

2011-2012

GUÍA DOCENTE

**Métodos de Detección y Cuantificación de
Microorganismos Indicadores y Patógenos**

I.- DATOS INICIALES DE IDENTIFICACIÓN

Nombre de la asignatura:	Métodos de detección e identificación de microorganismos indicadores y patógenos
Carácter:	Intensificación en: - Dirección de EDAR - Gestión Ambiental
Titulación:	Master en Ingeniería Ambiental
Ciclo:	Postgrado
Departamento:	Microbiología i Ecología (UVEG), Biotecnología (UPV)
Profesores responsables:	Esperanza Garay Aubán (UVEG.) Gonzalo Cuesta Amat (UPV)

II.- INTRODUCCIÓN A LA ASIGNATURA

La asignatura está situada como optativa en las dos intensificaciones (P1 y P2). Requiere un conocimiento básico de Microbiología que, si no lo tienen acreditado los estudiantes, lo han de adquirir en la materia troncal: Microbiología Ambiental. Constituye un complemento necesario para todos aquellos titulados que quieran conocer y aprender las técnicas microbiológicas actuales y de uso en un futuro cada vez más cercano para poder detectar y cuantificar determinados grupos microbianos (beneficiosos, perjudiciales, indicadores de contaminación, etc.), llegando hasta la identificación a nivel de especie cuando sea necesario.

III.- VOLUMEN DE TRABAJO

Asistencia a clases teóricas: (12h)

Asistencia a clases prácticas: 5 sesiones de 2 horas de duración (10h)

Preparación del cuadernillo de prácticas: (12h)

Estudio-preparación clases de teoría: 1 hora por tema (5h)

Preparación de clases prácticas: (7h)

Estudio para preparación de exámenes: (24h)

Realización de exámenes: (2h)

Asistencia a tutorías: (3h)

Asistencia a seminarios y otras actividades: Se realizará un seminario de conjunto de las materias vistas en teoría y prácticas al finalizar éstas: (3h)

En síntesis:

ACTIVIDAD	Horas/curso
ASISTENCIA A CLASES TEÓRICAS	12
ASISTENCIA A CLASES PRÁCTICAS	10
PREPARACIÓN DE TRABAJOS	12
ESTUDIO PREPARACIÓN CLASES	5
PREPARACIÓN CLASES PRÁCTICAS	7
ESTUDIO PREPARACIÓN DE EXÁMENES	24
REALIZACIÓN DE EXÁMENES	2
ASISTENCIA A TUTORÍAS	3
ASISTENCIA A SEMINARIOS Y ACTIVIDADES	3
TOTAL VOLUMEN DE TRABAJO	78

IV.- OBJETIVOS GENERALES

De entre los muchos grupos microbianos responsables de la depuración de las aguas residuales, se centrará el estudio en los más sencillos a nivel morfológico y ultraestructural (los procariotas). Su simplicidad morfológica contrasta con sus extraordinarias capacidades metabólicas, por lo que resultan esenciales para la descomposición de la materia en su conjunto, incluidos los compuestos recalcitrantes, así como para la formación de flóculos. Su caracterización/identificación puede realizarse a diferentes niveles: mediante tinción específica para observar el acúmulo de determinadas sustancias de reserva, mediante hibridación con sondas fluorescentes con especificidad a diferentes niveles (dominio, grupo, género, especie, etc.) seguida de observación microscópica, mediante la realización de pruebas metabólicas o fisiológicas, mediante técnicas genético-moleculares, o el uso conjunto de algunas de ellas.

En esta materia, tras haber adquirido los conocimientos básicos de funcionamiento en un laboratorio de Microbiología, las técnicas asépticas de cultivo y transferencia de microorganismos, así como las técnicas básicas de tinción y recuento, se aplicarán estas al caso particular de los microorganismos implicados en los procesos de depuración. El enfoque será tanto cualitativo como cuantitativo y se emplearán técnicas convencionales basadas en el cultivo con vigencia según las normas actuales, y técnicas más recientes basadas en el uso de sondas genéticas específicas y en la complementariedad de los ácidos nucleicos.

Al finalizar la asignatura, el estudiante debe conocer y haberse familiarizado experimentalmente con las técnicas que permiten detectar, cuantificar e identificar determinados microorganismos presentes en las aguas residuales. Conocerá tanto las técnicas de observación microscópica directa como técnicas basadas en el cultivo, y para la identificación habrá utilizado aproximaciones morfológicas, fisiológicas y genéticas. Ello le permitirá estudiar diferentes tipos microorganismos, como por ejemplo los indicadores de un buen o mal funcionamiento o los patógenos que puedan haber sobrevivido al tratamiento.

V.- CONTENIDOS

Tema 1

Microorganismos implicados en el proceso de depuración de aguas residuales: principales grupos. Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos. Microorganismos beneficiosos. Microorganismos que interfieren en el proceso de depuración. Microorganismos patógenos. Indicadores. Formas viables no cultivables.

Tema 2

Recuento de microorganismos. Tipos de recuento: recuentos indirectos, recuentos microscópicos, recuentos de viables en medio sólido y líquido. Tipos y características de los medios de cultivo y de su preparación.

Tema 3

Aislamiento e identificación de microorganismos mediante métodos basados en el cultivo. Medios generales, selectivos y diferenciales. Importancia del cultivo puro. Identificación mediante métodos convencionales. Identificación mediante métodos miniaturizados.

Tema 4

Detección, cuantificación e identificación de microorganismos mediante métodos no dependientes del cultivo. Esquema general. Tipos de técnicas. Comparación de las ventajas e inconvenientes del uso de estas técnicas respecto a las basadas en cultivo.

Tema 5

Aislamiento de DNA. Ventajas e inconvenientes del aislamiento del DNA de cultivos puros y de muestras ambientales. Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fundamento de la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

VI.- DESTREZAS A ADQUIRIR

Junto con la materia troncal “Microbiología Ambiental”, los estudiantes deben aprender una serie de destrezas y conocimientos que son imprescindibles para poder realizar o supervisar correctamente análisis encaminados a cuantificar, aislar e identificar determinados microorganismos presentes en las aguas residuales.

Entre estas destrezas hay que destacar las siguientes:

- Trabajar en condiciones de asepsia y/esterilidad para evitar contaminaciones por los microorganismos patógenos aislados en las clases practicas
- Identificación de microorganismos filamentosos directamente de muestras ambientales por medio de métodos microscópicos
- Observación de microorganismos indicadores del buen o mal funcionamiento de la planta de tratamiento de aguas residuales
- Aislamiento e identificación de patógenos mediante enriquecimiento, aislamiento selectivo e identificación bioquímica
- Utilización de técnicas de biología molecular para detectar microorganismos directamente de la muestra ambiental sin necesidad de aislamiento previo

Los conocimientos teóricos son necesarios para valorar la idoneidad de cada técnica en concreto para cada finalidad, su dificultad, su coste, y por tanto sus ventajas e inconvenientes en cada caso particular.

Las destrezas son muy importantes por las particulares características de los análisis microbiológicos, que implican la necesidad de trabajar con material y medios de cultivos previamente esterilizados, y saber utilizar métodos tanto convencionales como moleculares para la simple detección, la cuantificación o incluso la identificación hasta el nivel de género o especie en el caso de determinados microorganismos.

VII.- HABILIDADES SOCIALES

Instrumentales

- Capacidad de análisis crítico y síntesis.
- Capacidad para organizar y planificar.
- Uso adecuado de términos científico-técnicos.
- Capacidad para manejar textos legales en el contexto de medio ambiente.
- Capacidad de comunicación oral y escrita.
- Capacidad de gestión de la información.
- Toma de decisiones.

Personales

- Capacidad de trabajo en equipo de carácter multidisciplinar.
- Capacidad de trabajo en contexto internacional.
- Capacidad para comunicarse con expertos de otras áreas.
- Habilidades en las relaciones interpersonales.
- Razonamiento crítico.
- Compromiso ético.

Sistémicas

- Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica.
- Habilidad para aprender y trabajar de forma autónoma.
- Adaptación a nuevas situaciones.
- Creatividad. Capacidad para explorar nuevas soluciones.
- Liderazgo. Iniciativa y espíritu emprendedor.
- Motivación por la calidad.

VIII.- TEMARIO Y PLANIFICACIÓN TEMPORAL

Tema	Título y contenido	Número de horas de clase
1	Generalidades. Microorganismos implicados en el proceso de depuración de aguas residuales: principales grupos: bacterias, protozoos. Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos. Microorganismos beneficiosos. Microorganismos que interfieren en el proceso de depuración. Microorganismos patógenos. Indicadores. Formas viables no cultivables.	3
2	Recuento de microorganismos. Tipos de recuento: recuentos indirectos, recuentos microscópicos, recuentos de viables en medio sólido y líquido. Tipos y características de los medios de cultivo y de su preparación.	2
3	Aislamiento e identificación de microorganismos mediante métodos basados en el cultivo. Medios generales, selectivos y diferenciales. Importancia del cultivo puro. Identificación mediante métodos convencionales. Identificación mediante métodos miniaturizados. Tinciones diferenciales y de estructuras en muestras de fango activo.	2,5

4	Detección, cuantificación e identificación de microorganismos mediante métodos no dependientes del cultivo (I). Esquema general. Tipos de técnicas y su aplicación en los análisis microbiológicos. Comparación de las ventajas e inconvenientes del uso de estas técnicas respecto a las basadas en cultivo.	2,5
5	Detección, cuantificación e identificación de microorganismos mediante métodos no dependientes del cultivo (II). Aislamiento de DNA. Ventajas e inconvenientes del aislamiento del DNA de cultivos puros y de muestras ambientales. Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fundamento de la hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	2

PROGRAMA DE PRÁCTICAS (5 sesiones consecutivas de 2 horas)

La asistencia a prácticas es obligatoria. El estudiante debe haberse leído previamente cada práctica con el material proporcionado por el/los profesores. Con el fin de optimizar el tiempo disponible, y debido a las características de las mismas, se pueden solapar varias en un mismo día.

Las prácticas complementan las de carácter general realizadas previamente en la asignatura 'Microbiología Ambiental' y son las siguientes:

- Observación microscópica en fresco de microorganismos en muestras del digestor de diferentes muestras de EDARs: observación de las diferentes morfologías e identificación *de visu* de los principales grupos de protozoos.
- Cálculo del coeficiente micrométrico y medida de los microorganismos observados.
- Observación de los microorganismos bajo diferentes tipos de tinciones diferenciales: Tinción de Gram mediante el método Hucker modificado para bacterias filamentosas. Tinción de gránulos de glucógeno. Tinción de Neisser (gránulos de polifosfato). Tinción de gránulos de PHB.
- Aislamiento e identificación de microorganismos por métodos dependientes del cultivo:
 - 1) Recuento de bacterias indicadoras de contaminación fecal: coliformes fecales (*E. coli*) mediante el método del Número Más Probable (NMP), 2) Aislamiento e identificación de bacterias patógenas intestinales: *Salmonella* spp.
- Identificación de microorganismos mediante métodos no dependientes de cultivo. Hibridación *in situ* mediante sondas marcadas con fluorocromos (FISH).

Seminario para comentar y discutir resultados generales (teoría y prácticas): 3 horas

IX.- BIBLIOGRAFÍA DE REFERENCIA

Bibliografía básica:

- **APHA PRESS. 2005. Standard methods for the exam of waters and wastewater. 21th edition.
- Bitton, G. Encyclopedia of Environmental Microbiology, 6 Volume Set, Wiley Interscience, New York. 2002.
- Bitton, G. *Wastewater Microbiology*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, Inc., 1999.
- Foot, R. J. and Robinson, M. S. "Activated sludge bulking and foaming: microbes and myths". En: *Handbok of Water and Wastewater Microbiology*. Eds.: Mara, D., Horan, N. Academic Press London, 2003. Chapter 32.
- Jenkins, D., Richard, M. G. and Daigger, G. T. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems*. 3rd ed. London: IWA Publishing, 2004.
- Rappé, M.S. and Giovannoni, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Ann. Rev. Microbiol.* 57: 369-394.
- Seviour, R. J. and Blackall, L. L.(Eds). *The microbiology of activated sludge*. London: Chapman & Hall, 1998.

Bibliografía complementaria:

- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Baumler, A. K., Heffron, R., Reissbrodt, R. 1997. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specifics for *iroB*. *J. Clin. Microbiol.* 35: 124-1230
- Beimfohr, C., Krause, A., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. 1993. *In situ* identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. *System. Appl. Microbiol.* 16: 450-456.
- Bej, A., Mahbubani, M.H., Boyce, M.J., Atlas, R.M. 1994. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 368-373.
- **Capuccino, J.G. and Sherman, N. 1992. *Microbiology: a laboratory manual* (3^a ed.). Benjamin/Cummings Pub. Co.Menlo Park, California.
- Davenport, R. J., Curtis, T. P., Goodfellow, M., Stainsby, F. M. and Bingley, M. 2000. Quantitative use of fluorescent *in situ* hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1158-1166.
- Davenport, R. J. and Curtis, T. P. 2002. Are filamentous mycolata important in foaming? *Wat. Sci. Tech.* 46: 529-533.

- de los Reyes, M. F., de los Reyes III, F. L., Hernandez, M. and Raskin, L. 1998. Quantification of *Gordona amarae* strains in foaming activated sludge and anaerobic digester systems with oligonucleotide hybridization probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2503-2512.
- de los Reyes III, F. L., Raskin, L. 2002. Role of filamentous microorganisms in activated sludge foaming: relationship of mycolata levels to foaming initiation and stability. *Wat. Res.* 36: 445-459.
- Eikelboom, D. H. and Geurkink, B. 2002. Filamentous micro-organisms observed in industrial activated sludge plants. *Wat. Sci. Tech.* 46: 535-542.
- **Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R. 1994. *Methods for general and molecular bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Goodfellow, M., Stainsby, F. M., Davenport, R., Chun, J. and Curtis, T. 1998. Activated sludge foaming: the true extent of actinomycete diversity. *Wat. Sci. Tech.* 37: 511-519.
- Kämpfer, P. 1997. Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 169-181.
- Moter, A., Göbel, U. B. 2000. Fluorescent in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 41: 85-112
- Polo, F., Figueras, M., Inza, I., Sala, J., Fleisher, J.M., Guarro, J. 1999. Prevalence of *Salmonella* serotypes in environmental waters and their relationship with indicators organisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 285-292.
- Roszack, D.B., Grimes, D.J., Colwell, R.R. 1984. Viable but non-recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 30: 334-338.
- Soddell, J. A. and Seviour, R. J. 1990. A review: microbiology of foaming in activated sludge plants. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 145-176.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. and Keller, M. 2002. Cultivating the uncultured. *PNAS* 24: 15681-15686.

NOTA: Los marcados con ** son generales para prácticas

X.- METODOLOGÍA

Requisitos previos

Todos los estudiantes que no hayan cursado la materia: “Microbiología” o “Microbiología Ambiental” en su licenciatura o ingeniería, deberán haber cursado previamente la materia “Microbiología Ambiental”.

Sesiones de teoría

Los estudiantes recibirán unas clases presenciales, impartidas por el profesor, centradas en los descriptores de la materia.

El primer día se darán conceptos generales y la bibliografía a consultar, y los días restantes se dedicarán a explicar las bases y características de las diferentes técnicas necesarias para realizar los análisis correspondientes. Los estudiantes deben repasar aquellos conceptos básicos de Microbiología necesarios para poder seguir los temas del programa.

Sesiones de prácticas

Se impartirán por dos profesores, teniendo en cuenta las características especiales de las prácticas y su importancia en esta asignatura:

- 1.- PREVENCIÓN DE RIESGOS. En las sesiones prácticas de microbiología el uso del mechero de gas es imprescindible para conseguir una zona de mayor asepsia alrededor del mismo para las inoculaciones de tubos, placas o matraces, así como para la esterilización de las asas de siembra previas a su uso y para el secado o fijado a la llama de las tinciones. Como cada uno de los estudiantes ha de adquirir dichas destrezas, todos necesitan trabajar cerca de un mechero con los peligros que conlleva el uso simultáneo de tantos mecheros.
- 2.- CONTROL POR PARTE DEL PROFESOR. Aunque se supone que los estudiantes han adquirido una mínima destreza en las técnicas básicas de inoculación, transferencia y manejo del material en condiciones asépticas, en estas prácticas se van a aprender otras técnicas que también requieren un aprendizaje bajo la supervisión continua por parte del profesor. Como prácticas concretas a realizar por cada estudiante están la técnica de obtención de cultivos puros por el método de la estría múltiple y la inoculación de sistemas miniaturizados multipocillo para la identificación de microorganismos patógenos en efluentes de EDAR.
- 3.- ESPACIO/SEGURIDAD. En el laboratorio donde se tiene previsto impartir las sesiones prácticas no se dispone de espacio para que un número mayor de estudiantes puedan trabajar en condiciones seguras.

Las prácticas se impartirán en el laboratorio de forma intensiva después de las clases de teoría.

Cuadernillo de prácticas

Al finalizar las prácticas, cada estudiante dispondrá de 15 días para elaborar un cuadernillo que incluya los protocolos y los resultados obtenidos en cada práctica realizada. Se darán instrucciones concretas sobre el cuadernillo el primer día de prácticas.

Seminarios

Al finalizar las clases de prácticas se realizará un seminario conjunto teoría-prácticas para relacionar lo tratado en teoría con lo aprendido en prácticas, y para discutir y comentar los resultados de estas.

Sesiones de tutoría

Se dedicarán un máximo de 3 horas por estudiante a tutorías. El horario y lugar de las mismas se consensuará con ellos el primer día de clase.

XI.- EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE

El aprovechamiento del estudiante en esta asignatura se evaluará teniendo en cuenta:

1. La asistencia, actitud y participación en las clases teóricas (5% de la nota).
2. El interés y la destreza mostrados en las clases prácticas y en el seminario final. (10% de la nota).
3. La superación de una prueba escrita con preguntas sobre el temario al finalizar las clases prácticas. Las preguntas se referirán tanto a las clases de teoría como a las de prácticas. (55% de la nota).
4. La presentación y calidad del cuadernillo elaborado por cada estudiante. Se valorará especialmente la claridad en la exposición de los resultados y la explicación de los mismos. (30% de la nota).

Para aprobar la materia hay que obtener una media de 5 puntos sobre 10 en las evaluaciones de la prueba escrita y del cuadernillo de prácticas.

Las actividades planificadas que el estudiante deba realizar fuera de la asistencia presencial serán coordinadas entre las distintas materias del master y bajo la supervisión de la Comisión de Coordinación Académica del Master.