

4. GAIA. Mikroorganismoen isolamendua, detekzioa, zenbaketa, identifikazioa eta aktibitateak

Hainbat galderen erantzuna bilatzeko isolatzen dira mikroorganismoak ingurune natural batetik:

- Zenbat? Zenbaketa eta biomasaren estimaziorako.
- Zer egiten dute? Komunitatearen kideen aktibitatea edo funtzioa ezagutzeko.
- Nortzuk dira? Identifikaziorako.

Teknika ezberdinak erabiltzen dira horretarako: mikroorganismoen kultiboaren menpekoak eta kultiboaren menpekoak ez direnak. Gainera, estrategia ezberdinak erabiltzen daitezke, lagin mistoak edo isolaturiko anduiak erabili daitezke.

ISOLAMENDUA

Ekosistema baten mikroorganismoen isolamendua bere ezaugarriak laborategiko kultiboetan ikertzeko egiten da. Mikrobioen eta mikrobioen aktibitateen ezagueretatik ekosistemaren funtzionamendu-hipotesiak planteatzen dira. Gainera, mikrobioen gaitasunaren bat ikuspuntu bioteknologikotik erabil daitezke. Horretarako 4 teknika ezberdin erabili daitezke:

- Agorpenagatik (kultiboaren menpekoea): ildaska anitzeko ereintza, lau koadranteen ereintza edo diluzio seriatuak egin daiteke.
- Aberastasunagatik (kultiboaren menpekoea): mikroorganismo zehatz baten dentsitatea handitu nahi denean egingo da, hazkuntzarako baldintza aproposetan jarritz.
- Mikropipetak.
- Laser-pintzak.

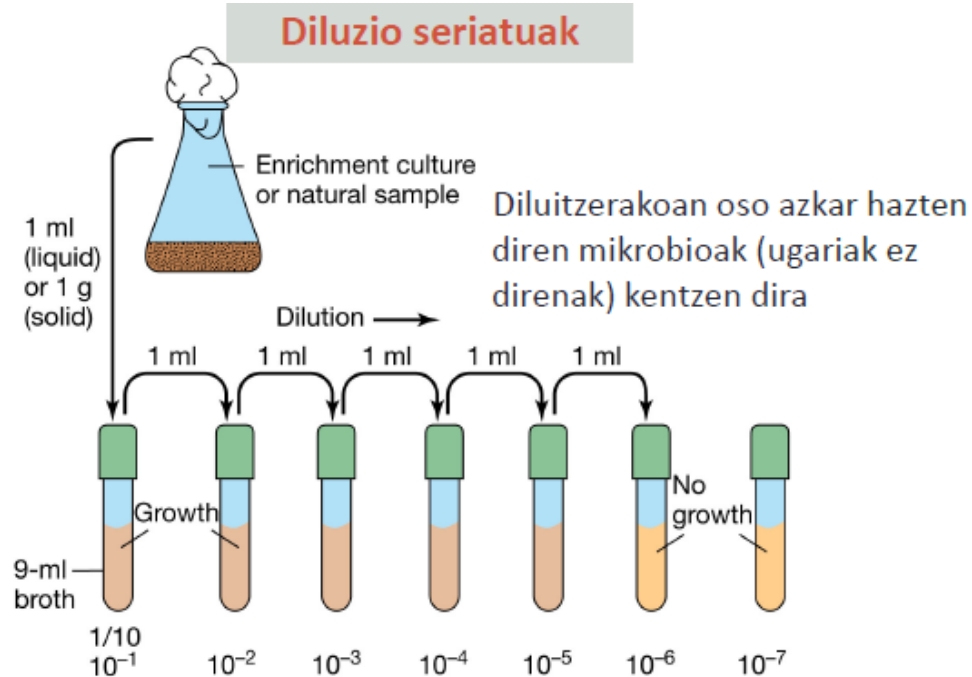
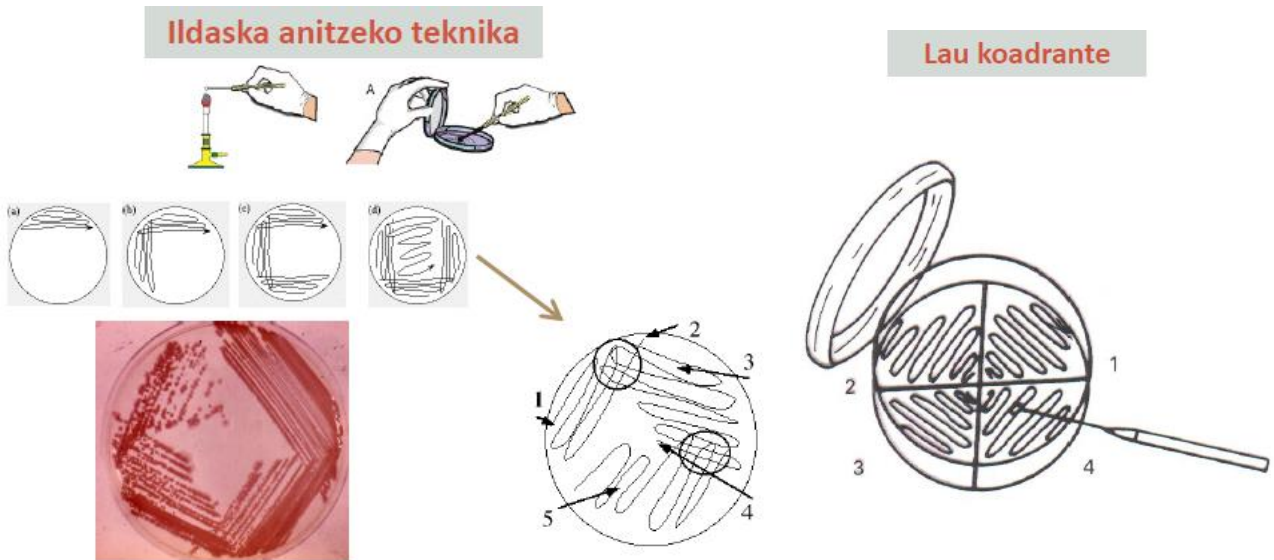
Azkeneko biak ez dira oso erabilgarriak, material berezia behar da. Lagin naturalak hartzen dira eta isolatu egiten dira.

Kultiboaren bidezko isolamenduaren arazoa

Laborategian kultibatutako mikroorganismoak orokorrean ez dira ekosistemaren izaki ugariak. Izan ere, hazkuntza-medioetan elikagaien kontzentrazioak naturan baino askoz altuagoak dira. Gainera, azkar hazten direnak isolatuko dira batez ere, eta hauek ez dira oso ohikoak naturan.

1. Agorpenagatik.

Petri-kutxetan ereintza egingo da hainbat alditan, baina ereintza bakoitza baino lehenago ereintza-euskarria esterilizatu egingo da mikroorganismoak hiltzeko. Modu honetan, ildaska edo koadrante bakoitzean aurrekoan baino mikroorganismo gutxiago egongo dira, azkenekoan kolonia askeak agertu arte. Beste teknika bat diluzio-seriatuak egitea izan daiteke, diluzioak egitean, geroz eta mikroorganismo gutxiago izango ditugu medioan, azkenik mikroorganismo gabe geratu arte. Horrela, hauek ereintzerakoan, koloniak isolatzea lortuko ditugu.

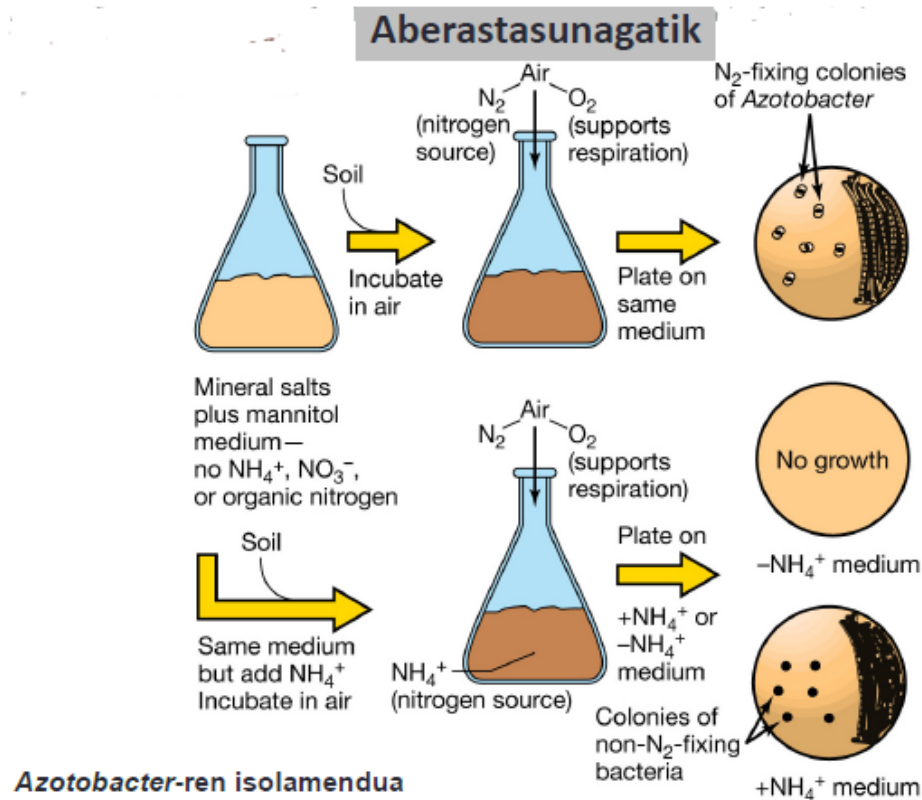


2. Aberastasunagatik

Gure laginean mikroorganismoen dentsitatea oso baxua denean edo isolatu nahi dugun mikroorganismoak ezaugarri bereziren bat daukenean aberastasunaren bidezko isolamendua egingo da. Teknika honetan bi faktoreekin jolastuko da: kultibo-medioak eta aberaste-faktoreak. Kultibo-medio interesgarri bat proposatu behar da, aberaste-medioa edo hautagarria dena, interesatzen den MO hazteko. Aberaste faktoreak ondorengoak izan daitezke: hazkuntza-medioaren osagaiak, tenperatura, pHa, oxigenoa, gatz-kontzentrazioa, inhibitzaileak... Inkubazio-baldintza aproposak eman behar zaizkio guk nahi dugun MO hazteko.

Aberaste-kultiboen bidez leku batean mikroorganismo baten agerpena froga daiteke baina inkubazioa eta gero ez bada ezer hazten ezin da frogatu mikroorganismo bat ez dagoela leku horretan.

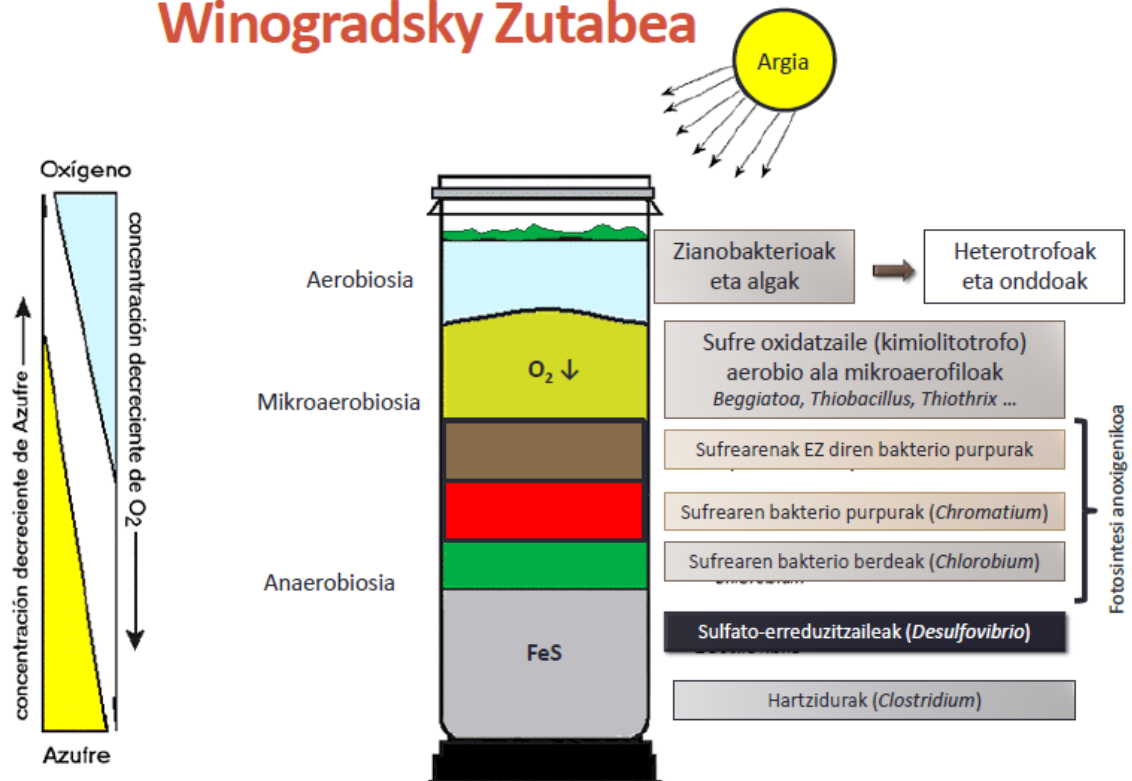
Adibidez, beheko irudian ikusten den bezala, lur lagin bat hartu dezakegu (nitrogeno-iturrik ez duena) eta hau airearekin kontaktuan inkubatuko dugu (N_2 rekin). Ondoren, lur hau petri-plakan ereingo dugu eta hazten diren koloniak nitrogeno finkatzaileak izango dira.



Winogradsky zutabea:

Mikroorganismoen metabolismoa eta elkarren arteko dependentzia aztertu da. Ekosistema artifizial bat da, ur-mikroorganismoak eta sedimentuetakoak aztertzeko. Zutabea argipean eduki behar da eta noizbehinka medioa aberastu egin behar da, materia organikoa eta sulfatoarekin. Lura eta ura zutabearen jartzen da eta denbora bat pasa ondoren, koloreak agertzen dira. Goikaldean O₂-arekin kontaktuan dagoenez, mikroorganismo aerobioak haziko dira eta zutabearen behealdean aldiz, sulfafo-erreduzitzaileak eta anaerobioak.

Winogradsky Zutabea



Mikroorganismo mota	Kultibo baldintza kritikoak	Oinarria
Termofiloak	>55°C	Tenperatura hauetan termofiloak baino ez dira hazten.
Endosporen sortzaileak	Inokulua medioan erein baino lehenago egosi.	Oso zelula begetatibo gutxik jasan dezakete beroa, endosporek bai.
N₂ fixatzen duten zianobakterioak	Inkubazioa anaerobiosian, argipean eta N ₂ gabeko kultibo-medio mineral batean.	Zianobakterio batuk baino ez dira gai fototrofikoki aerobiosian hazteko eta N ₂ finkatzeko.
Sulfatoaren bakterio erreduzitzaileak	Inkubazioa ilunpean, anaerobiosian sulfato ioien eta C iturri ez hartzigarri batekin.	Fotosintesia, arnasketa aerobioa eta hartzidura ez dira posible. Sulfatoaren erreduzitzaileak arnasketa aerobiokoa egin dezakete.
Pestizida zehatz bat degradatzeko gai diren mikrobioak	Inkubazioa ilunpean, aerobiosian, Kultibo-medio mineral batean zeinetan pestizida C iturri bakarra den.	Baldintza hauetan pestizida degradatzeko gaitasuna nahitaetzkoa izango da hazi ahal izateko.

Kultiboaren menpeko isolamenduaren etorkizuna

- Ingurumen naturala imitatzea: kultibo medio diluituak eta ingurumen naturalarekin egindako kultibo medioak.
- *In situ* kultiboak: difusio-ganberak, ichip eta mikrobioentzako tranpak.
- Kokultiboak: mikroorganismo batzuen hazkuntzarako beharrezkoa da beste mikroorganismoen presentzia.
- Inokuluaren diluzioa (agorpena arte)

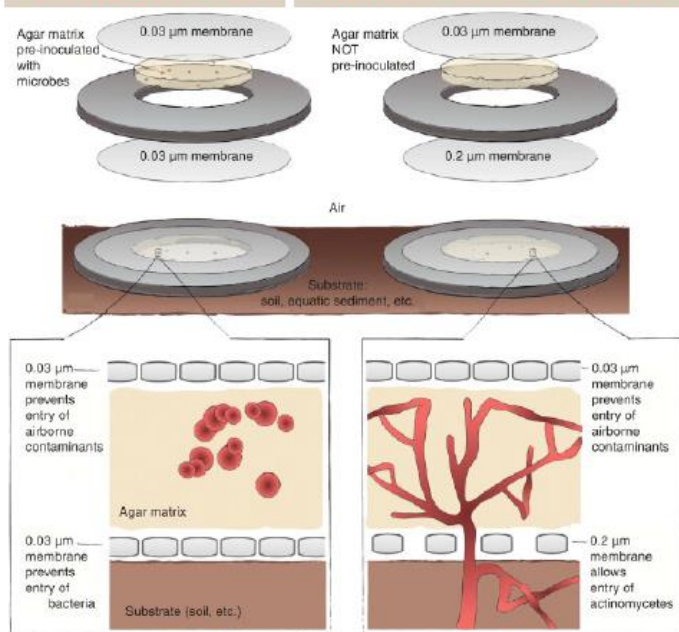
Kultiboaren menpeko isolamenduaren etorkizuna



In situ kultiboak

Difusio-ganbara

Mikrobioentzako tranpa



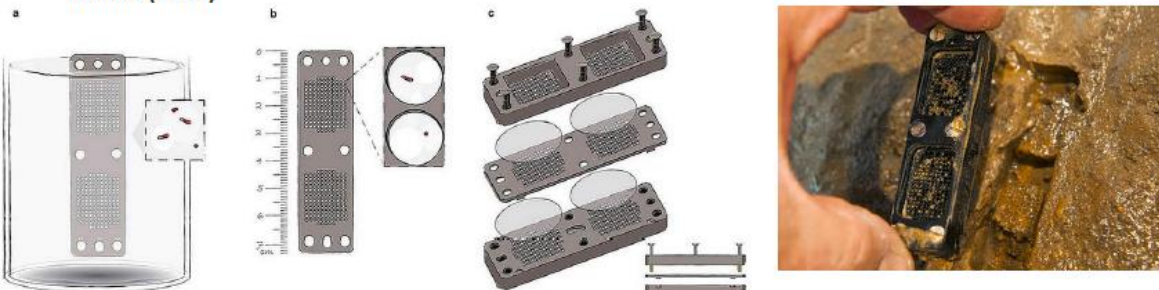
Current Opinion in Microbiology

In situ kultiboak

ichip

- <https://www.youtube.com/watch?v=DEWtHcorLnM#t=33>
- A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance

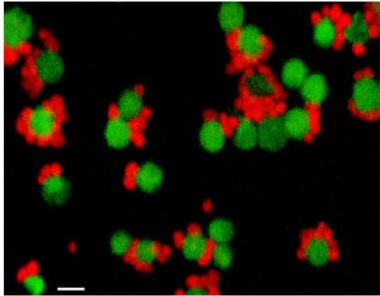
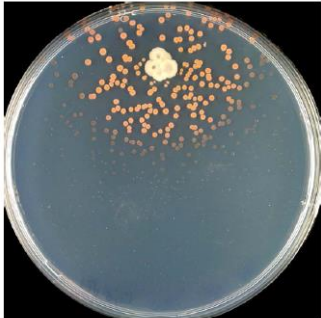
Nature (2015)



a–c. The iChip (**a**) consists of a central plate (**b**) which houses growing microorganisms, semi-permeable membranes on each side of the plate, which separate the plate from the environment, and two supporting side panels (**c**). The central plate and side panels have multiple matching through-holes. When the central plate is dipped into suspension of cells in molten agar, the through-holes capture small volumes of this suspension, which solidify in the form of small agar plugs. Alternatively, molten agar can be dispensed into the chambers. The membranes are attached and the iChip is then placed in soil from which the sample originated.

Kultiboaren menpeko isolamenduaren etorkizuna

Kokultiboa



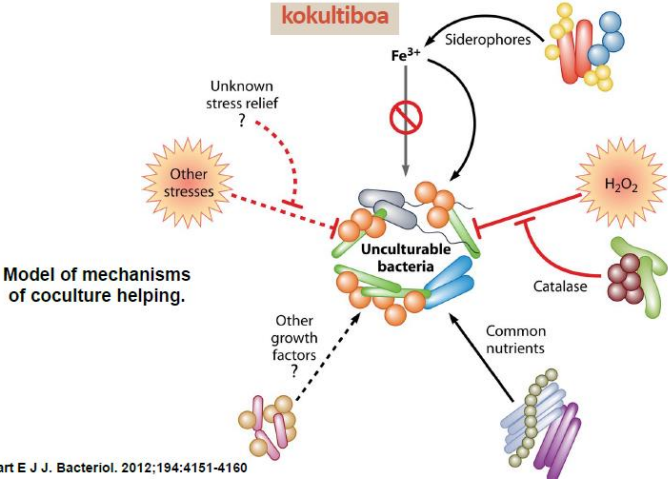
gorria - *Nanoarchaeum equitans* (derrigorrezko bizkarroi berdea - *Igniococcus hospitalis* (*Crenarchaeota* hipertermofiloa)

Coculture-dependent growth of an unculturable isolate.

Stewart E J J. *Bacteriol.* 2012;194:4151-4160

Kultiboaren menpeko isolamenduaren etorkizuna

kokultiboa



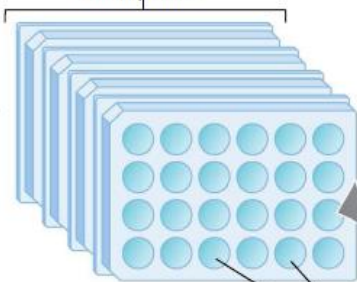
Stewart E J J. *Bacteriol.* 2012;194:4151-4160

Inokuluaren diluzioa agorpena arte

Kultibo-medioa:
Itsasoko ur esterila
Gehi mineralak



Mikroplakak

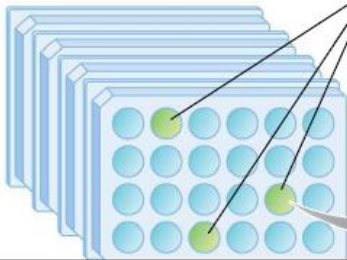


Jarri itsasoko zelula bakarrak
(fluxu-zitometria edo
agorpena arte diluzio bidez)
miroplaken putsutsuetan



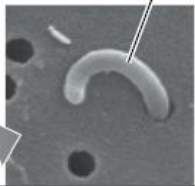
Inokuluaren iturria:
Itsasoko ura 10⁶ zel/ml

Inkubazioa



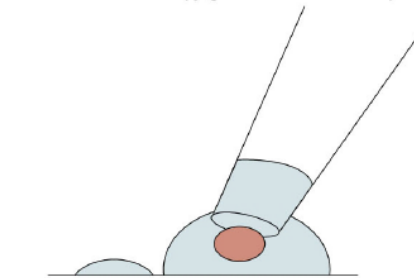
Hazkuntza zelula bakarreko inokulutik

Pelagibacter ubiquus-ren isolamendua

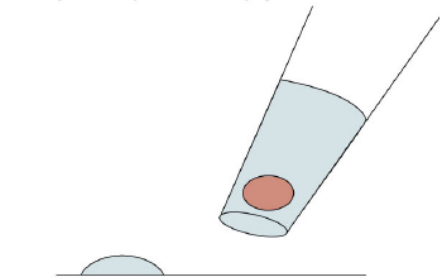


3. Mikropipetak

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Suspension containing desired bacterium to be isolated from a mixture



Desired bacterium is taken up into the sterile micropipette tip

