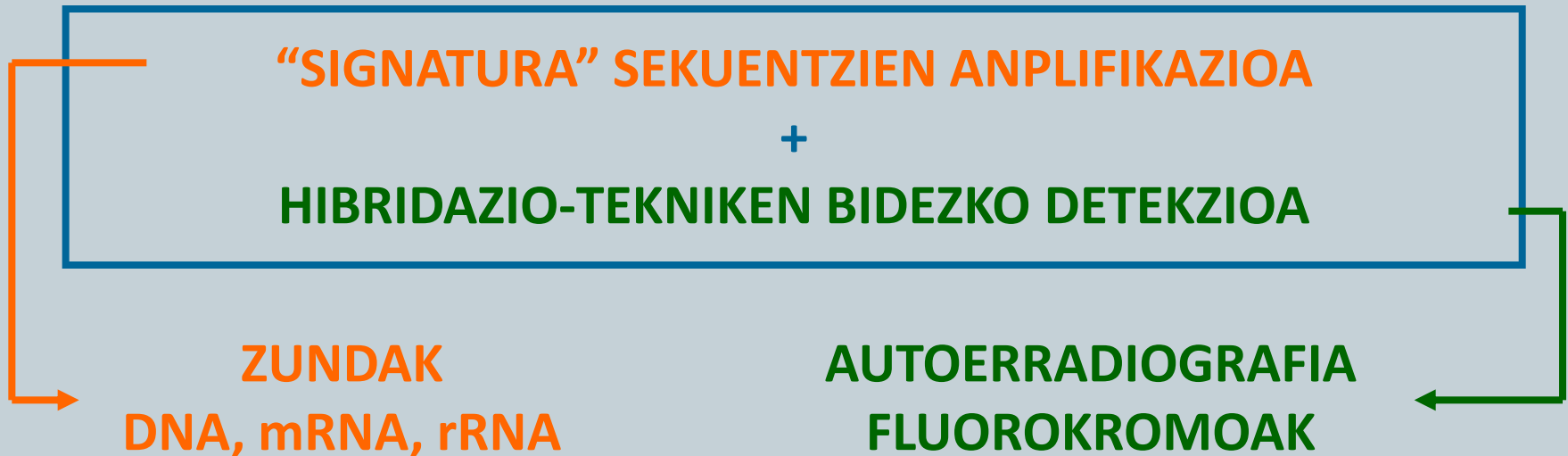
- **Detekzio molekularra**
 - **Zunda genetikoak**
 - **PCR polimerasa**
 - ***Fingerprinting-a***

MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA

Detekzio molekularra

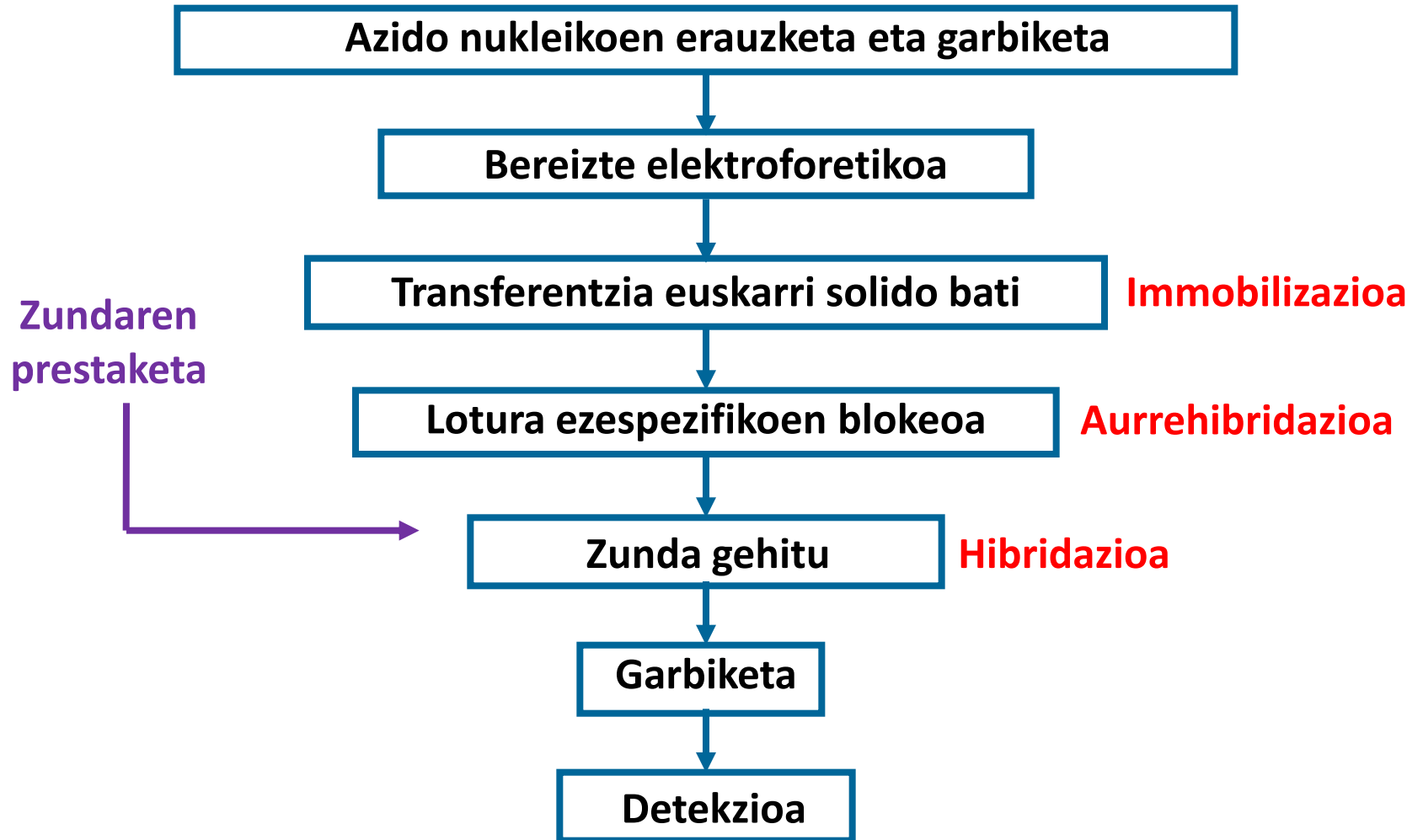


Metodo molekularren bidez mikroorganismo-populazio espezifikoak detekta daitezke kultiborik gabe.



MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA

Detekzio molekularra



MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA

Detekzio molekularra



Gene espezifikoak mikroorganismo espezifikoekin erlazionatzen dira.

Metodo hauek ez dute eskatzen hazkuntzarik ezta behaketarik ere.

Hasierako modeloa: PCR

- **PCR**
- **DGGE** (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
- **Klonazio molekularra**
- ***Microarray*** (Mikromatrizeak)
- **DNAren sekuentziazioa eta analisisia**

MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA

Detekzio molekularra



Tindaketa genetikoak. Fluorokromoekin markatutako oligonukleotidoen zunda (koloratzaile filogenetikoak)

Behaketan oinarritutako metodoak, ez dute hazkuntzarik behar.

FISHen oinarrituak (*fluorescence in situ hybridization*)

- FISH (16s edo 18s rRNA)
- Kromosomen tindaketa (genoma)
- *in situ* alderantzizko transkripzioa (ISRT) (mRNA)

MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA

Detekzio molekularra



Tindaketa genetikoak *in situ* egindako hibridazio fluoreszentea (FISH)

- “Signatura” sekuentzien koloratzaile filogenetikoa
 - 16s rRNA (prokariotoak)
 - 18s rRNA (eukariotoak)
- Espezifikotasun-gradua
- Zunda filogenetiko anitzak

MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA

Detekzio molekularra



Tindaketa genetikoak Kromosomen tindaketa

- Gene baten edo hainbat gene osoen sekuentzien koloratzaile filogenetikoak
- Gene espezifikoak identifikatzen ditu (adibidez nitrogenasa)
- Lagin batean gene hori duten organismoak detektatzeko

MIKROORGANISMOEN DETEKZIOA

Detekzio molekularra



Tindaketa genetikoak *in situ* alderantzizko transkripzioa (ISRT)

- Momentu batean gene zehaztuak adierazten dituzten mikroorganismoen koloratzaile filogenetikoa
- mRNA-zunda – **alderantzizko transkripzioa** –DNA – **anplifikazioa** – DNA-zunda

Ward DM (2006) Microbial diversity in natural environments: focusing on fundamental questions. *Antonie van Leeuwenhoek* 90:309–324.