



5. GAIA

BAKTERIO AKTIBOEN ZENBAKETA



- **SARRERA**
- **MIKROORGANISMOEN JARDUERA NEURTZEKO METODOAK**
 - Jarduera orokorrak
 - Jarduera espezifikoak
 - Hazkuntzarekin erlazionatutako neurriak
- **HARRAPARITZA NEURTZEKO METODOAK**
- **BAKTERIOEN HERIOTZA**

JARDUERAREN IKERKETA



Ingurumeneko bakterioak zenbatzen direnean, bakterio kultibagarrien eta bakterio totalen arteko diferentzia handiak antzematen dira.

Kasu hauetan, koloniak eratzeko gaitasunik gabeko mikroorganismoen egoera fisiologikoa ezagutzea interesgarria izan daiteke. Horretarako, bakterio aktiboak kuantifikatzeko teknikak garatu ziren.

JARDUERAREN IKERKETA



➤ Populazioaren jarduera

- Populazioak egiten duen jarduera
- Adibidez: **CO₂ ekoizpena**

➤ Zelulen jarduera

- Jarduera jakin bat egiten duen zelula kopurua
- Adibidez: **Arnasketa egiten duen zelula kopurua**

JARDUERAREN IKERKETA



➤ **Jarduera erreala**

Aurretiko baldintzak ez dira aldatzen proban zehar

➤ **Jarduera potentziala**

Aurretiko baldintzak (1 edo gehiago) aldatu behar dira jarduera neurtzeko

Elikagaien kontzentrazioa

Temperatura

Populazioen ezabapena

Ez-ohiko substratua

Botila efektua

JARDUERAREN IKERKETA



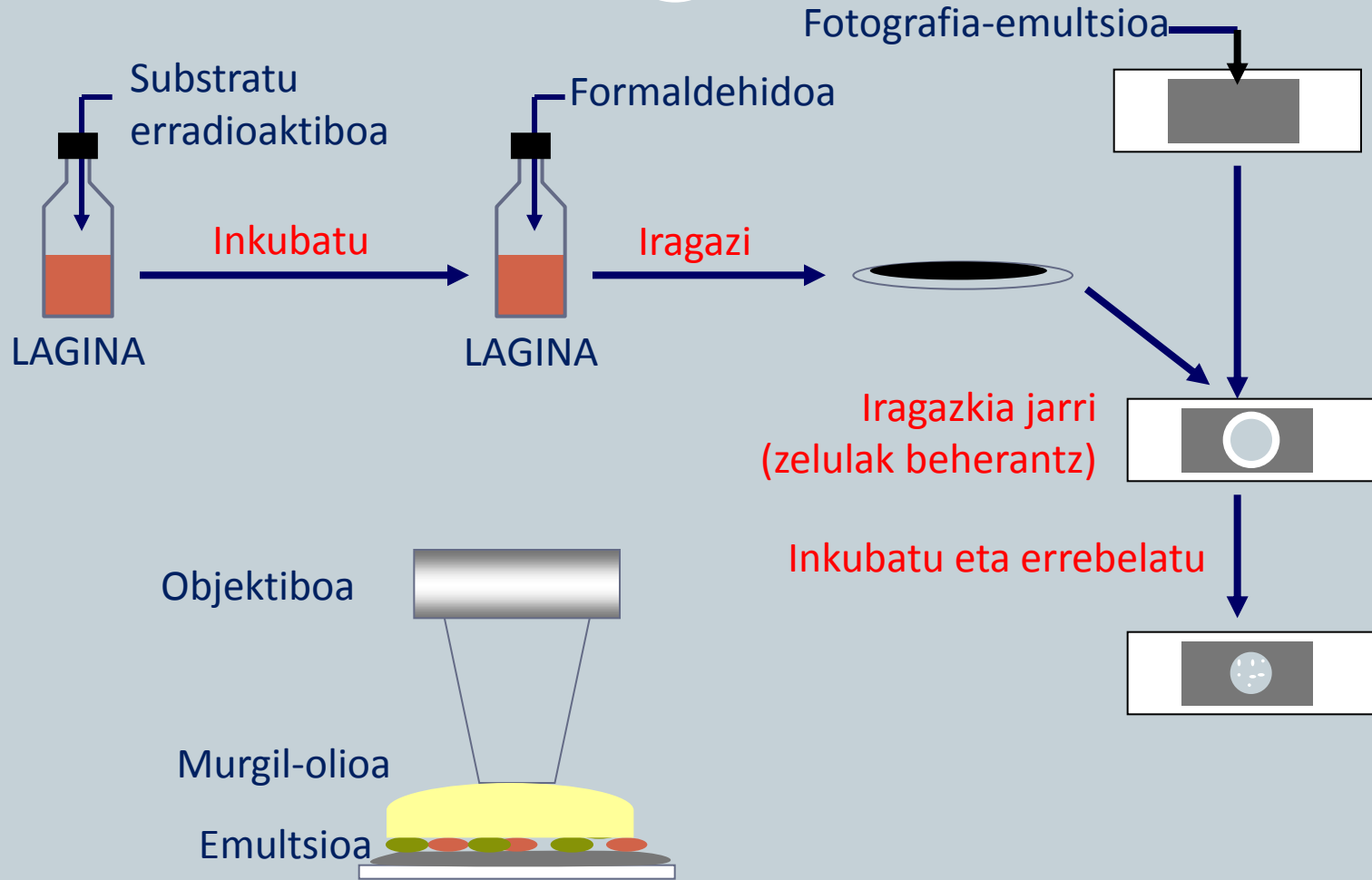
- **Jarduera espezifikoak. Jarduera zehaztuak**
 - Makromolekulen hidrolisia
 - Jarduera entzimatarren kuantifikazioa
- **Jarduera ez-espezifikoak**
 - Jarduera heterotrofoa
 - Elektroien garraioa
- **Jardueraren emaitza globala**
 - Hazkuntza-abiadura
 - Eliminazio-abiadura

JARDUERAK KUANTIFIKATZEKO TEKNIKAK



- **Adenilato *pool*-a eta karga energetikoa**
 - Substratu-hartzea
 - Mikroautoerradiografia
 - Potentzial autotrofoa
 - Potentzial heterotrofoa
- **Mintz-zitoplasmatikoaren osotasuna**
- **Kate elektro-garratzailearen jarduera**
- **Jarduera entzimatiakoak**
- **Hazkuntzarekin erlazionatutako jarduerak**
 - Mikroorganismo-kopuruaren igotzea
 - Mikrokolonien zenbaketa
 - Zatitzen ari diren zelulen ehunekoa
 - Luzatzeko gai diren bakterioak
 - DNAren sintesi abiadura. Timidina-H³-hartzea
- **Bakterioen gain egindako harraparitzaren estimazioa**

MIKROAUTOERRADIOGRAFIA



POTENZIAL AUTOTROFIKOA



CO₂ hartze autotrofoa eta heterotrofoa. Aurretiko inkubazioa C¹⁴-CO₂ -rekin

Ikerketa egin baino lehen:

Bakterioak ez diren organismoek ere CO₂ asimilatu dezakete, saihesteko:

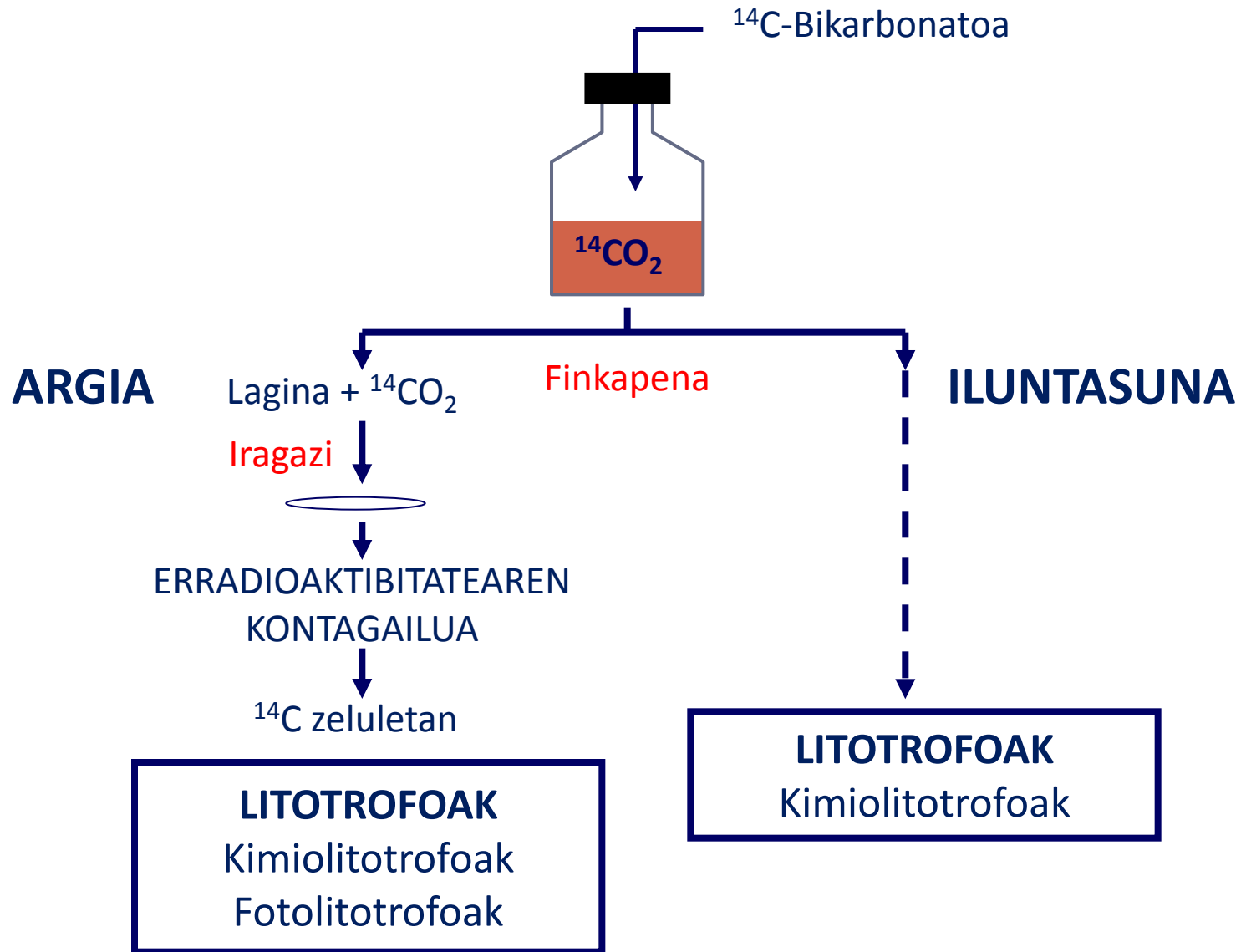
→ **Laginaren zatiketa**

Bakterio fototrofo (autotrofoak eta zianobakterioak) eta ez-fototrofoen arteko bereizketa:

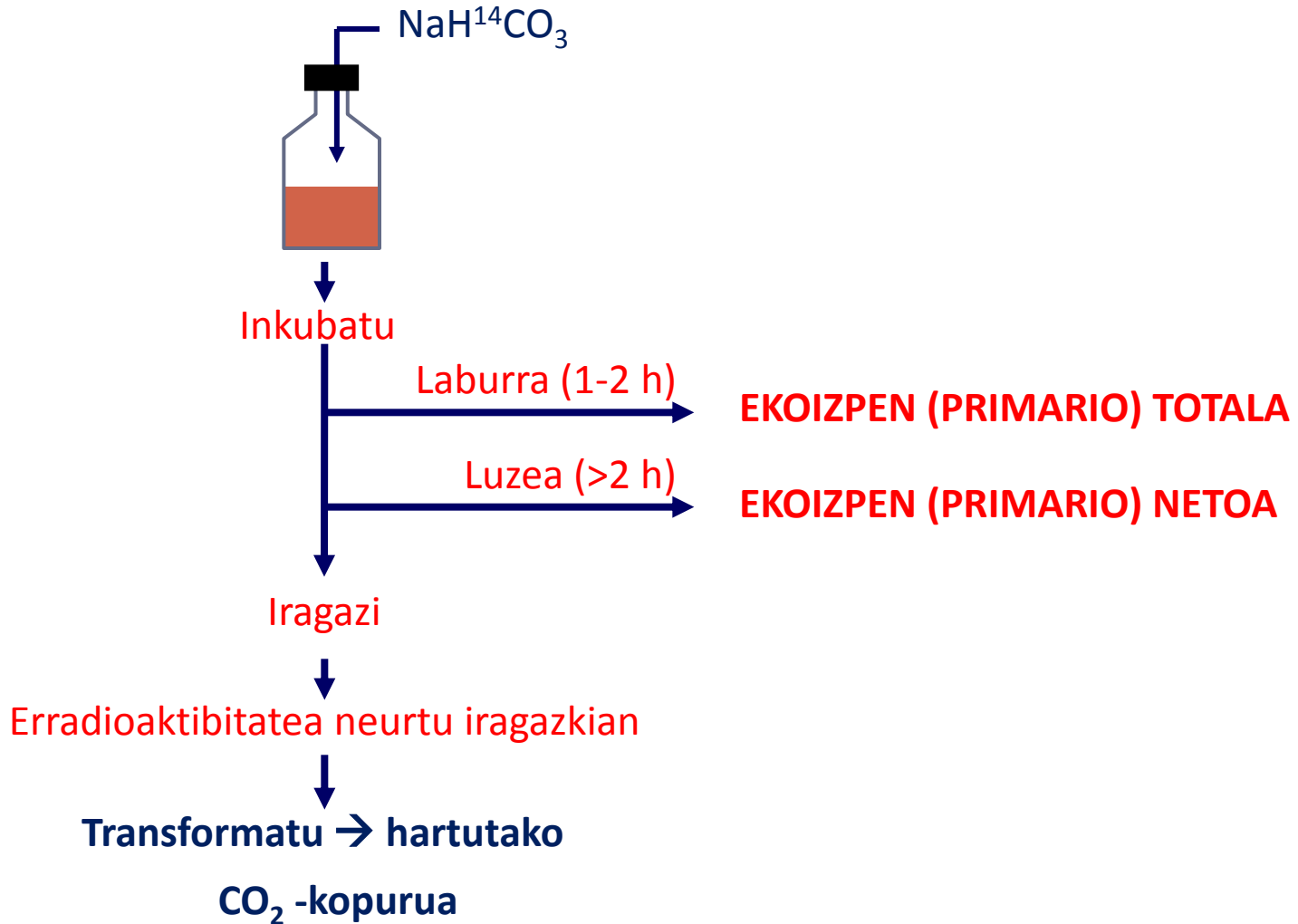
Paraleloan inkubatu, iluntasunean eta argiarekin

$[\text{CO}_2]_{\text{argian}} - [\text{CO}_2]_{\text{iluntasunean}} = [\text{CO}_2]_{\text{argian}}$ autotrofikoki

JARDUERA PRIMARIOA



JARDUERA PRIMARIOA



JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA



- **Substratu markatuen hartze-abiadurak neurtu**
 - **Pm baxuko konposatuen sartzea**
- **Substratuaren kontzentrazio asetzaileak**
- **Substratuen hautaketa (ez *naturalak*)**

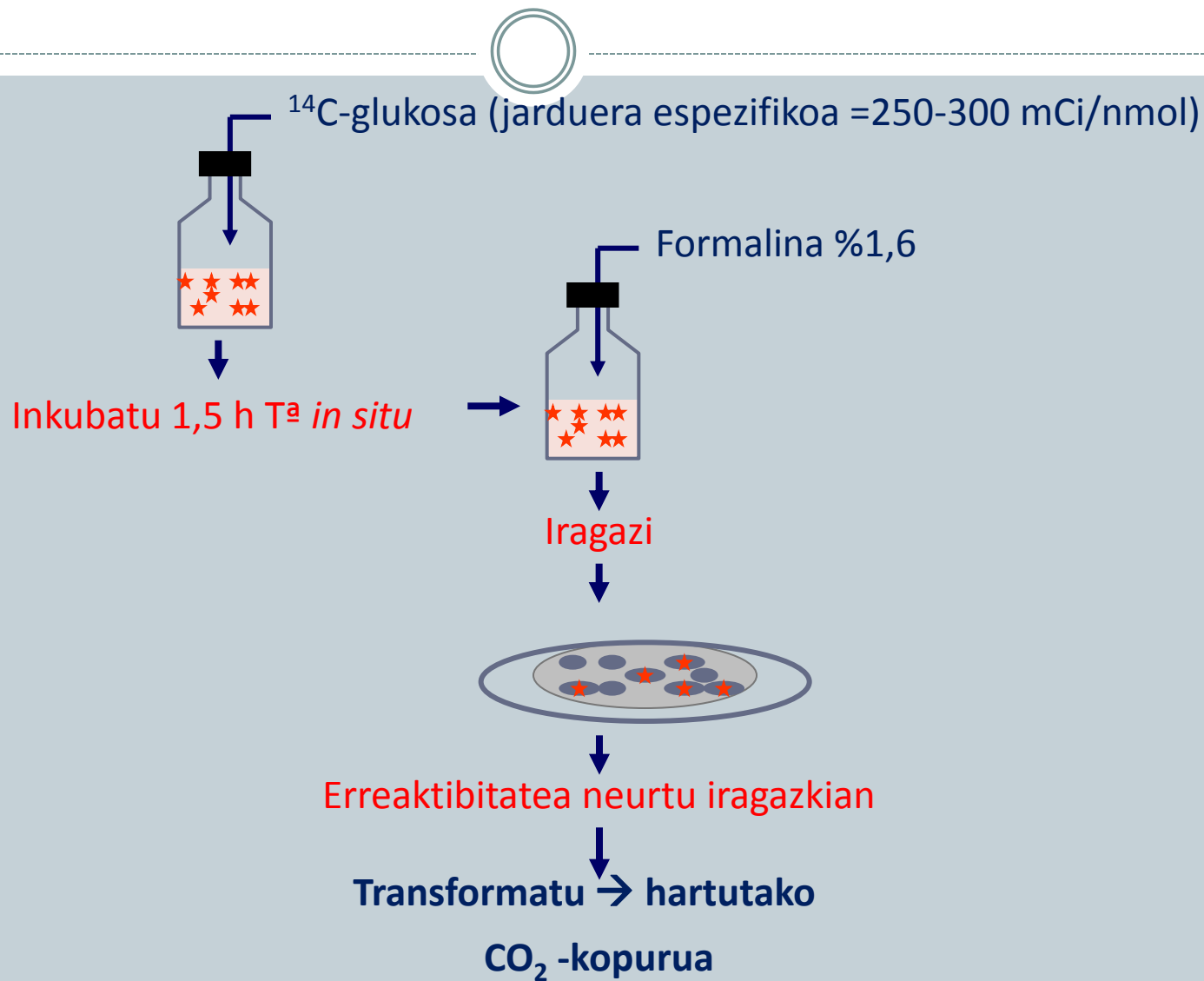
JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA

Glukosa hartzea



- **Substratu unibertsala**
- **Sistema natural guztietan dago baina kontzentrazio baxuan**
- **Gehitutako kontzentrazio baxua + inkubazio laburra = bakterio-jarduera**
- **Neurri erlatiboa, beste substratu batzuk?**

JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA



JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA

Parsons & Strickland-ren formula



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

V = substratu hartzearen abiadura (mg/l h)

c = iragazkiaren erradioaktibitatea (dpm)

f = zuzentze-faktorea (demagun f = 1)

S_n = substratuaren kontzentrazio "naturala" (mg/l)

A = substratuaren gehitutako kontzentrazio (mg/l)

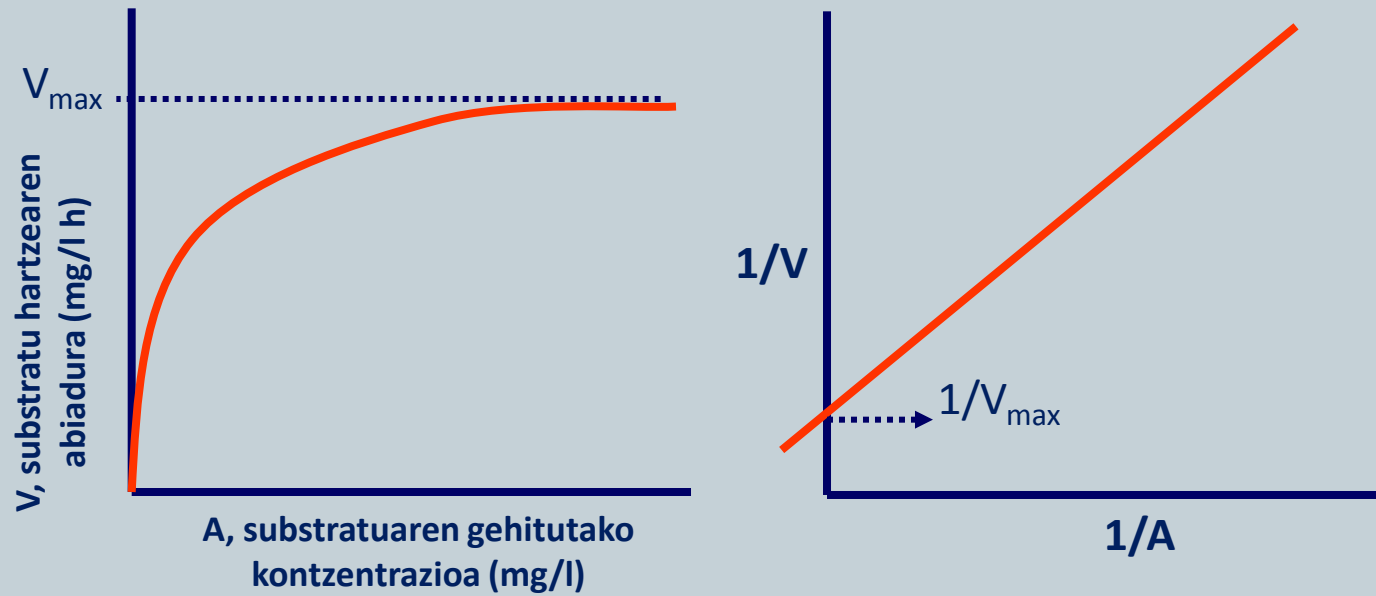
C = ¹⁴C-ren mCurio batek minutu batean sortutako desintegrazioak (dpm).

Konstantea da.

n = A-n gehitutako mCurio-ak

t = inkubazio-denbora (h)

JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA



JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA

Glukosa hartzea



V_{\max} = substratu-kontzentrazio asetzaileetan,
substratu-hartzearen abiadura maximoa

Sistema baten bakterio-populazioaren potentzial
heterotrofoa

Ingurune-aldaketarekiko sentikorra

Balio handia dauka desberdintasun espazialak eta
urtarokoak konparatzeko.

Populazioaren kide guztiek modu berean erantzuten
dutela suposatzen du.

JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA

Glukosa hartzea



V_t = substratuarekiko afinitatea (K_m , K_s)

T_t = Ordezko denbora. Populazio heterotrofoak behar duen denbora laginean dagoen substratu kontzentrazio bera hartzeko

$V_{max}/Dentsitatea$ = Jarduera heterotrofo espezifikoa (mg/bakterio h). Zelulen jarduerara hurbilketa.

JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA

Glukosa hartzea

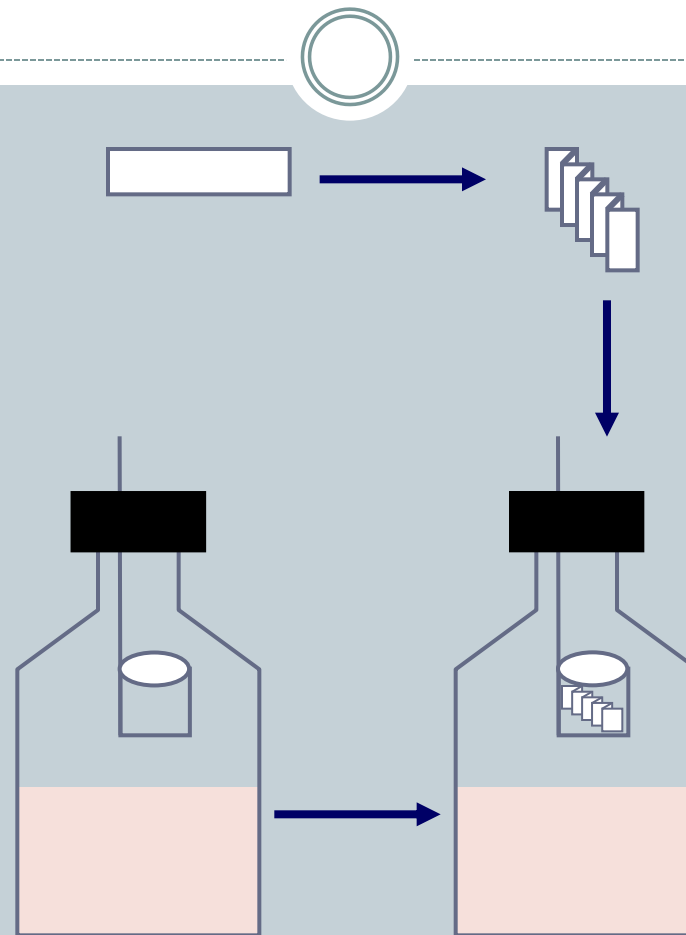


Asimilatutako substratua (frakzioa)

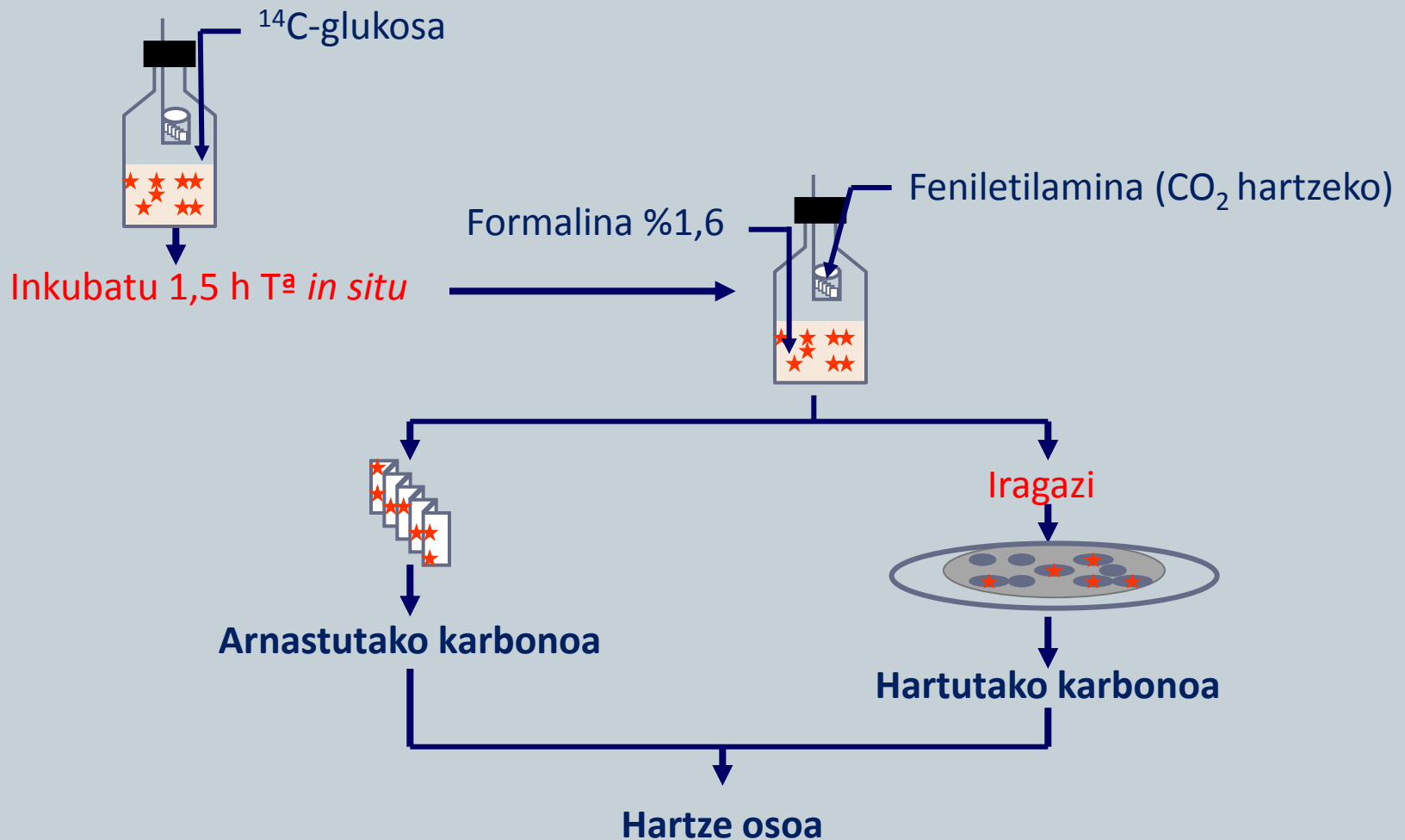
Arnastutako frakzioa?

Hartze osoa?

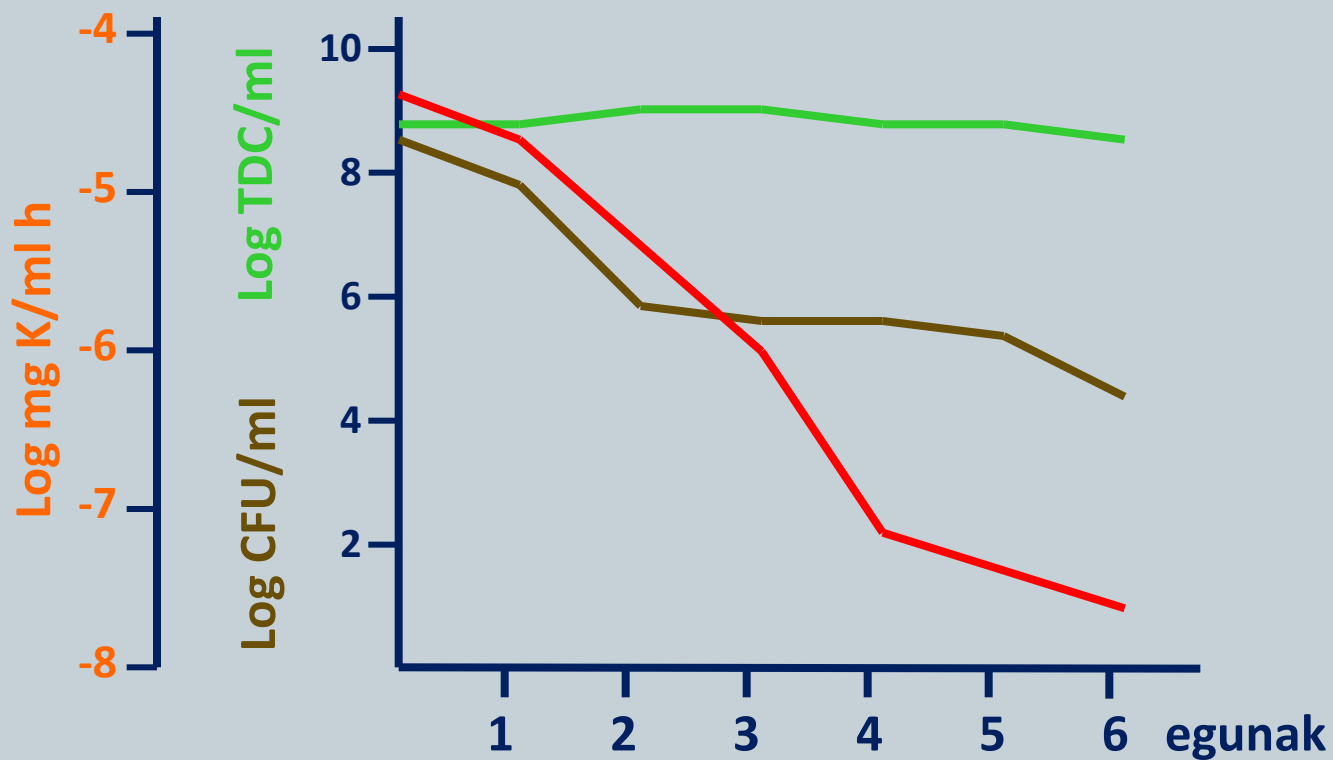
JARDUERA POTENZIAL HETEROTROFOA



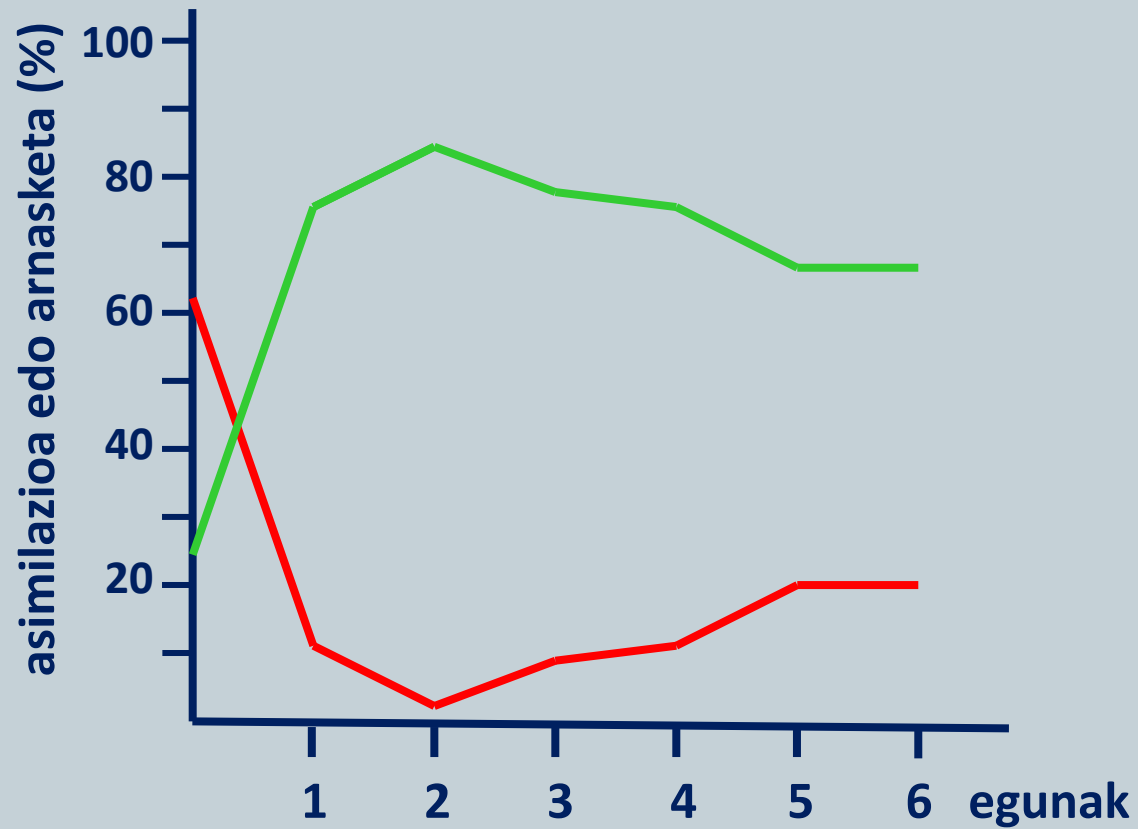
JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA



JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA



JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA



JARDUERA POTENTZIAL HETEROTROFOA

Glukosa hartzea



- Suposatzen da populazioaren kide guztiek modu berean erantzuten diotela substruari.
- CO₂-z gain, beste substantzia lurrunkor batzuk ekoiztu ahal dira.
- Hainbat substratu markatuak (erradioaktiboak) proposatu dira:
 - Glukosa eta beste karbohidrato batzuk
 - Glutamatoa eta beste aminoazido batzuk
 - Algek fotosintetikoki ekoiztutako produktuak, ¹⁴CO₂P-tik abiatuz
 - Konposatu espezializatuak
- Substratu ez erradioaktiboak proposatu dira:
 - Substratu fluorogenikoak/kromogenikoak
 - 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino-2-dioxiglukosa) (fluorogenikoa)

MINTZ ZITOPLASMATIKOAREN OSOTASUNA

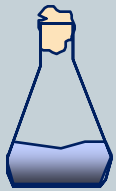


- Koloratzaileen konbinazioa
 - Emisio-espektro desberdina
 - Mintza zeharkatzeko gaitasun desberdina
- *Live/Dead BacLight* Kita
 - SYTO9 – zelula guztietan sartzen da. Fluoreszentzia berdea.
 - Propidio ioduro – kaltetutako zelula mintzak bakarrik zeharkatzen ditu. Fluoreszentzia gorria.
- **Kalterik gabeko zelulak edo MEMB+**
Kaltetutako zelulak edo MEMB-
Zelula totalak = **Berdeak** + **Gorriak**

MINTZ ZITOPLASMATIKOAREN OSOTASUNA



LAGINA



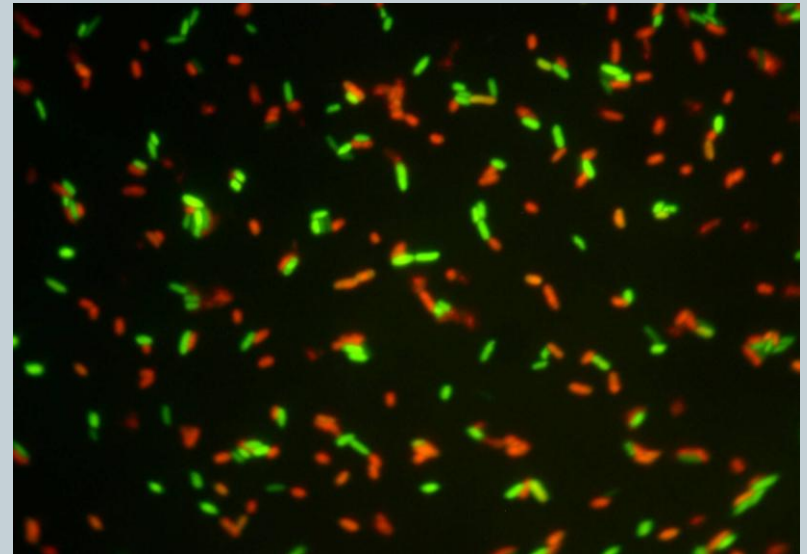
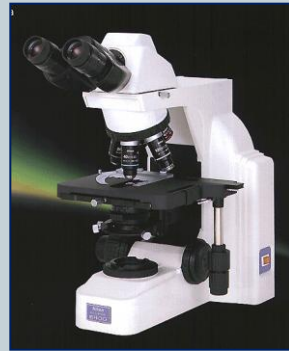
1,5 μ l Syto 9
+
1,5 μ l IP
+
1 ml lagin



30 minutu
Giro-tenperatura



Epifluoreszentzia
mikroskopioa



KATE ELEKTROI-GARRATZAILEAREN JARDUERA



INT: 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil**tetrazolio** kloruroa

CTC: 5-ziano-2,3-ditolil**tetrazolio** kloruroa

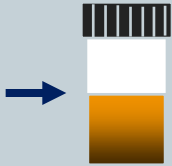
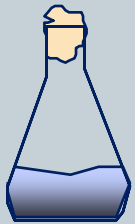


KATE ELEKTROI-GARRATZAILEAREN JARDUERA



Epifluoreszentzia mikroskopia

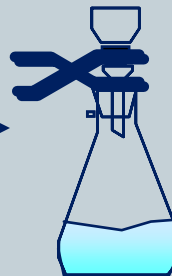
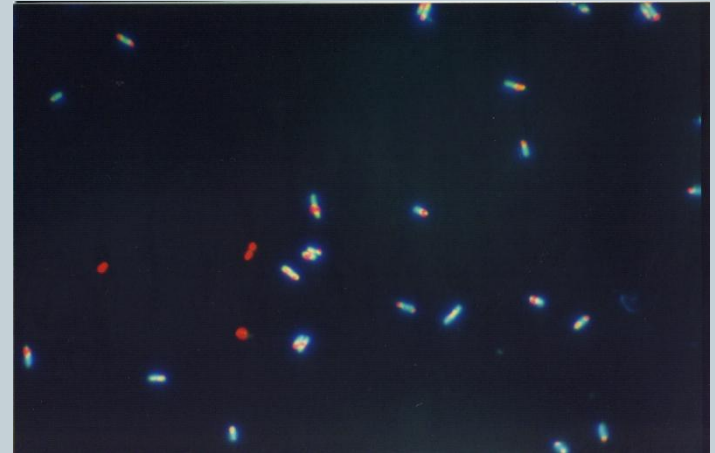
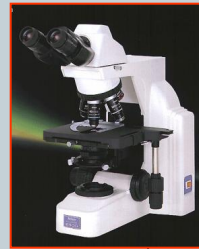
LAGINA



50 μ l TSB +
100 μ l CTC (5mM) +
1 ml lagin

3 ordu
Giro-tenperatura
120 r.p.m

Tindaketa
DAPI



KATE ELEKTROI-GARRATZAILEAREN JARDUERA



- **CTC⁺ zelulak:** Zelula urdinak **puntu gorriekin**
- **CTC⁻ zelulak:** Zelula urdinak puntu gorriarik gabe
- **Zelula totalak:** Zelula urdin guztiak

JARDUERA ENTZIMATIKOAK



- Frakzio handi baten jardueraren ondorioz
 - Deshidrogenasa
 - Estearasa
 - Fosfatasa
 -

- Frakzio txiki baten jardueraren ondorioz
 - Zelulasa
 - Kitinasa
 - Nitrogenasa
 -

JARDUERA ENTZIMATIKOAK



- **Jariatuak (Lagina iragazi)**
 - Gainjalkina = Zelula kanpokoak
 - Iragazkia = Ektoentzimatikoak
- **Zelula barnekoak**

JARDUERA ENTZIMATIKOAK

Metodoak



- Metodo kimiko tradizionalak
- Metodo erradioaktiboak
- Metodo kromogenikoak
- Metodo fluorogenikoak

JARDUERA ENTZIMATIKOAK

Jarduera	Sustratua	Teknika
Fosfatasa	Nitrofenol-P MUF-P	Kolorimetria Fluorimetria
Proteasa	Gelatina ¹²⁵ I-Albumina	Hidrolisia. Hondar-gelatina Askatutako isotopo- kantitatea
Amilasa	Almidoia	Hondar-almidoia
Kitinasa	Kitina ¹⁴ C-Kitina/ ³ H-Kitina	Azukreak Askatutako isotopo-kantitatea
Zelulasa	Karboxil-zelulosa	Biskositatearen aldaketa/Azukreak
Deshidrogenasa	INT	Kolorimetria (INT-Formazan)
Nitrogenasa	Azetilenoa	Etilenoa
Nitrato erreduktasa	Nitratoa	Hondar-nitratoa/ Nitrogenoa/oxido nitrosoa
b-D-Galaktosidasa	MUF-Galaktosa	Fluorimetria
b-D-Glukuronidasa	MUF-Glukuronikoa	Fluorimetria

ZATITZEN ARI DIREN ZELULEN EHUNEKOA

Frequency of Dividing Cells (FDC)

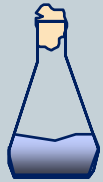


- Prestakinak egin eta epifluoreszentzia mikroskopioan hurrengoak zenbatu:
 - Trenkada duten zelulak (zatitzen ari diren zelulak)
 - Zelula guztiak
- Zatitzen ari diren zelulen ehunekoa kalkulatu
- Zaila eta subjektiboa da, batez ere, zelulak elkartuak badaude

ZATITZEN ARI DIREN ZELULEN PORTZENTAJEA

Frequency of Dividing Cells (FDC)

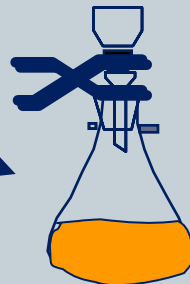
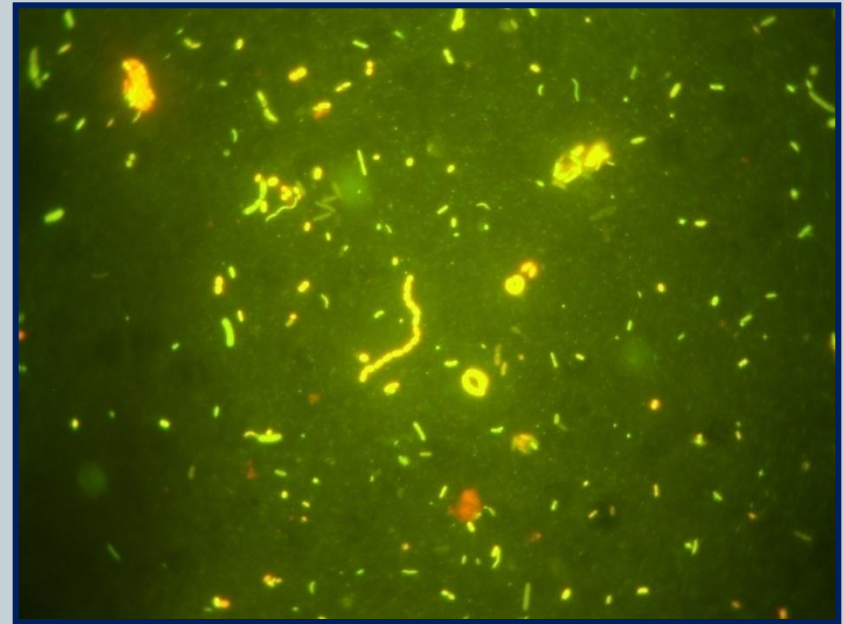
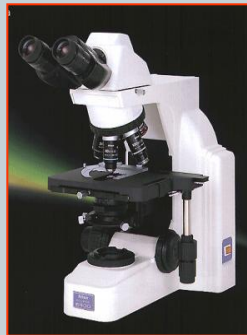
LAGINA



1 ml lagingin
+
2 ml AO

2 minutu
Giro-temperatura

Epifluoreszentzia
mikroskopia



LUZATZEKO GAI DIREN BAKTERIOAK

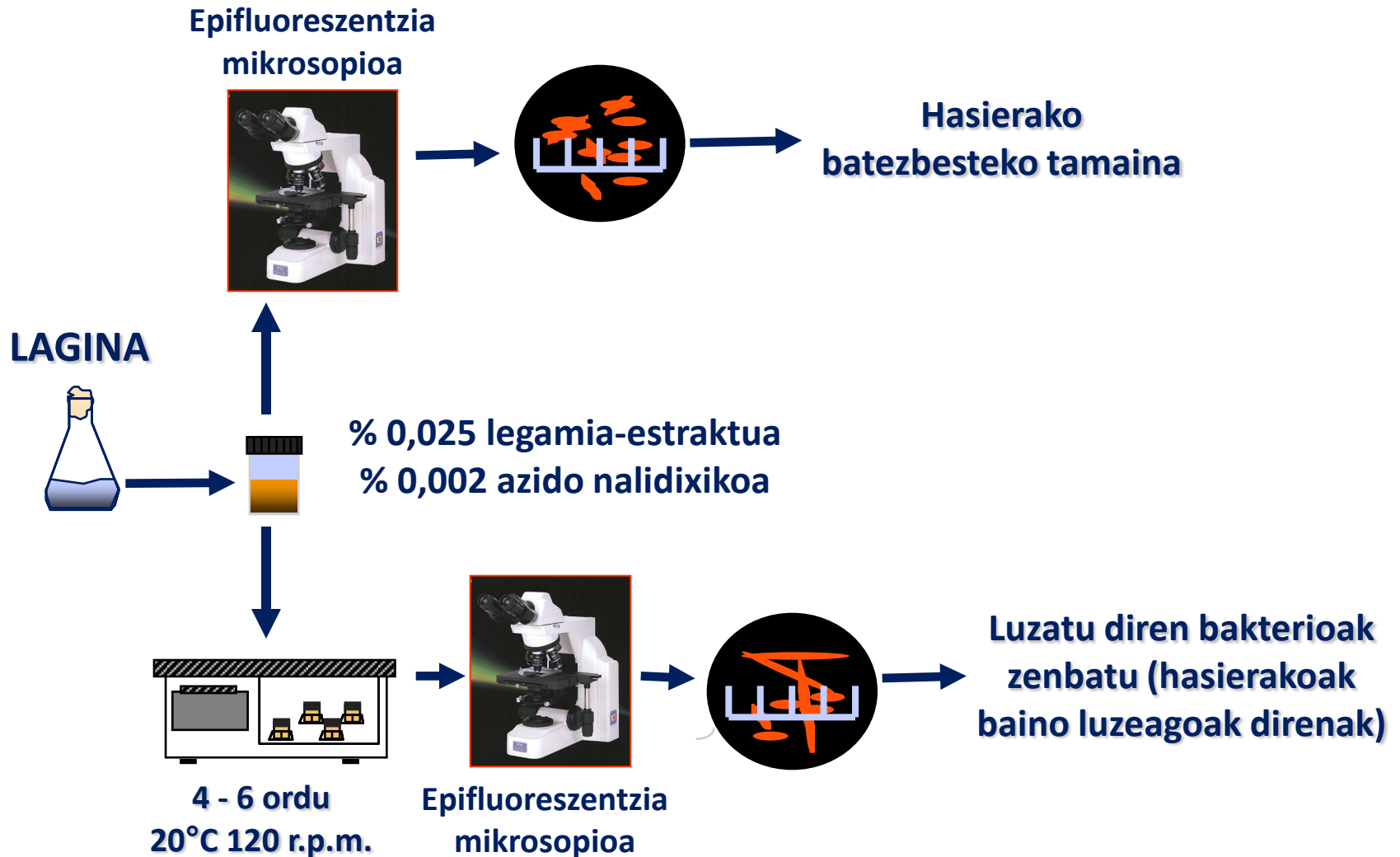
Direct Viable Count (DVD)



- Elikagaiak hartzeko eta luzatzeko gaitasuna (gaitasun biosintetikoa) duten bakterioak, zatiketa zelularren inhibitzaileak daudenean.
 - Elikagaiak kantitate txikietan. Elikagai sinpleak edo zelula gehienek erabil ditzaketen nahaste konplexuak
 - DNA-erreplikazioaren inhibitzaileak: azido nalidixikoa, ziprofloxazinoa,

LUZATZEKO GAI DIREN BAKTERIOAK

Direct Viable Count (DVD)



LUZATZEKO GAI DIREN BAKTERIOAK

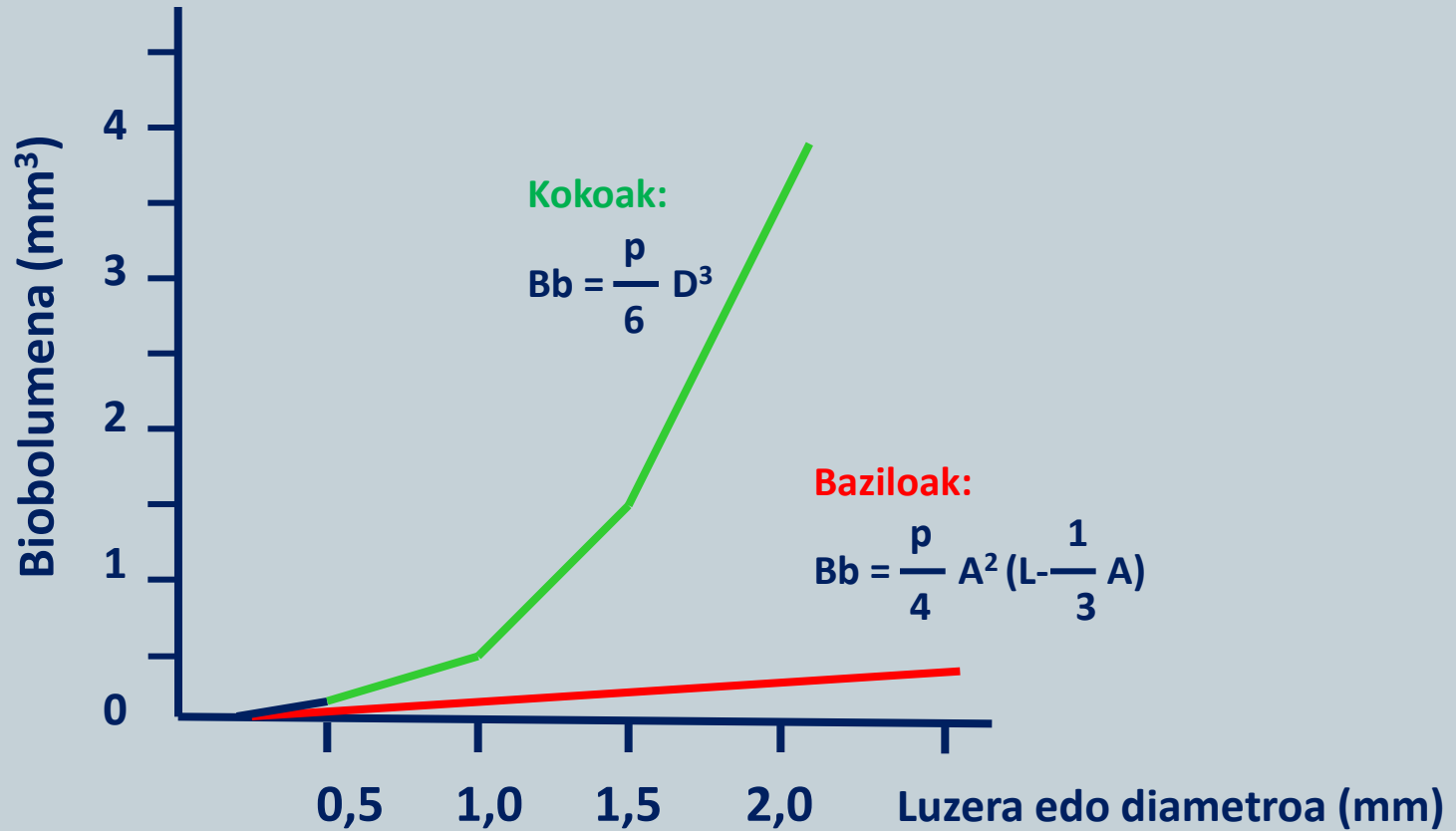
Direct Viable Count (DVD)



- Elikagaiak hartzeko eta luzatzeko gaitasuna (gaitasun biosintetikoa) duten bakterioak, zatiketa zelularren inhibitzaileak daudenean.
 - Elikagaiak kantitate txikietan. Elikagai sinpleak o zelula gehienek erabil ditzaketen nahaste konplexuak
 - DNA-erreplikazioaren inhibitzaileak: azido nalidixikoa, ziprofloxazinoa,
 - Zenbat luzatu behar dira aktiboak direla esateko?

LUZATZEKO GAI DIREN BAKTERIOAK

Direct Viable Count (DVD)



DNAren SINTESI ABIADURA (BAKTERIOEN EKOIZPENA)

Timidina-H³-hartzea



- Timidina kontzentrazio baxuetan eta denbora motzean hartzen duten mikroorganismo bakarrak bakterioak dira.
- Hazten ari ez diren bakterioek ez dute timidinarik hartzen.
- Hazten ari diren bakterioek timidina hartzen dute.

BAKTERIOEN GAIN EGINDAKO HARRAPARITZAREN ESTIMAZIOA



- Bakterioen hazkuntza-abiaduraren aldaketak (harrapari presentziaren arabera)
 - Inhibitzaile metabolikoak
- Markatutako partikulen ingestioa
 - Latex-bolak
 - Bakterio erradioaktiboak
 - Bakterio fluoreszenteak

BAKTERIOEN GAIN EGINDAKO HARRAPARITZAREN ESTIMAZIOA

Bakterio fluoreszenteak



- Informazio asko dago fenomenoari buruz.
- Erraz ikusten da, baita denbora luzeetan zehar ere.
- Kontserbazio erraza da.

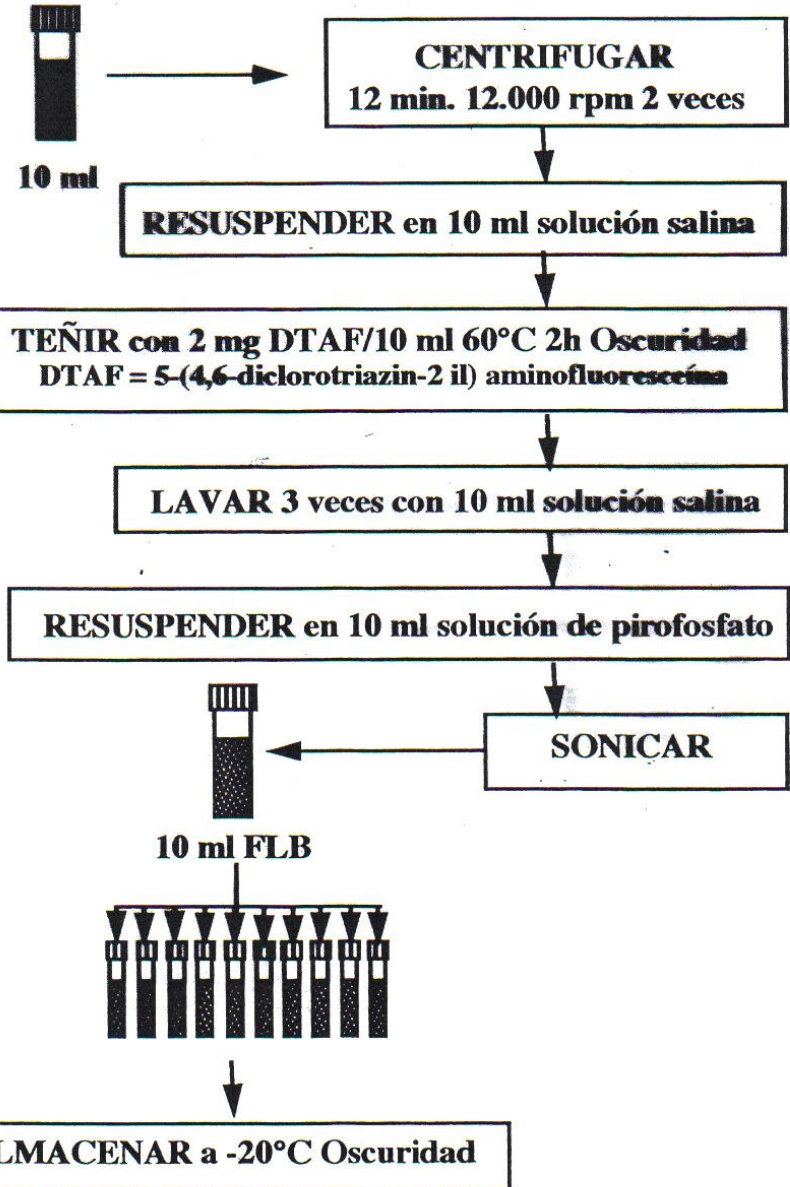
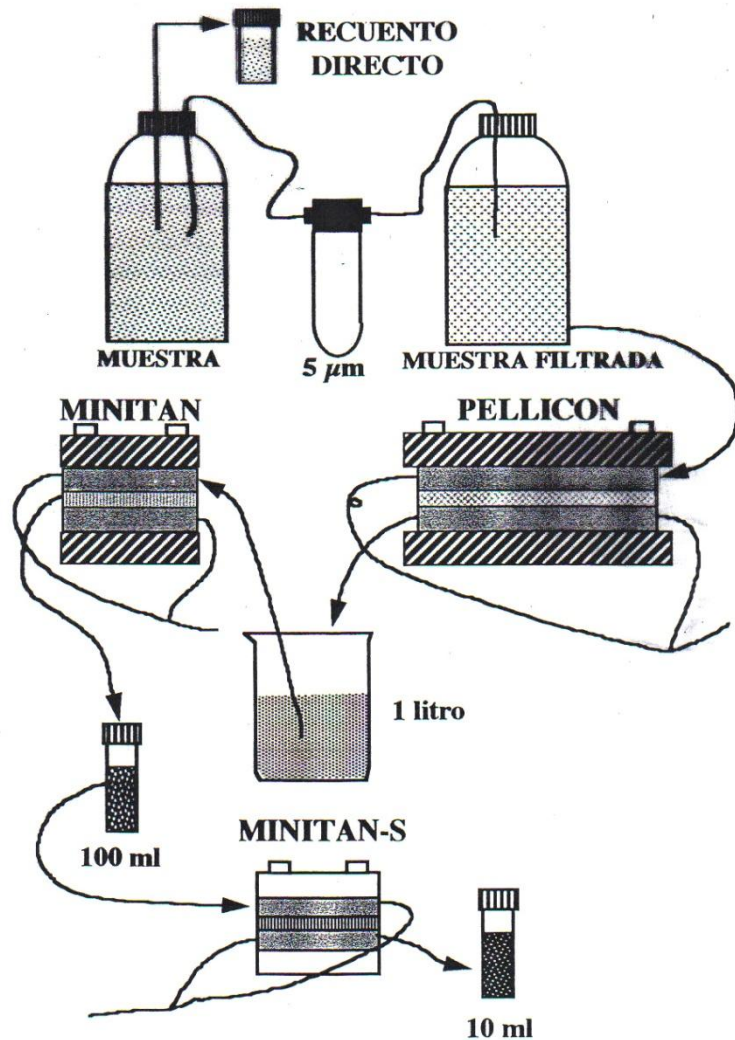
BAKTERIOEN GAIN EGINDAKO HARRAPARITZAREN ESTIMAZIOA

Bakterio fluoreszenteak

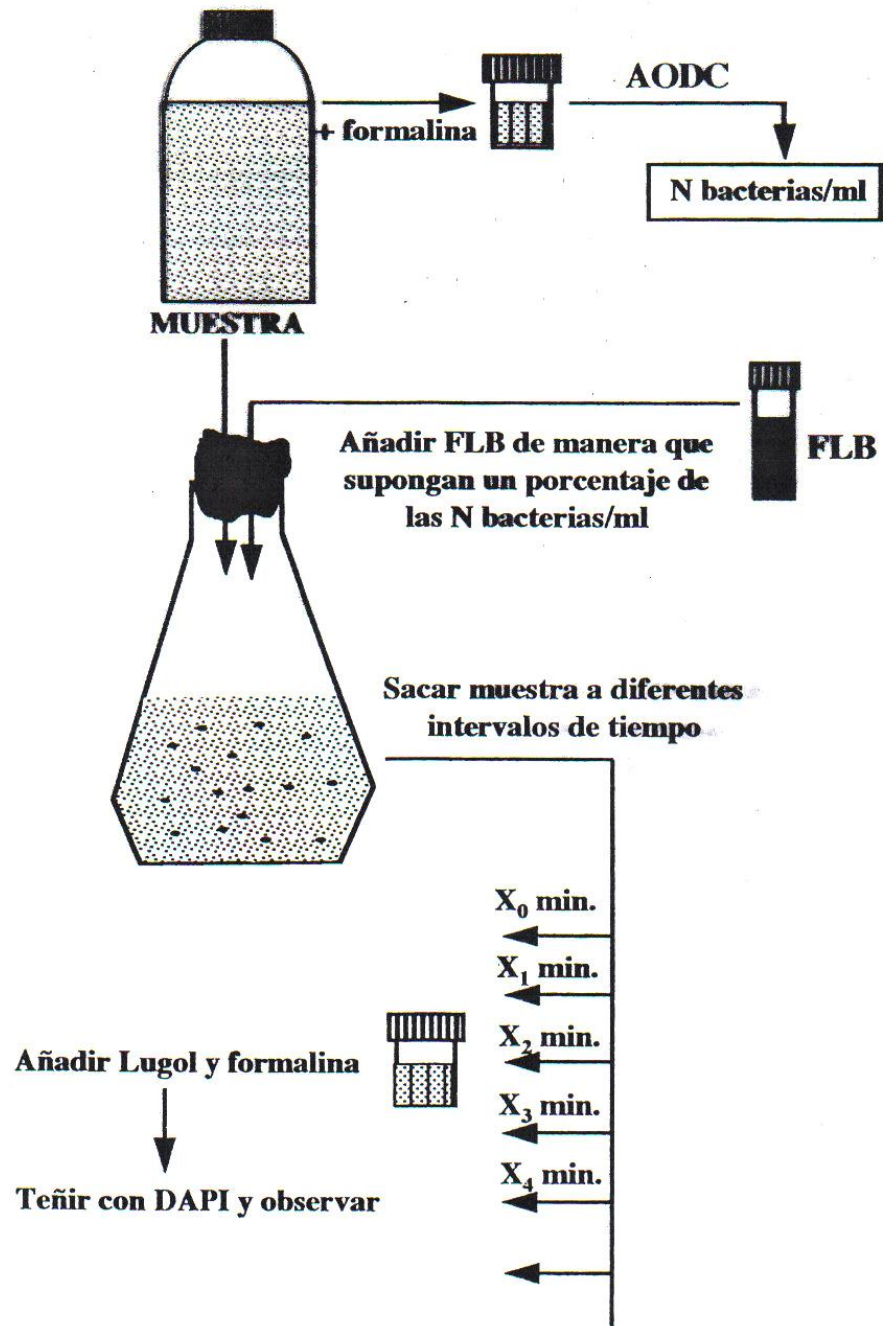


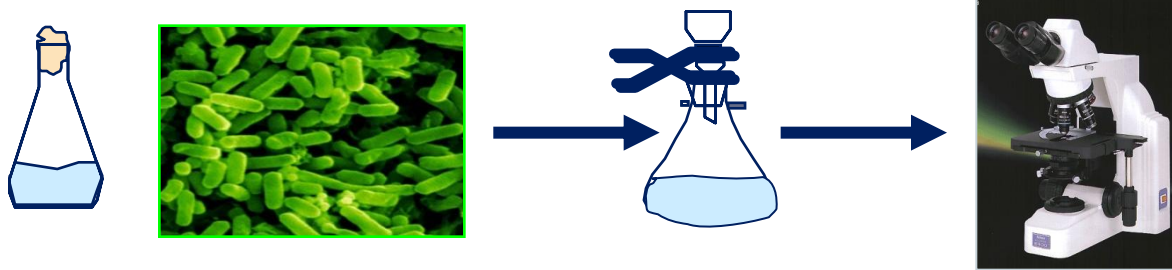
- **Zeluletan txertatutako fluorokromoak**
 - **FLB (*Fluorescently Labelled Bacteria*)**
 - Prestaketa konplexua da
 - Zelula hilak (harrapakinen bereizketa)
 - Populazio naturalak
 - **RSB (*Rhodamine Stained Bacteria*)**
 - Prestaketa konplexua da
 - Zelula bizirik
 - Populazio naturalak
- **Zelulek ekoiztutako markaketa fluoreszentea**
 - **GFP (*Green Fluorescent Protein*)**
 - Biologia molekularra
 - Zelula bizirik
 - Espezie gutxi erabil daitezzen

PREPARACION DE FLB (Fluorescently labeled bacteria)

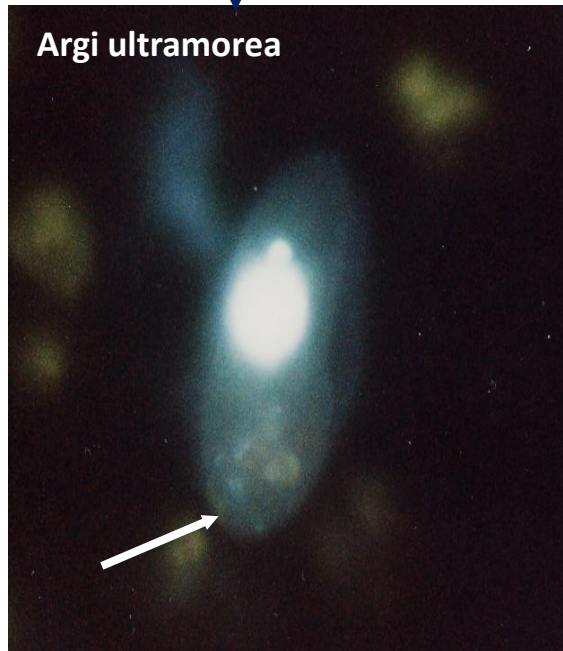


PARA SU UTILIZACION: DESCONGELAR Y SONICAR



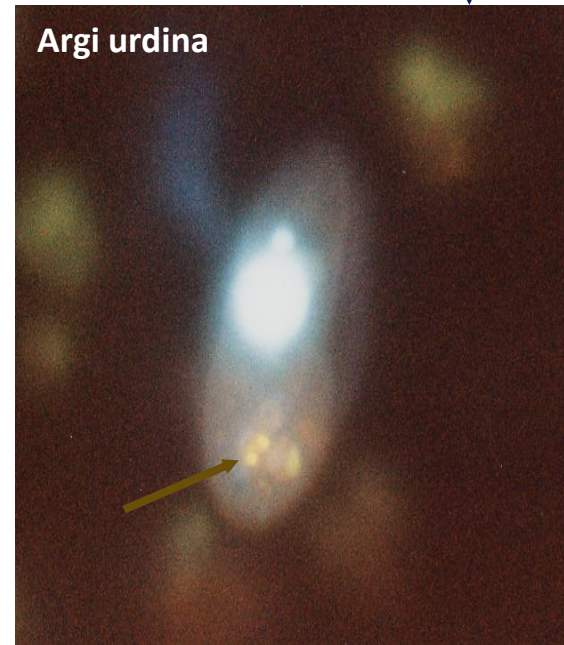


LAGINA + *E. coli* (GFP)



Argi ultramorea

Protozoa

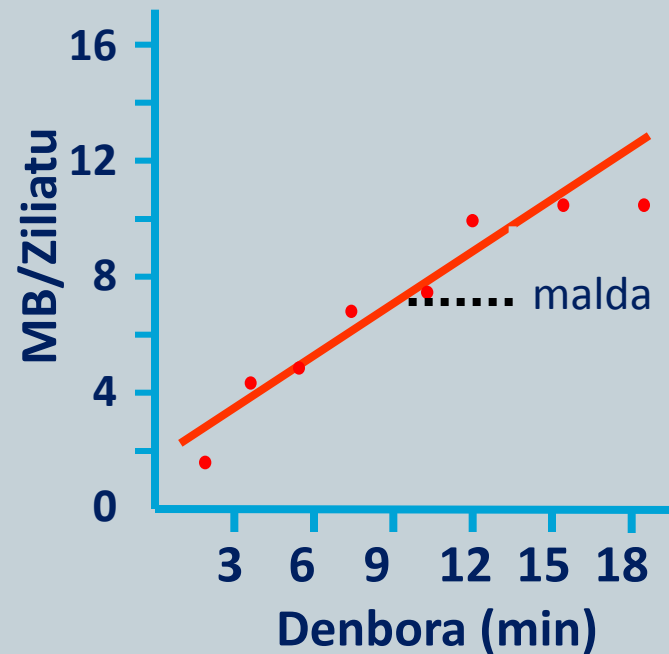
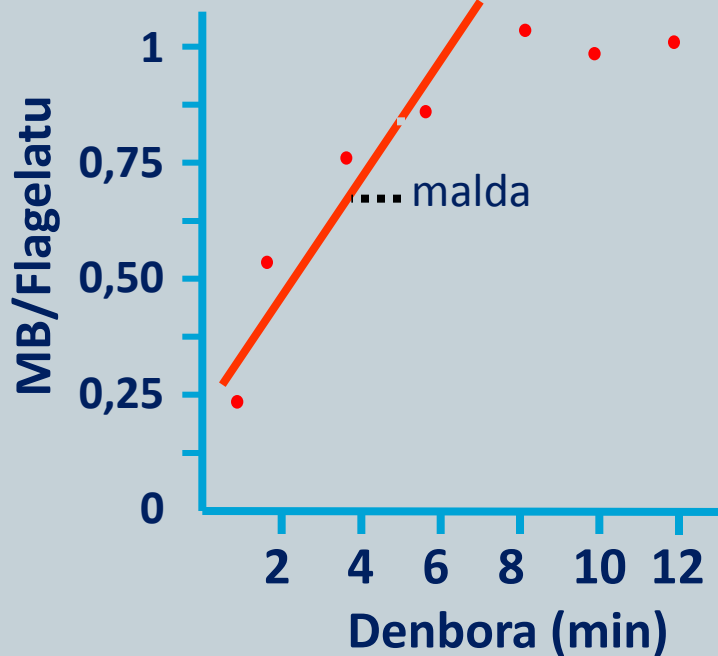


Argi urdina

Bakterio fluoreszenteak

BAKTERIOEN GAIN EGINDAKO HARRAPARITZAREN ESTIMAZIOA

Bakterio fluoreszenteak



*MB = Markatutako bakterioa

BAKTERIOEN GAIN EGINDAKO HARRAPARITZAREN ESTIMAZIOA

Bakterio fluoreszenteak



Malda
MB/Flagelatu h



Balio hau eta markatutako bakterioen ehunekoa ezagutzen baditugu, kalkula dezakegu:



Bakterio totalak/Flagelatu h

Malda
MB/Ziliatu h



Bakterio totalak/Ziliatu h

Harraparitza-abiadura = flagelatuek edo ziliatuek jaten dituzten bakterioak denbora-unitatetik

BAKTERIOEN GAIN EGINDAKO HARRAPARITZAREN ESTIMAZIOA

Bakterio fluoreszenteak



Bakterio
totalak/Flagelatu h



Bakterio
totalak/Ziliatu h



Balio hau eta protozoo flagelatuen eta ziliatuen dentsitatea (protozoo/ml
lagin) ezagutzen baditugu, kalkula dezakegu:



Bakterio totalak/ml h

Bakterio totalak/ml h

Komunitatearen harraparitza-abiadura

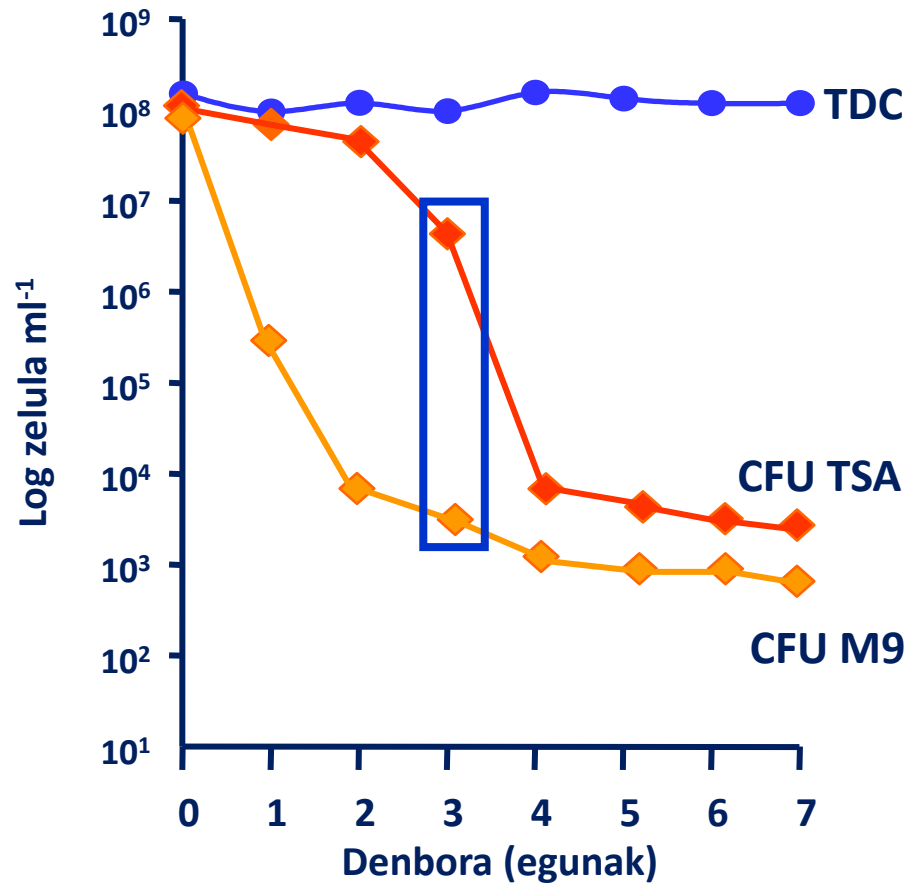
ARGITZE-ABIADURA (V_A)



Protistak denbora-unitatetik iragazitako ur-bolumena

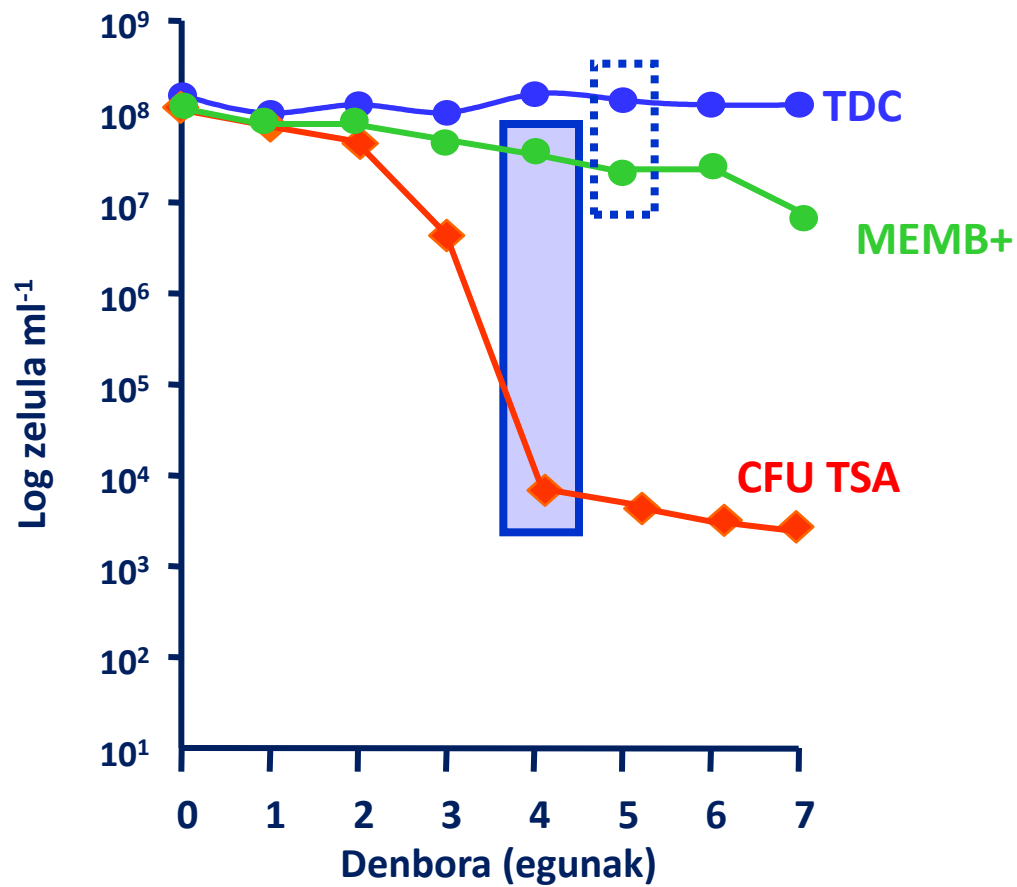
$$V_A = \frac{\text{Ingestio-abiadura}}{\text{FLBen dentsitatea}} = \frac{\text{FLB} / \text{Protista h}}{\text{FLB}/l}$$

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



CFU TSA vs CFU M9

Kaltetutako ez diren zelula kultibagarriak
Zelula kultibagarri kaltetuak edo berreskuragarriak



MEMB+ vs CFU

Kultibagarriak ez diren zelula bideragarriak
(*viable but nonculturable*, VBNC)

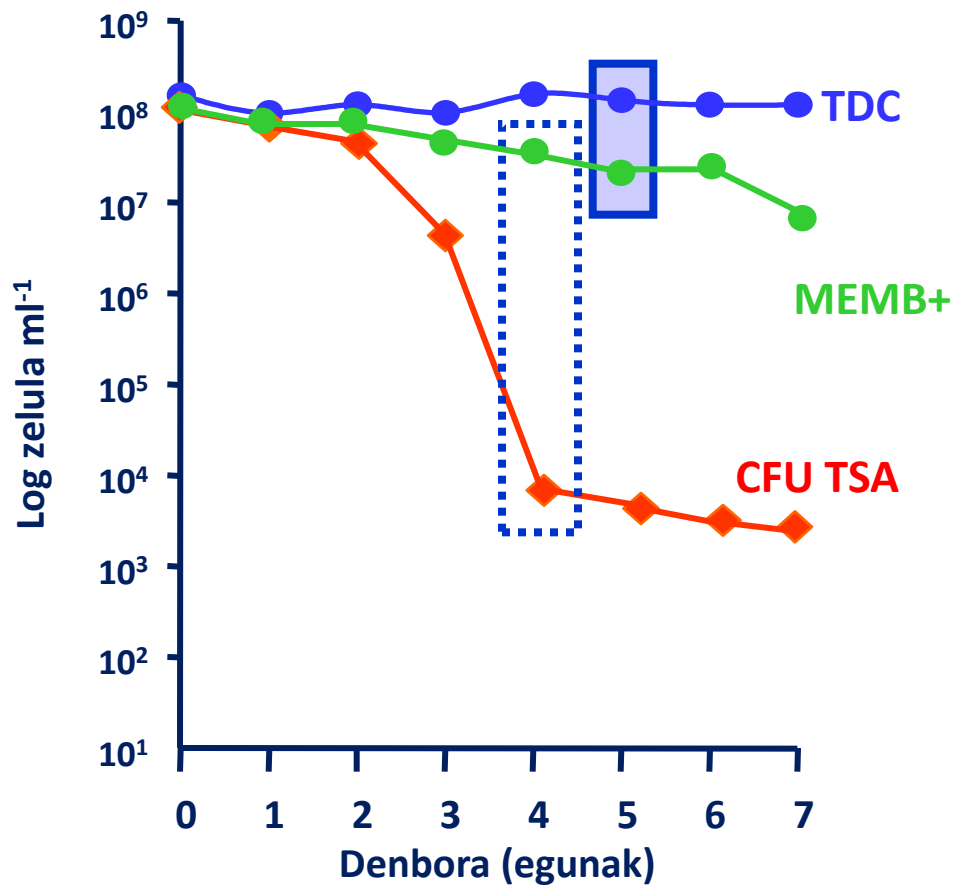
TDC vs MEMB+

Zelula ez-bideragarriak

Viable But NonCulturable state (VBNC)



- Nahiz eta beste jarduera zelular batzuk adierazi, egoera honetan zelulak ezin dira ugaltu eta ez dute eratzen koloniarik hazkuntza-medio solidoetan
- Zertarako balio du VBNC egoerak?
 - Epe luzerako biziraupen-estrategia (bizi-zikloa), esporeaketaren antzekoa
 - Prozesu degeneratiboa. Heriotzan amaitzen duen gertaerakate baten lehen pausoa. *Programatutako heriotza zelularra?*



MEMB+ vs CFU

Kultibagarriak ez diren zelula bideragarriak
(*viable but nonculturable*, VBNC)

TDC vs MEMB+

Zelula ez-bideragarriak

ZELULA EZ-BIDERAGARRIAK



- Zelulak bere integritatea/morfologia mantentzen du baina ez du adierazten jarduerarik.
- Zeintzuk dira zelula ez-bideragarriak?
 - Itxuraz jarduerarik adierazten ez dutenak ez ditugulako teknika egokiak antzemateko
 - Zelula hilak

BAKTERIOEN HERIOTZA



- Bere integritate zelularra galdu duten zelulak
- Genoman lesio itzulezinak aurkezten dituzten zelulak