

COMPARACIÓN DE FLUOROCROMOS PARA EL RECuento DIRECTO DE MICROORGANISMOS TOTALES POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA EN AGUAS MINEROMEDICINALES

^{1,2}Félix Andueza, ²Judith Araque, ²María Gutiérrez, ²Carlos Rodríguez,
^{1,2}Gerardo Medina, ³Carmen de la Rosa, ³Ángeles Mosso.

¹ Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH). Riobamba. Ecuador.

² Laboratorio de Microbiología del Agua. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

³ Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid. España.
anduezaf@ula.ve; felix.andueza@epoch.edu.ec

Resumen

La microscopia de fluorescencia con el colorante naranja de acridina ha sido el método estándar para determinar la población microbiana en muestras de aguas por varias décadas. Sin embargo, se ha cuestionado su utilidad (1). En este sentido, se plantea un trabajo cuyo objetivo ha sido comparar el colorante naranja de acridina respecto a los colorantes Syto 9 y yoduro de propidium contenidos en el Kit LIVE/DEAD BacLight, en la cuantificación del número total de microorganismos presentes en muestras de aguas mineromedicinales, por métodos de epifluorescencia. Se analizó un total de 50 muestras. El recuento de microorganismos totales se realizó por la técnica de recuento directo con microscopio de epifluorescencia utilizando los colorantes naranja de acridina, Syto 9 y yoduro de propidio, respectivamente (2, 3). El diseño propuesto para la comparación estadística de los métodos estudiados fue el de protocolo acoplado. La correlación entre las dos variables estudiadas se calculó por el método de Pearson utilizando el programa estadístico Microsoft Excel 2010. Los análisis de regresión para el recuento de microorganismos totales mostraron un coeficiente de correlación de 0,86 y una pendiente de 1,02, indicando una buena correlación entre las metodologías. El colorante naranja de acridina arrojó valores más elevados de microorganismos totales que los observados con los colorantes Syto 9 y yoduro de propidium.

Palabras claves: fluorocromos, microorganismos, epifluorescencia, agua mineromedicinal

Abstract

Fluorescence microscopy with acridine orange dye has been the standard method for determining the microbial population in samples of water for several decades. However, their usefulness has been questioned (1). In this sense, there is a work whose purpose was to compare the dye acridine orange, with SYTO 9 and propidium iodide dyes, in the quantification of the total number of microorganisms present in samples of spring waters by means of epifluorescence. We analyzed a total of 50 samples. The total count of microorganisms was performed by the technique of direct counting with epifluorescence microscopy using acridine orange, Syto 9 and propidium iodide, respectively (2,3). The proposed design for the statistical comparison of the methods studied was the protocol attached. The correlation between two variables was calculated by the method of using the Pearson statistical program Microsoft Excel 2010. The regression analysis for enumeration of microorganisms showed total correlation coefficients of 0.86 and a slope of 1.02 indicating a good correlation between the methodologies. The dye acridine orange gave higher total microorganisms that observed with the SYTO 9 dyes and propidium iodide

Keywords: fluorochromes, microorganism, epifluorescence, spring water

INTRODUCCIÓN

El conteo directo por epifluorescencia ha sido descrito como un método útil para la enumeración de bacterias totales en muestras medioambientales. El número de bacterias presentes en un ambiente o producto determinado se ha estudiado generalmente utilizando el conteo en placa, con medios de cultivos apropiados. Sin embargo, se han asociado algunas desventajas con esta metodología, tales como el tiempo que consume su realización, la distribución de los microorganismos en los productos, las asociaciones que pueden formar las bacterias tales como cadenas o cúmulos y el hecho de que solo se recupera un 10% de la población presente (4, 5). Una aproximación más directa la constituye el uso de las técnicas microscópicas, sin embargo requieren la diferenciación entre la materia inerte y entre bacterias vivas y muertas. El conteo directo por epifluorescencia ha sido descrito como un método útil para la enumeración del número de bacterias totales en muestras medioambientales (6, 7). La microscopía de fluorescencia con el colorante 3,6-bis-dimetil-amino cloruro de acridina (naranja de acridina) ha sido el método estándar para determinar la población bacteriana en muestras de aguas por varias décadas (6, 8). Sin embargo, diversos investigadores han cuestionado su habilidad para distinguir entre lo inanimado y lo vivo, lo que ha llevado a pensar en una sobrestimación de la población bacteriana presente en diversas comunidades acuáticas (1, 9). En los últimos años, se ha venido utilizando el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight que permite diferenciar entre bacterias vivas y muertas basándose en la integridad de la membrana plasmática bacteriana. El kit está compuesto de dos colorantes fluorescentes que actúan sobre los ácidos nucleicos, el Syto 9 y el yoduro de propidium. El colorante Syto 9 penetra tanto bacterias viables como no viables, mientras que el yoduro de propidium penetra solo en bacterias con daños en la membrana plasmática, eliminando la

fluorescencia verde del Syto 9. De esta manera, las bacterias con daños en la membrana toman una coloración roja fluorescente y las que no presentan daño, una coloración verde (1, 2). Tomando en consideración lo antes señalado en este estudio, se ha comparado los fluorocromos contenidos en el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight respecto al colorante naranja de acridina para enumerar el total de bacterias presentes en muestras de aguas mineromedicinales

MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

A.1. estras

Se tomaron muestras de agua mineromedicinal en los puntos de emergencia de cinco manantiales de agua mineromedicinales, ubicados en la región de Jaraba, Zaragoza, España (San Vicente, San Luis, La Peña, Pilas y San José). Se realizaron cinco muestreos en cada uno de los sitios antes señalados. En cada ocasión, se tomaron dos muestras de agua de 1,5 litros, recogidas en recipientes estériles de plástico, los cuales se trasladaron a temperatura ambiente y en la oscuridad al laboratorio, realizándose los análisis microbiológicos antes de las 24 horas. Simultáneamente, de cada una de las muestras recolectadas, se tomaron 200 ml y se trasvasaron a un recipiente de plástico estéril, añadiendo 2 ml de formol al 4% para fijar e inhibir el crecimiento bacteriano, y poder determinar en el laboratorio el contenido total microbiano.

B. METODOLOGÍA

B.1. Recuento de microorganismos totales y vivos

El recuento de microorganismos totales se realizó por la técnica de recuento directo con microscopio de epifluorescencia (8), siguiendo dos métodos y utilizando los colorantes naranja de acridina, y Syto 9 y yoduro de propidio. En el primer caso, las muestras se tiñeron con el colorante fluorescente naranja de acridina (0,1%) durante cinco minutos, a razón de 1 ml de colorante por 10 ml de agua. Transcurrido el tiempo, se filtraron al menos 2 ml a través de filtros Nucleopore (Millipore) de 0,20 μm de diámetro de poro y de 25 mm de diámetro, y se lavaron con agua estéril. Se depositó el filtro en un portaobjetos, se añadió encima del filtro una gota de aceite de vaselina y se colocó un cubreobjetos. Se examinó con microscopio de epifluorescencia (Nikon) con objetivo de inmersión, utilizando aceite de inmersión no fluorescente. Para aumentar el contraste y evitar la autofluorescencia, se tiñeron los filtros durante varias horas con un

colorante negro Irgalan Black (Merck) en solución al 0,2% en ácido acético al 2% y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. La coloración de las bacterias metabólicamente activas es roja; las inactivas pero vivas, verdes, y las muertas y partículas inertes, color naranja. Para realizar el recuento se contaron los microorganismos presentes en 25 campos del microscopio elegidos al azar. Se calculó la media aritmética que se multiplicó por un factor que incluye el número de campos del filtro y el volumen de agua. El resultado se expresó como número de microorganismos por ml de agua.

En el segundo método, las muestras de agua se tiñeron durante 15 minutos con el kit de viabilidad bacteriana BacLight Live/Dead (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), el cual determina la integridad de la membrana bacteriana, a través de la exclusión selectiva de la tinción (2). El kit está compuesto de dos colorantes afines a los ácidos nucleicos: Syto 9 y yoduro de propidio. El Syto 9 colorea todas las células de verde, y el yoduro de propidio penetra en las células que tengan dañada su membrana, tiñéndolas de rojo (10). La muestra teñida se filtró como en el método anterior, a través de un filtro Nucleopore de 0,2 μm y se observó con objetivo de inmersión en un microscopio de epifluorescencia (Nikon). Seguidamente se cuantificó el número de células verdes (vivas) y rojas (muertas) presentes, en por lo menos 10 campos, y se calculó el número de microorganismos por mililitro de muestra (3).

B.2. Análisis estadísticos

El diseño propuesto para la comparación estadística de los métodos estudiados fue el de protocolo acoplado. La correlación entre las dos variables estudiadas se calculó por el método de Pearson utilizando el programa estadístico Microsoft Excel 2010.

RESULTADOS

Los resultados promedio obtenidos en el conteo de bacterias totales utilizando el colorante naranja de acridina se exhiben en la cuadro 1, y los obtenidos con los colorante Syto 9 e yoduro de propidium en la cuadro 2.

Los resultados obtenidos en el análisis de regresión, así como la curva de regresión obtenida, al comparar los valores promedios obtenidos en el recuento de bacterias totales utilizando el colorante naranja de acridina respecto a los valores promedios obtenidos utilizando los colorantes Syto 9 e yoduro de propidium se muestran en el cuadro 3 y figura 1.

DISCUSIÓN

Varios fluorocromos se han utilizado para determinar el número total de bacterias en muestras ambientales. El naranja

de acridina ha sido ampliamente utilizado y basa su acción en su interacción con los ácidos nucleicos. Cuando la concentración del fluorocromo se mantiene baja, las bacterias crecen con fluorescencia rojo verdosa, debido al predominio del ARN; mientras que las bacterias inactivas, donde predomina el ADN, se observan con una fluorescencia verde. Sin embargo, se han reportado ciertas fallas en el conteo directo por epifluorescencia con naranja de acridina, debido a factores tales como la tasa ARN/ADN en el interior de la bacteria, la concentración del colorante, el contenido de partículas inanimadas en la muestra, medio de cultivo empleado y la taxonomía bacteriana (8, 11). En los últimos años, se ha venido utilizando el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight, que permite diferenciar entre bacterias vivas y muertas basándose en la integridad de la membrana plasmática bacteriana. El colorante Syto 9 penetra tanto bacterias viables como no viables, mientras que el yoduro de propidio penetra solo bacterias con daños en la membrana plasmática, eliminando la fluorescencia verde del Syto 9. De esta manera, las bacterias con daño en la membrana toman una coloración roja fluorescente y las que no presentan daño, una coloración verde (2, 3).

En los cuadros 1 y 2, se resumen los valores promedios obtenidos en el conteo del número total de microorganismos presentes en las aguas minerales naturales analizadas, utilizando los fluorocromos naranja de acridina y los contenidos en el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD.

Del análisis de los datos antes señalados, se puede observar que con el fluorocromo naranja de acridina se obtienen valores promedios comprendidos entre $1,4 \times 10^4$ y $2,0 \times 10^5$ microorganismos por mililitro (cuadro 1) y con el kit de viabilidad LIVE/DEAD, valores promedios entre $0,4 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^5$ microorganismos por mililitro (cuadro 2). Estos valores son muy similares y reflejan una buena correspondencia entre los fluorocromos analizados, a pesar de que, en forma general, los valores obtenidos con

el fluorocromo naranja de acridina son ligeramente superiores a los obtenidos con el kit de viabilidad LIVE/DEAD.

Se ha señalado que el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD da sistemáticamente bajos contajes y correlaciones no ajustadas, aunque significativas, cuando se comparan con otros métodos o fluorocromos (12). El protocolo que se emplea para la aplicación del kit implica una doble tinción, donde un fluorocromo reemplaza a otro por competencia, lo que podría afectar su eficacia y su fiabilidad (2). Sin embargo, en el presente trabajo se obtuvo valores en el mismo orden de magnitud con el kit viabilidad bacteriana LIVE/DEAD y el colorante naranja de acridina.

Todo lo señalado anteriormente podría explicar el mayor número de microorganismos que se detectan con el fluorocromo naranja de acridina en las muestras de agua mineral natural.

En el cuadro 3 y figura 1, se resumen los resultados del análisis de regresión, para comparar los fluorocromos naranja de acridina y los integrantes del kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD, en su habilidad para determinar el número de microorganismos presentes en muestras de agua mineral natural. Tanto los valores del coeficiente de correlación (0,86) como la pendiente (1,02) y la intercepción con el eje x (-0,33), evidencian una buena correspondencia entre los fluorocromos para determinar el número total de microorganismos presentes en muestras de agua mineral natural.

La utilización del kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD, para la determinación del número total de microorganismos presentes en el agua mineromedicinal, además de resultar equiparable al de naranja de acridina, presenta la ventaja de ser más práctico y rápido en su empleo, además de ser mucho más seguro, desde un punto de vista de la toxicidad para el usuario.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten señalar que los fluorocromos estudiados dan resultados

Manantial	1 (N.º/ml)	2 (N.º/ml)	3 (N.º/ml)	4 (N.º/ml)	5 (N.º/ml)
S. Vicente	4,4 x10 ⁴	6,1x10 ⁴	2,9x10 ⁴	3,7x10 ⁴	9,9x10 ⁴
S. Luis	1,4x10 ⁴	1,4x10 ⁵	5,6x10 ⁴	6,6x10 ⁴	4,7x10 ⁴
La Peña	4,3x10 ⁴	2,1x10 ⁴	4,3x10 ⁴	5,7x10 ⁴	1,5x10 ⁵
Pilas	1,9x10 ⁵	7,8x10 ⁴	4,3x10 ⁴	6,1x10 ⁴	6,8x10 ⁴
S. José	2,0x10 ⁵	1,8x10 ⁴	5,8x10 ⁴	6,6x10 ⁴	2,6x10 ⁴

Cuadro 1. Número promedio de microorganismos totales en aguas mineromedicinales de acuerdo con la técnica de coloración con naranja de acridina.

Manantial	1 (N.º/ml)	2 (N.º/ml)	3 (N.º/ml)	4 (N.º/ml)	5 (N.º/ml)
S. Vicente	5,0x10 ⁴	4,6x10 ⁴	2,6x10 ⁴	2,0x10 ⁴	4,5x10 ⁴
S. Luis	0,4x10 ⁴	2,4x10 ⁴	2,2x10 ⁴	1,3x10 ⁴	3,0x10 ⁴
La Peña	1,0x10 ⁴	1,6x10 ⁴	2,6x10 ⁴	2,4x10 ⁴	2,6x10 ⁴
Pilas	3,1x10 ⁵	2,1x10 ⁴	2,1x10 ⁴	1,5x10 ⁴	1,9x10 ⁴
S. José	1,5x10 ⁵	1,4x10 ⁴	3,3x10 ⁴	2,2x10 ⁴	2,2x10 ⁴

Cuadro 2. Número promedio de microorganismos totales en aguas mineromedicinales de acuerdo con la técnica de coloración con Syto 9 y yoduro de propidio (kit BacLight)

Parámetro	Fluorocromos	
	Naranja de acridina (N.º/ml)	Kit BacLight LIVE/DEAD (N.º/ml)
A. Análisis de datos		
Valor mínimo	14.000,00	4.000,00
Valor máximo	200.000,00	150.000,00
Media	53.760,00	33.880,00
Desviación estándar	48.365,17	36.800,49
Nivel de confianza (95%)		
B. Análisis de regresión		
Coefficiente de correlación	0,86	
Pendiente	1,02	
Intercepción eje X	-0,33	
Error típico	0.19	

Cuadro 3. Valores estadísticos para los recuentos de microorganismos totales en aguas mineromedicinales obtenidos con los fluorocromos naranja de acridina y con el kit BacLight

muy similares en la cuantificación del número de microorganismos totales presentes en muestras de agua mineral natural, aunque el colorante naranja de acridina presenta valores superiores a los obtenidos con el kit de viabilidad bacteriana.

La sencillez, rapidez y seguridad en la aplicación del kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD y la eficacia de sus fluorocromos hacen que sea una opción válida y ventajosa para la determinación del número total de microorganismos en muestras de aguas mineromedicinales, donde se requiere saber la presencia del número de células vivas, de manera rápida y precisa.

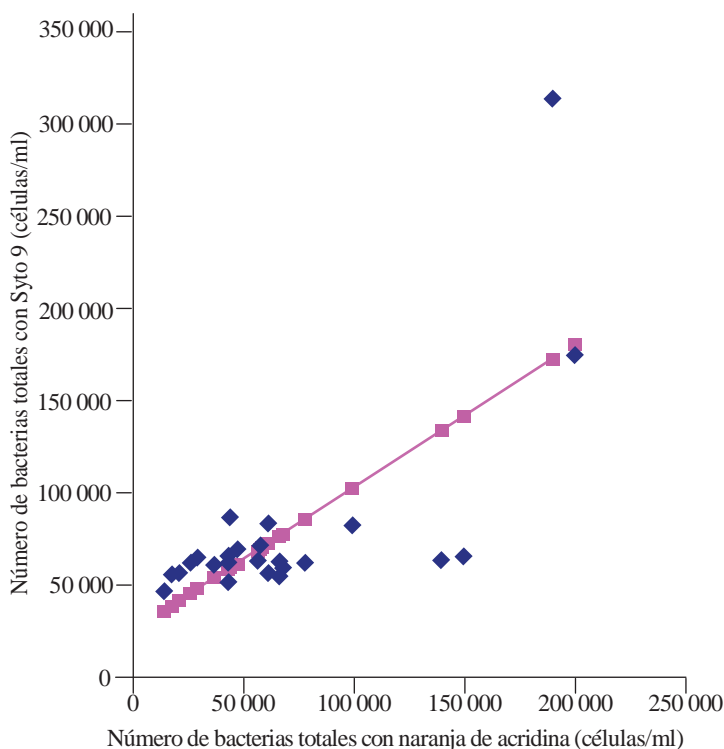


Figura 1. Curva de regresión. Recuento de bacterias totales en aguas mineromedicinales utilizando el colorante naranja de acridina, Syto 9 y yoduro de propidium

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Complutense de Madrid, España, a través del grupo de investigación de aguas mineromedicinales del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia, por las facilidades, el apoyo económico y la asesoría para el desarrollo experimental del presente trabajo.

Al Consejo de Desarrollo Científico, Tecnológico, Humanístico y Artístico de la Universidad de los Andes (CDCHTA), por el financiamiento para parte del presente trabajo, a través del proyecto FA-432-A.

De igual forma, al Ministerio de Ciencias y Tecnología de Venezuela, por parte del financiamiento brindado a través del proyecto del Observatorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Venezuela, sobre microbiota de las aguas termales.

Referencias

1. Defives C, Guyard S, Oulare MM, Mary P, Hornez JP. 1999. Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: A case study. *J. Appl. Microbiol.* 86: 1033-1038.
2. Haugland RP. 1996. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg.
3. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. 1999. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods.* 37: 77-86.
4. Leclerc H, Moreau A. 2002. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol Rev.* 26: 207-222.
5. Senjarini K, Karsten U, Schumann R. 2013. Application of Fluorescence markers for the diagnosis of bacterial abundance and viability in aquatic ecosystem. *J Microbiol Res.* 3 (4): 143-147
6. Kepner RJ, Pratt JR. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev.* 58: 603-615.
7. Nocker A, Richter-Hatmann T, Montijn R, Schureu F, Kort R. 2010. Discrimination between live and dead cells in bacterial communities from environmental water samples analysed by 454 pyrosequencing. *Int Microbiol.* 13: 59-65.
8. Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 33: 1225-1228.
9. Stiefel P, Schmidt S, Manura K, Ren Q. 2015. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO-9 and propidium iodide. *BMC Microbiology.* 15: 2-9.
10. Ramalho R, Cunha J, Teixeira P, Gibbs P. 2001. Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters. *J Microbiol Methods.* 44: 97-103.
11. McFebers G, Singh A, Byun S, Callis P, Williams S. 1991. Acridine orange staining reaction as an index of physiological activity in *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods.* 13: 87-97.
12. Gasol JM, Zweifel UL, Peters F, Fuhrman JA, Hagstrom A. 1999. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 10:4475-83.