



Tema 4. Detección y cuantificación de microorganismos en el medio acuático

- > Procesamiento previo de las muestras
- > Recuentos directos
 - > Cámaras de recuento
 - > Cámaras de sedimentación
 - > Película de agar
 - > Microscopia de epifluorescencia
 - > Microscopia laser de barrido confocal
 - > Citometría de flujo
- > Recuentos indirectos
 - > Recuentos de células viables (cultivables)
 - > Recuento en placa
 - > Recuento por el Número Más Probable (NMP)
 - > Métodos de enriquecimiento y de selección de grupos/poblaciones funcionales bacterianos.
- > Detección de microorganismos
 - > Tinciones diferenciales
 - > Detección molecular
 - > Sondas genéticas
 - > PCR polimerasa
 - > Fingerprinting

Arana, I. y M. Orruño

Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea



Enumeración de microorganismos

Técnicas directas

Estimación directa del parámetro que queremos medir.

Técnicas indirectas

Estimación directa de un parámetro proporcionalmente relacionado con el número o la masa de los microorganismos.



Técnicas directas

Estimación directa del parámetro que queremos medir.

Ejemplos:

- Recuento directo de microorganismos
- Estimación del peso seco



Contaje (recuento) directo

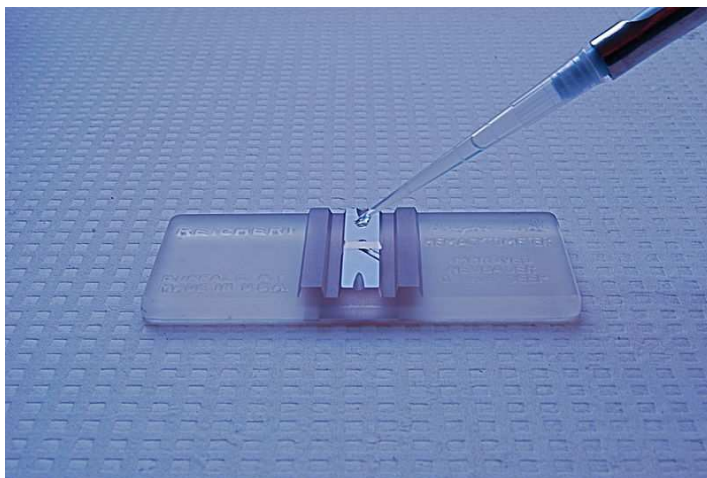
- Resultados inmediatos, no requieren incubación
- Cuantificaciones más altas de número de microorganismos
- Permite otras estimaciones, además de densidad. Estimación de biomasa y actividad
- **NO discrimina entre microorganismos vivos y muertos**
- **Dificultad para diferenciar detritus o partículas de microorganismos**
- **Adhesión de los microorganismos a partículas de diferentes tamaños y composición química**
- **Imposibilidad de utilizar las muestras para estudios posteriores**

Técnicas directas

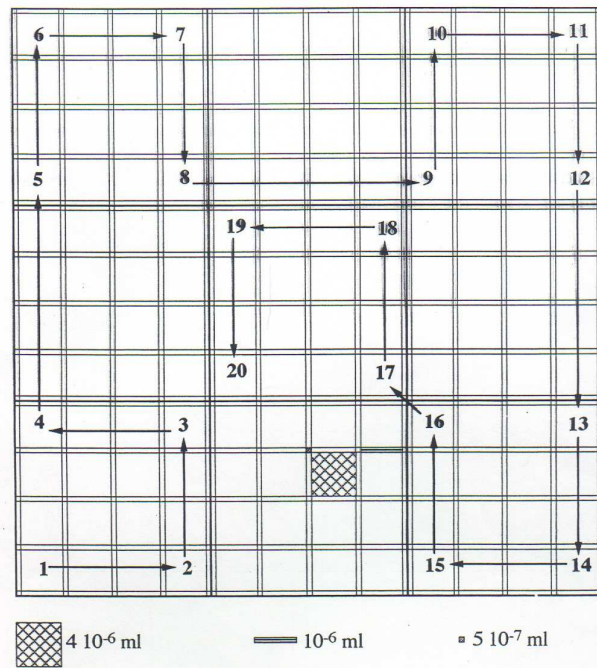
- Cámaras de recuento
- Cámaras de sedimentación
- Película de agar
- Microscopia de epifluorescencia
- Microscopia laser de barrido confocal
- Citometria de flujo

Técnicas directas.

Cámaras de recuento (Hemocitómetro).



Cámaras de recuento



Contar células en 1 a 20
 Hacer media con X_1 a X_{20}
 Dividir Valor medio entre volumen contenido en áreas contadas
 (P.e. Valor medio = 22 células
 Tipo de Areas contadas = Cuadros grandes
 N° m.o./ml de muestra = $22/4 \cdot 10^{-6}$)

Cámaras de recuento

- Recuento de microorganismos relativamente grandes (protozoos, algas y hongos)
- Tipos de cámaras:
 - Cámara de Petroff-Hauser: Bacterias (0,5-10 μm)
 - Célula de Sedgewick-Rafter: Fitoplancton (>10 μm)
 - Célula de Palmer-Maloney (Hemocitómetro): Nanoplancton

Cámaras de recuento

- Número de microorganismos por cuadrado relativamente pequeño. **La muestra debe diluirse.**
- Muestra homogénea. **La muestra debe agitarse previamente y romper los acúmulos.**
- Problemas. **Errores en el volumen.**
Movilidad de los microorganismos.

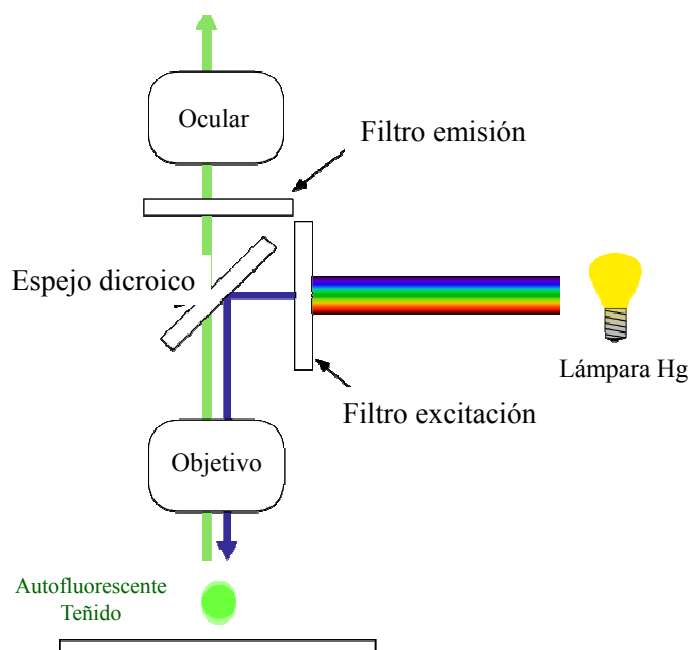
Técnicas directas.

● ● ● **Microscopia de epifluorescencia.**



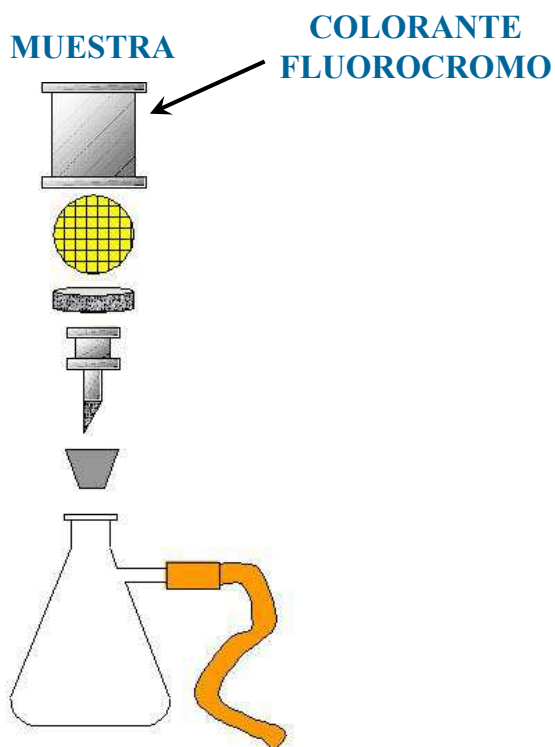
Técnicas directas.

Microscopia de epifluorescencia.



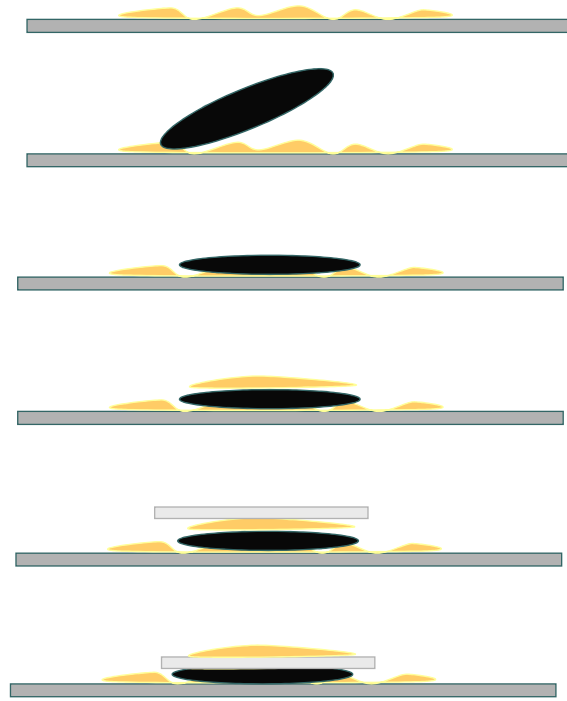
Modificado de: «FluorescenceFilters 2008-09-28 cs» de FluorescenceFilters_2008-09-28.svg:
*derivative work: Henry Mühlpfordt (Disponible bajo la licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0-2.5-2.0-1.0 via Wikimedia Commons -
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters_2008-09-28_cs.svg#mediaviewer/File:FluorescenceFilters_2008-09-28_cs.s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

Microscopia de epifluorescencia.

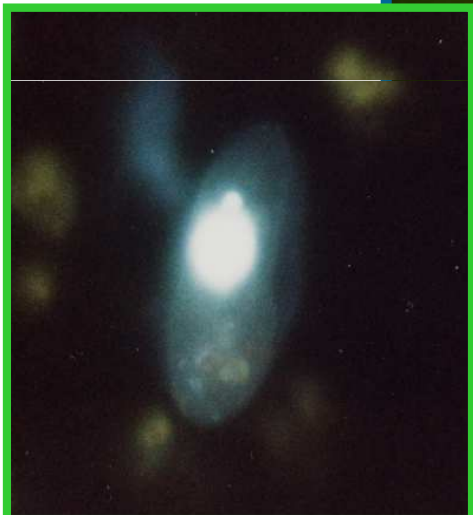
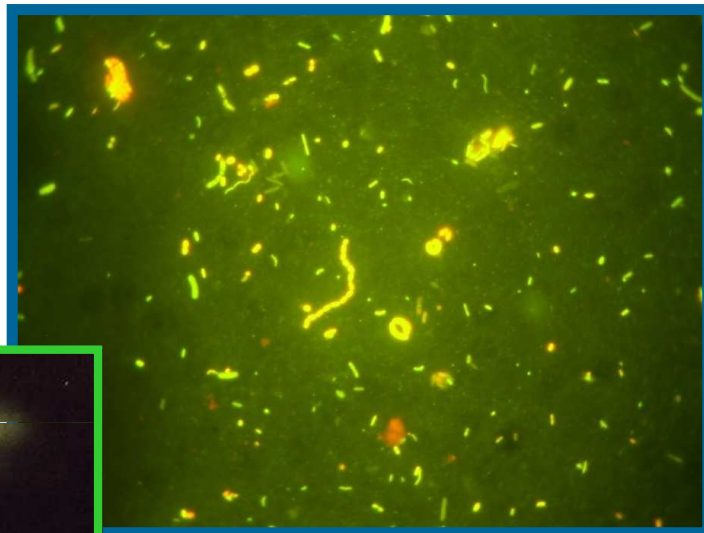




Microscopia de epifluorescencia



OBSERVAR





Microscopia de epifluorescencia

- Aceite de inmersión especial fluorescencia
- Filtros de membrana
 - Diámetro de poro
 - Color del filtro
 - Tipo de filtro



Microscopia de epifluorescencia

Sitio de muestreo	Recuento (N° células/ml)	
	Filtro Sartorius (0,5 µm) (Esteres de celulosa)	Filtros Nucleopore (0,2 µm) (Policarbonato)
Estuario	8,6 10 ⁵	1,7 10 ⁶ X 2
Manantial	4,0 10 ⁵	7,2 10 ⁵ X 1,8
Arroyo	1,7 10 ⁶	4,0 10 ⁶ X 2,3



Microscopia de epifluorescencia

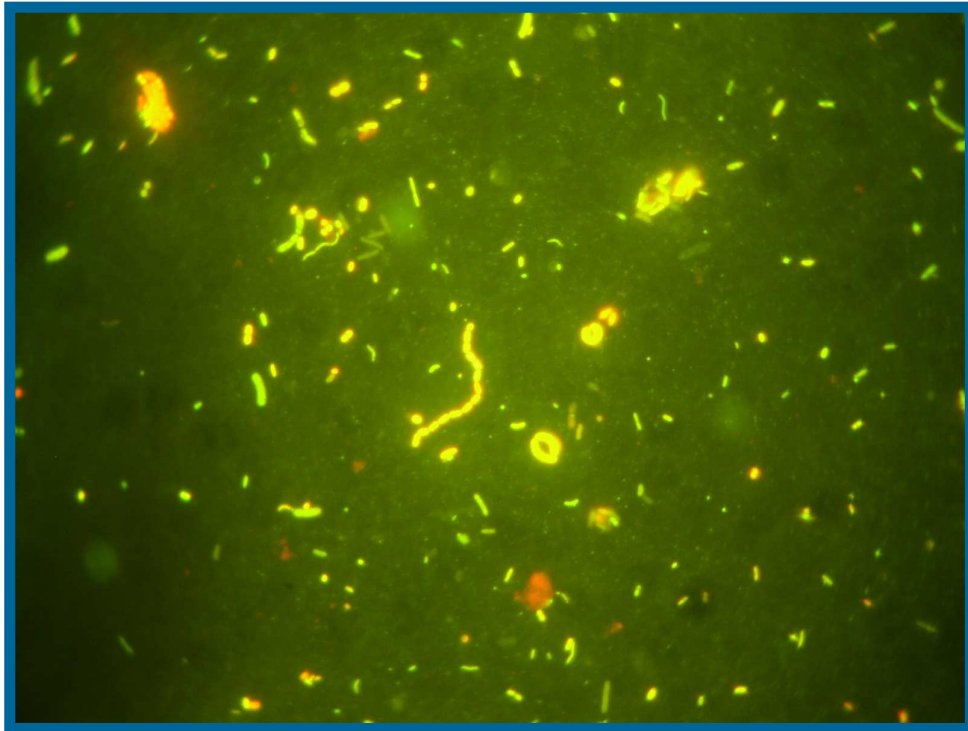
- Aceite de inmersión
- Filtros de membrana
- Selección de colorante fluorocromo
 - Filtros de excitación y de barrera



Microscopia de epifluorescencia. Naranja de acridina (AO).

- 3,6-tetrametildiamino acridina
- Luz incidente **AZUL** (450-490 nm). Luz emitida **VERDE** (520 nm)
- Apariencia de las células, teñidas en **VERDE** y **ROJO/NARANJA**

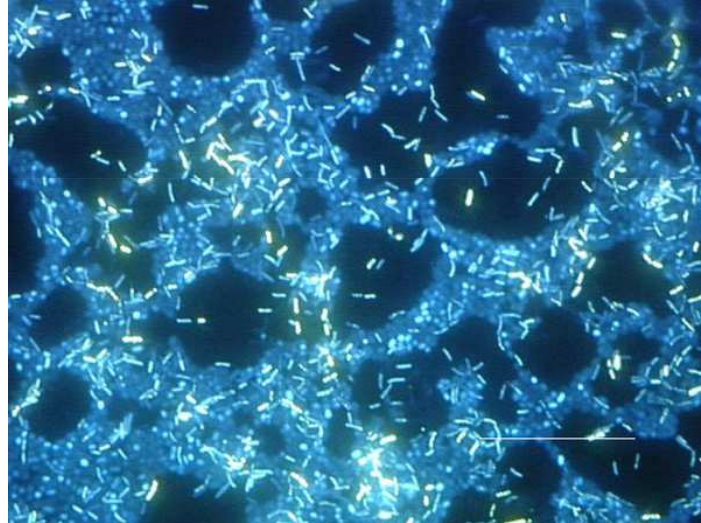
Microscopia de epifluorescencia.
Naranja de acridina.



Microscopia de epifluorescencia. **DAPI.**

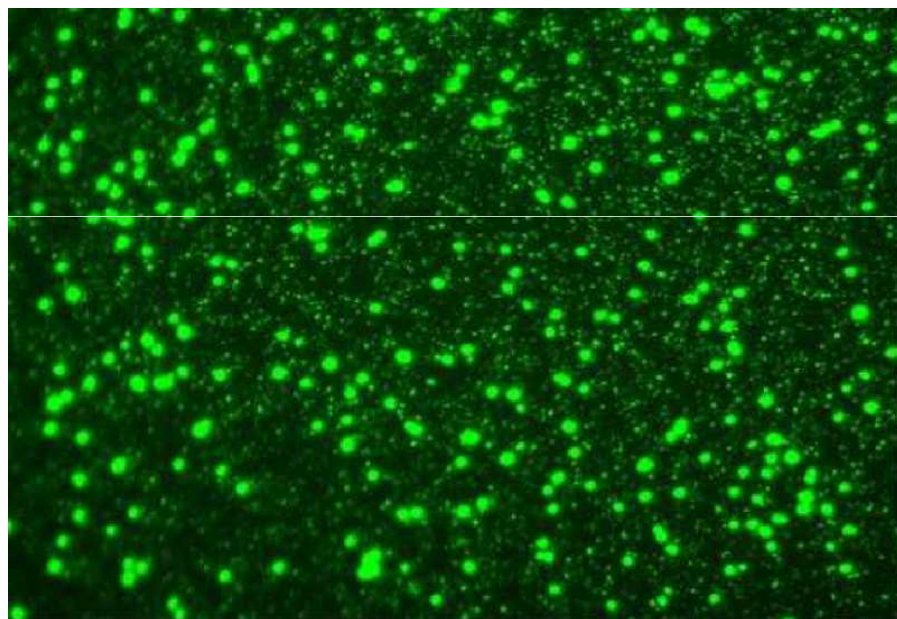
- 4,6-diamino 2 fenil indol
- Luz incidente UV (330-380 nm). Luz emitida **AZUL** (435 nm)
- Apariencia de las células, teñidas en **AZUL INTENSO**

Microscopia de epifluorescencia. DAPI.



«Polymicrobial biofilm epifluorescence» de Ricardo Murga and Rodney Donlan - Centers for Disease Control and Prevention Rodney M. Donlan: "Biofilms: Microbial Life on Surfaces". Disponible bajo la licencia Public domain via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymicrobial_biofilm_epifluorescence.jpg#mediaviewer/File:Polymicrobial_biofilm_epifluorescence.jpg

Microscopia de epifluorescencia. SYBR Green



«Seawater small life» de (Image: Jed Fuhrman) - The Third Age of Phage. Mann NH, PLoS Biology Vol. 3/5/2005, e182 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0030182>. Disponible bajo la licencia Creative Commons Attribution 2.5 via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Seawater_small_life.png#mediaviewer/File:Seawater_small_life.png



Fluorocromo	Unión a:	Excitación/Emisión
Ethidium bromide	DNA - RNA	518 / 605
Propidium iodide	DNA - RNA	535 / 617
FITC	Protein	495 / 520
Acridine Orange (AO)	RNA -DNA	500 / 526 (DNA) 460 / 650 (RNA)
DAPI	DNA	358 / 461
Hoescht 33342	DNA (AT)	350 / 461
TOTO-1	DNA - RNA	514 / 533
SYTO-13	DNA - RNA	488 / 514
YOYO-1	DNA - RNA	491 / 509
PicoGreen	dsDNA	480 / 520
SYBR Green I	DNA (RNA)	494 / 521
SYTOX Green	dsDNA	504 / 523
SYTO-9, 11, 16	DNA - RNA	480-510 / 500-520
SYBR Green II	RNA (DNA)	494 / 521
SYTO-17	DNA - RNA	633 / 675

Microscopia de epifluorescencia

- Aceite de inmersión
- Filtros de membrana
- Selección de colorante fluorocromo
- Factor del microscopio
 - Area efectiva: N° de campos/Filtro
 - N° de gráticas/Filtro

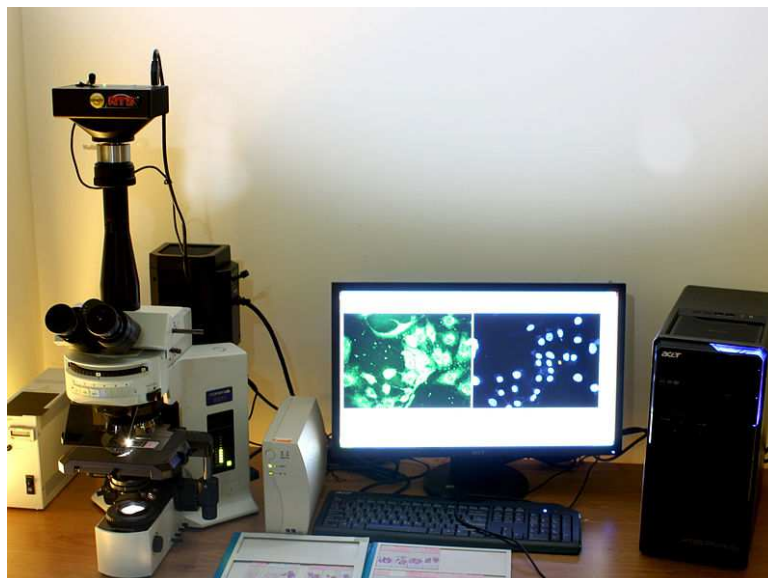
Microscopio de epifluorescencia

- Rápido.
- Aplicable a gran variedad de hábitats/microorganismos.
- Relación con biomasa.
- Permite medir formas y tamaños.
- Problemas.

Microscopio de epifluorescencia

Problemas.

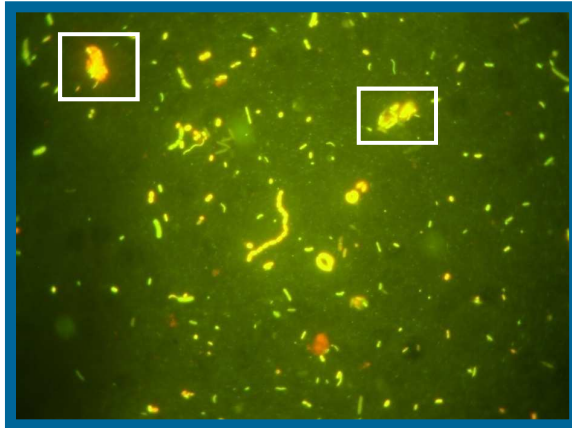
- Tedioso - Análisis de imagen



Microscopio de epifluorescencia

Problemas.

- Tedioso - Análisis de imagen
- Microorganismos unidos a partículas (agregados) – Homogenización



Microscopio de epifluorescencia

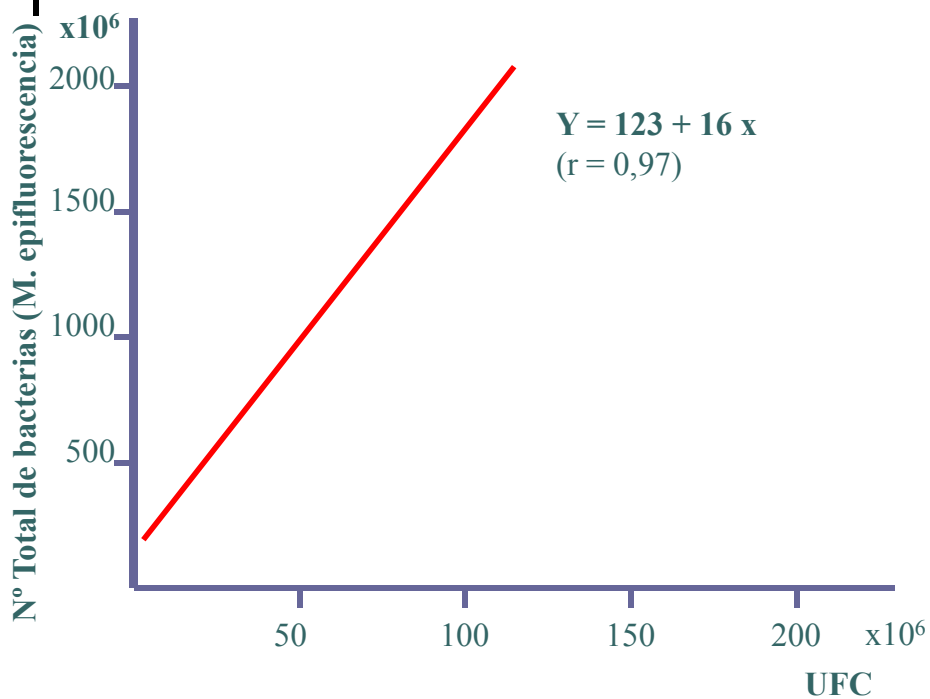
Problemas.

- Tedioso - Análisis de imagen
- Microorganismos unidos a partículas – Homogenización
- No se distinguen tipos específicos - Anticuerpos fluorescentes
- No aporta información del estado fisiológico - Combinar con otras técnicas/métodos (Tema 5)

Microscopio de epifluorescencia

Muestra	Suelo		Agua de mar	
	TDC	UFC	TDC	UFC
A	5,0 10 ⁸ (X 16)	3,1 10 ⁷	2,2 10 ³ (X 170)	1,3 10 ¹
B	1,1 10 ⁹ (X 17,7)	6,2 10 ⁷	8,2 10 ⁴ (X 107)	7,6 10 ²
C	2,0 10 ⁹ (X 12)	1,7 10 ⁸	1,3 10 ⁶ (X 63)	2,1 10 ⁴

Microscopio de epifluorescencia



Técnicas directas.

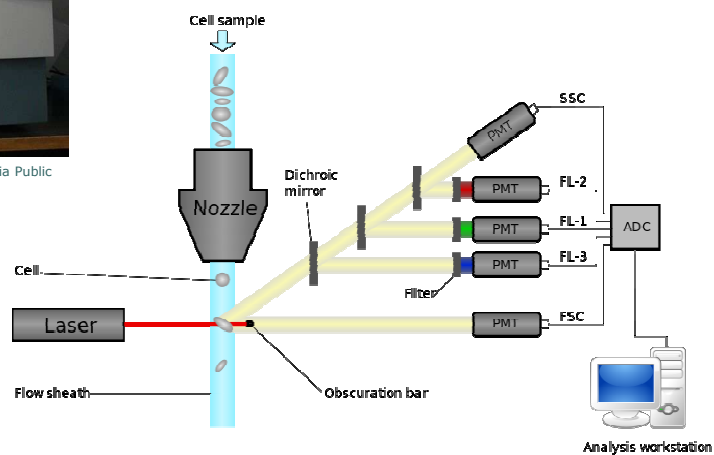
Citometría de flujo

- Método analítico que permite la **medida de emisión de fluorescencia y dispersión de la luz**, inducidas por iluminación apropiada de células, a medida que **(las células) desfilan de una en una**, arrastradas por un flujo portador, frente a un sistema de detección.
- Fundamento similar al del contador de partículas.

Citometría de flujo



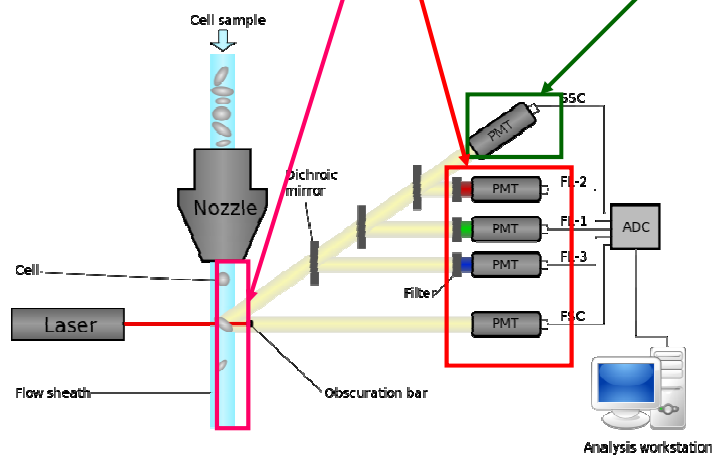
«FACS-toestel» de Biol - Trabajo propio. Disponible bajo la licencia Public domain via Wikimedia Commons - <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FACS-toestel.JPG#mediaviewer/File:FACS-toestel.JPG>



«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>

Técnicas directas. Citometría de flujo

Permite la medida de **emisión de fluorescencia** y **dispersión de la luz**, inducidas por iluminación apropiada de células, a medida que *(las células)* **desfilan de una en una**, arrastradas por un flujo portador, frente a un sistema de detección.



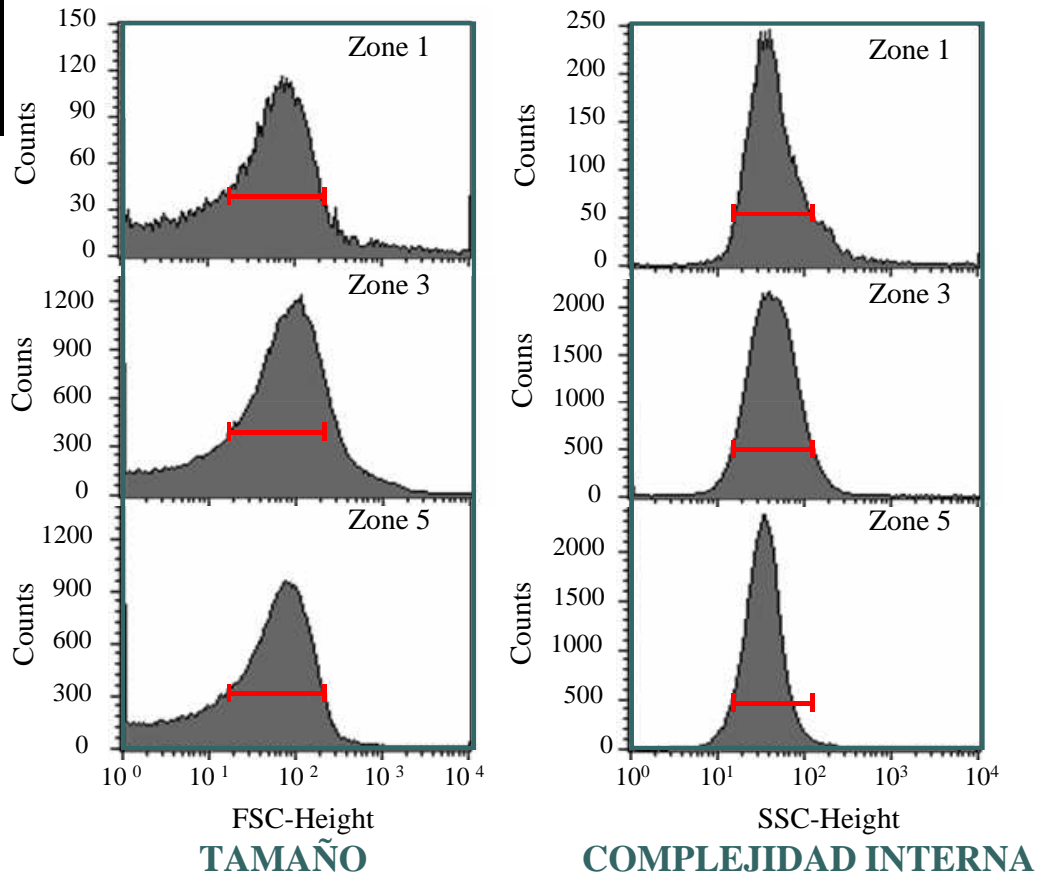
«Cytometer» de Kierano - Trabajo propio. Disponible bajo la licencia Creative Commons Attribution 3.0 vía Wikimedia Commons - <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cytometer.svg#mediaviewer/File:Cytometer.svg>

Técnicas directas. Citometría de flujo

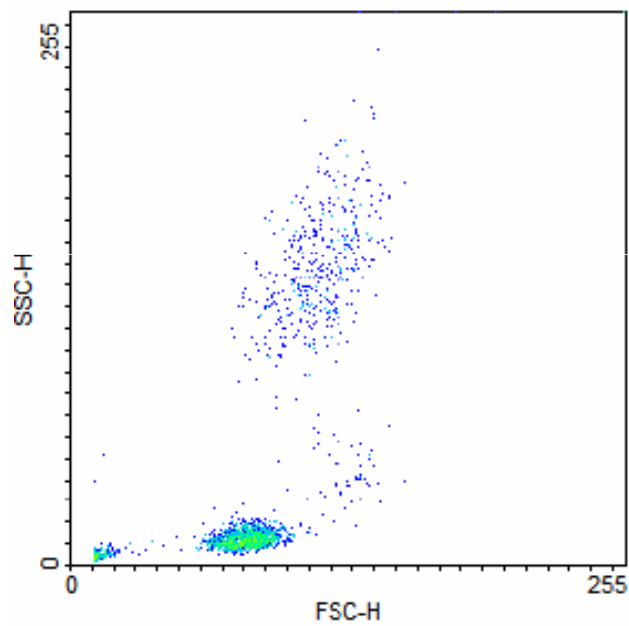
Se cuantifican:

- Dos tipos de luz dispersada
 - **Dispersión frontal, FSL** (forward scatter light), se relaciona con tamaño
 - **Dispersión lateral, SSL** (side scatter light), se relaciona con la presencia de estructuras celulares internas y complejidad citoplasmática
- **Fluorescencia**

Citometría de flujo



Citometría de flujo





Técnicas directas. **Citometría de flujo**

Permite discriminar partículas y microorganismos.

En algunos sistemas, las células pueden ser separadas físicamente de acuerdo con alguna propiedad de las células.



Citometria de flujo

- Rápido. Elevada velocidad para obtener y procesar datos.
- Elevada sensibilidad.
- Separación física de poblaciones específicas o de células aisladas.
- Problemas. **Alto coste de los equipos**
Puesta a punto laboriosa
Las células no se visualizan



Técnicas indirectas

Estimación directa de un parámetro proporcionalmente relacionado con el número o la masa de los microorganismos.

- Recuento de bacterias cultivables en placa
- Medidas basadas en turbidez



Técnicas indirectas

- Recuentos de células viables (cultivables)
 - Recuento en placa
 - Recuento por el Número Más Probable (NMP)
- Métodos de enriquecimiento y de selección de grupos/poblaciones funcionales bacterianos



Técnicas indirectas

Recuento en placa.

- Cada colonia proviene de una unidad formadora de colonia (UFC)
- Selección adecuada de diluyente
- Selección del método de siembra
- Selección de temperatura de incubación
- Selección del tiempo de incubación
- Selección del medio de cultivo



Técnicas indirectas

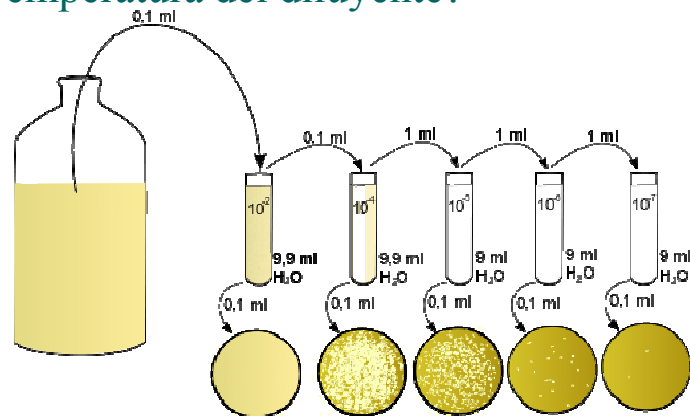
Recuento en placa.

- Cada colonia proviene de una unidad formadora de colonia (UFC). **Homogeneizar**
- Selección adecuada de diluyente
- Selección del método de siembra
- Selección de temperatura de incubación
- Selección del tiempo de incubación
- Selección del medio de cultivo

Técnicas indirectas

Recuento en placa.

- Cada colonia proviene de una unidad formadora de colonia (UFC).
- Selección adecuada de diluyente:
 - Tipo?
 - Grado de dilución?
 - Temperatura del diluyente?



Verdünnungsreihe mit Ausplattieren» de Leberecht - Trabajo propio. Disponible bajo la licencia Creative Commons Attribution 3.0 via Wikimedia Commons http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Verd%C3%BCnnungsreihe_mit_Ausplattieren.svg#mediaviewer/File:Verd%C3%BCnnungsreihe_mit_Ausplattieren.svg

Técnicas indirectas

Recuento en placa.

- Cada colonia proviene de una unidad formadora de colonia (UFC).
- Selección adecuada de diluyente
- Selección del método de siembra
 - Siembra por extensión?
 - Siembra en masa?



Técnicas indirectas

Recuento en placa.

- Cada colonia proviene de una unidad formadora de colonia (UFC).
- Selección adecuada de diluyente
- Selección del método de siembra
- **Selección de temperatura de incubación**
 - Temperatura *in situ*?
 - Temperatura media?
 - En función del tipo de microorganismo?



Técnicas indirectas

Recuento en placa.

- Cada colonia proviene de una unidad formadora de colonia (UFC).
- Selección adecuada de diluyente
- Selección del método de siembra
- Selección de temperatura de incubación
- **Selección del tiempo de incubación**



Técnicas indirectas

Recuento en placa.

- Cada colonia proviene de una unidad formadora de colonia (UFC).
- Selección adecuada de diluyente:
- Selección del método de siembra
- Selección de temperatura de incubación
- Selección del tiempo de incubación
- Selección del medio de cultivo
 - Enumeración del mayor número posible de bacterias
 - Enumeración de grupos fisiológicos bacterianos
 - Medios selectivos
 - Medios diferenciales
 - Medios + antibióticos
 - **Enumeración de células cultivables que presentan lesión**

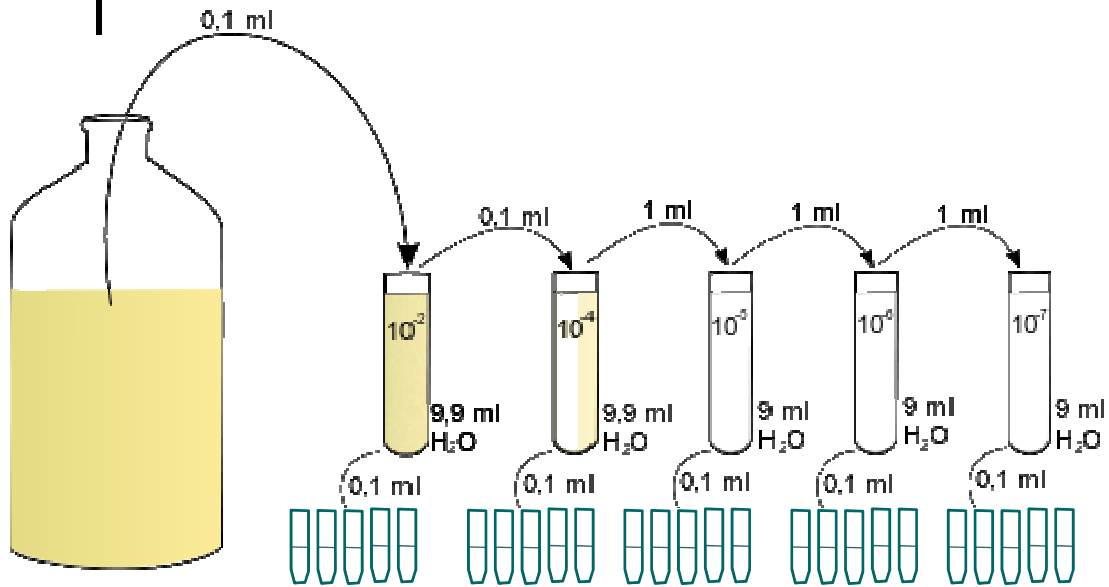


Técnicas indirectas

Recuento en placa.

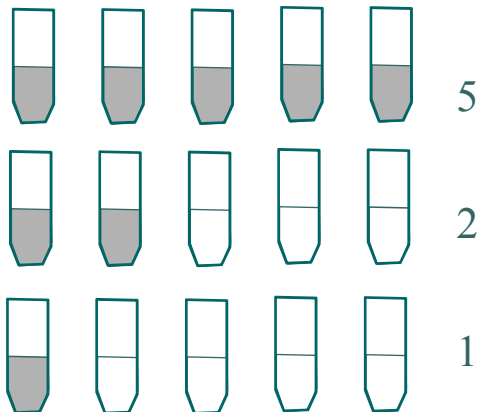
- UFC enumeradas sobre un medio de cultivo **rico no selectivo**
 - **CÉLULAS CULTIVABLES (TOTALES)**
- UFC enumeradas sobre un medio de cultivo **mínimo o selectivo**
 - **CÉLULAS CULTIVABLES NO LESIONADAS**
- UFC cultivables – UFC cultivables no lesionadas
 - **CÉLULAS CULTIVABLES RECUPERABLES O LESIONADAS**

Técnicas indirectas Número Más Probable (NMP).



Modificado de: «Verdünnungsreihe mit Ausplattieren» de Leberecht - Trabajo propio. Disponible bajo la licencia Creative Commons Attribution 3.0 via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Verd%C3%BCnnungsreihe_mit_Ausplattieren.svg#mediaviewer/File:Verd%C3%BCnnungsreihe_mit_Ausplattieren.svg

NMP



... 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

Inoculante	Resultados			NMP	Categoría		Límites de confianza			
	0	1	2		A	B	99 %	95 %	90 %	85 %
Limite superior	0	0	1	0,2		X	<0,1	1,3	<0,1	1,0
20	0	1	0	0,2	X		<0,1	1,4	<0,1	1,0
	1	0	0	0,2	X		<0,1	1,5	<0,1	1,1
9	1	0	1	0,4		X	0,1	1,9	0,1	1,5
	1	1	0	0,4	X		0,1	1,9	0,1	1,5
	1	2	0	0,6	X		0,1	2,3	0,2	1,8
13	2	0	0	0,4	X		0,1	2,2	0,1	1,7
	2	0	1	0,7	X		0,1	2,6	0,2	2,1
	2	1	0	0,7	X		0,1	2,6	0,2	2,1
	2	1	1	0,9		X	0,2	3,1	0,3	2,5
	2	2	0	0,9	X		0,2	3,1	0,3	2,5
	3	0	0	0,8	X		0,1	3,1	0,3	2,5
	3	0	1	1,1	X		0,2	3,7	0,4	2,9
	3	1	0	1,1	X		0,2	3,7	0,4	3,0
	3	1	1	1,4		X	0,4	4,3	0,6	3,5
20	3	2	0	1,4	X		0,4	4,3	0,6	3,5
21	3	2	1	1,7	X		0,5	4,9	0,8	4,1
	3	3	0	1,7	X		0,5	5,0	0,8	4,1
	4	0	0	1,3	X		0,3	4,9	0,5	3,9
23	4	0	1	1,7	X		0,5	5,8	0,7	4,6
	4	1	0	1,7	X		0,5	5,9	0,7	4,7
	4	1	1	2,1	X		0,6	6,8	0,9	5,5
	4	2	0	2,2	X		0,7	7,1	0,9	5,7
36	4	2	1	2,6		X	0,8	8,1	1,2	6,6
	4	3	0	2,7	X		0,9	8,3	1,3	6,8
	4	3	1	3,3	X		1,1	9,5	1,5	7,7
	4	4	0	3,4	X		1,2	9,8	1,5	8,1
	5	0	0	2,3	X		0,6	11,6	0,9	8,7
36	5	0	1	3,1	X		0,9	14,5	1,4	11,2
37	5	1	0	3	X		1	16	1	12
	5	1	1	5	X		1	20	2	15
	5	1	2	6	X		2	23	3	19
44	5	2	0	5	X		1	22	2	17
	5	2	1	7	X		2	27	3	21
	5	2	2	9	X		3	31	4	25
47	5	3	0	8	X		2	32	3	25
	5	3	1	11	X		3	38	4	30
	5	3	2	14	X		4	44	6	36
	5	4	0	13	X		3	50	5	39
	5	4	1	17	X		5	61	7	48
	5	4	2	22	X		7	73	9	59
120	5	4	3	28		X	9	87	13	70
130	5	4	4	35		X	12	101	16	83
	5	5	0	24	X		6	127	10	95
110	5	5	1	30	X		10	180	10	130
130	5	5	2	50	X		10	250	20	200
180	5	5	3	90	X		20	380	30	300
80	5	5	4	160	X		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.
(I. C. de Man [1975] The probability of the most probable number. Eur. J. Appl. Microbiol. 1:73-77)



NMP.

- Probabilidad. **Método estadístico**
- Selección adecuada de diluyente:
 - Tipo
 - Grado de dilución
 - Temperatura del diluyente



NMP.

- Probabilidad. Método estadístico
- Selección adecuada de diluyente
- Selección de la técnica de siembra:
 - Número de tubos sembrados
 - Volumen sembrado



NMP.

- Probabilidad. Método estadístico
- Selección adecuada de diluyente
- Selección de la técnica de siembra
- Selección de temperatura de incubación
- Selección del tiempo de incubación
- **Selección del medio de cultivo**
 - Enumeración del mayor número posible de bacterias
 - Enumeración de grupos fisiológicos bacterianos
 - Medios selectivos
 - Medios diferenciales
 - Medios + antibióticos

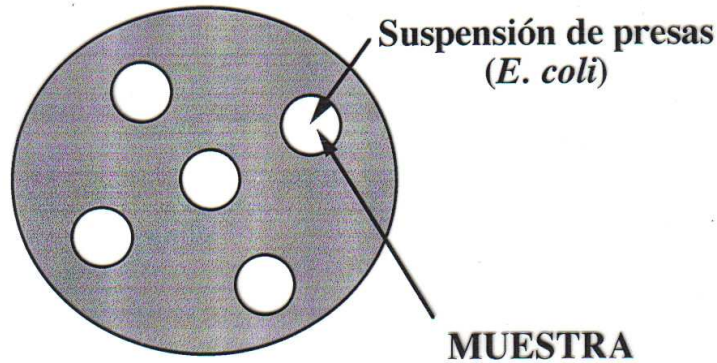
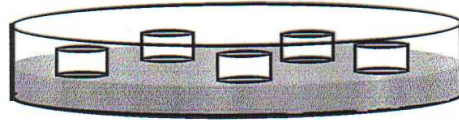


NMP

- Bacterias.
- Protozoos. Método de Singh.
- Virus. Bacteriofagos.



Protozoos. Método de Singh.



INCUBAR Y OBSERVAR

Recuentos indirectos

- Métodos de enriquecimiento y de selección de grupos/poblaciones funcionales bacterianos.
 - Enriquecimiento



Detección de microorganismos

- Detección molecular
 - Sondas genéticas
 - PCR polimerasa
 - Fingerprinting

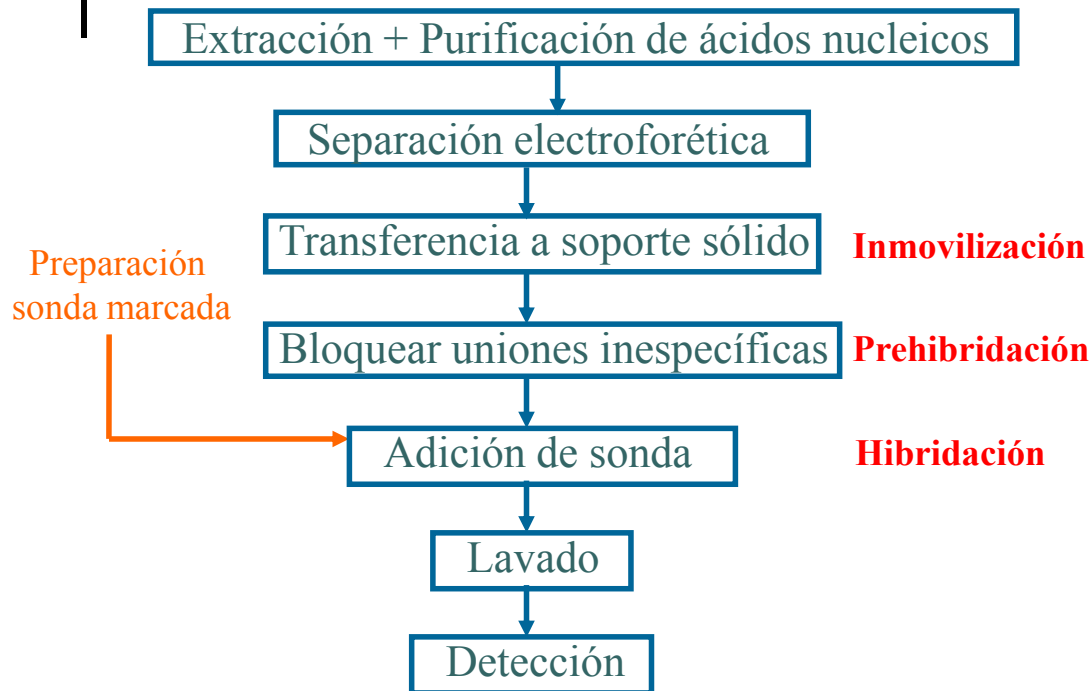


Detección de microorganismos. Detección molecular.

Métodos moleculares que permiten la detección de poblaciones microbianas específicas sin necesidad de cultivo.



Detección molecular



Detección molecular

Relacionar genes específicos con microorganismos específicos.

Métodos que no requieren crecimiento ni observación.

Modelo inicial PCR

- PCR
- DGGE (Electroforesis en gel desnaturizante en gradiente)
- Clonación molecular
- Microarray (Micromatrices)
- Secuenciación y análisis del ADN



Deteccción molecular

Tinciones genéticas. Sondas de oligonucleótidos marcadas con un colorante fluorocromo (colorantes filogenéticos).

Métodos basados en la observación que no requieren crecimiento.

Basados en FISH (Hibridación fluorescente *in situ*)

- FISH (rRNA 16s ó 18s)
- Tinción de cromosomas (genoma)
- Transcripción inversa in situ (ISRT) (mRNA)



Tinciones genéticas.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

- Colorante filogenético de las secuencias signatura en el rRNA 16s (procariotas) y rRNA 18s (eucariotas)
- Grado de especificidad
- Sondas filogenéticas múltiples



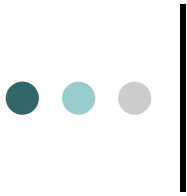
Tinciones genéticas. **Tinción de cromosomas**

- Colorante filogenético de las secuencias de uno o varios genes completos
- Identifica genes específicos (p.e. nitrogenasa)
- Organismos de una muestra que contienen el gen



Tinciones genéticas. **Transcripción inversa *in situ* (ISRT)**

- Colorante filogenético de microorganismos que están expresando uno o varios genes concretos en un momento dado
- Sonda de mRNA – **transcripción inversa** – ADN – **amplificación** – sonda de ADN



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