

# BIOLOGÍA MOLECULAR: APLICACIONES AMBIENTALES

**DRA. LUCIA FERRANDO**  
[luciaf@fq.edu.uy](mailto:luciaf@fq.edu.uy)

---

LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA MEDIOAMBIENTAL (LEMM)  
DEPARTAMENTO DE BIOCIENCIAS- FACULTAD DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA (UDELAR)

# Contenido

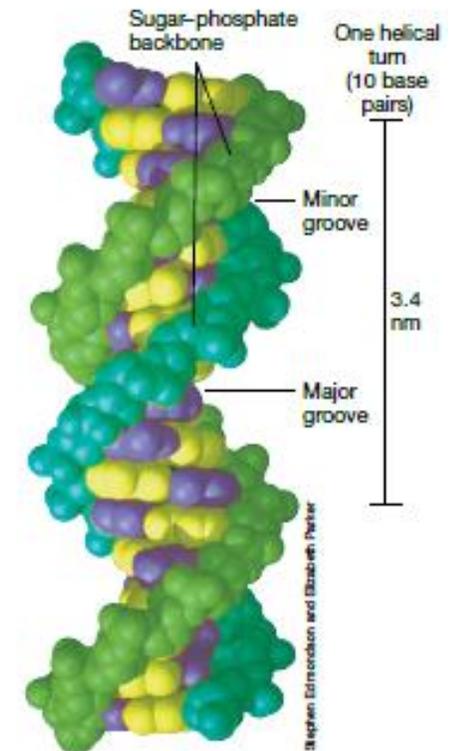
---

- Conceptos básicos de biología molecular
- Técnicas de biología molecular: ¿por qué son útiles?
- ¿Cuáles son las técnicas moleculares utilizadas en laboratorios ambientales?
- Ejemplos de técnicas moleculares validadas por agencias ambientales
- Guías o normas disponibles

# Conceptos básicos Biología molecular

## ADN: Ácido DesoxirriboNucleico

- Es una biomolécula informativa
- Contiene la información genética de un organismo.
- Está formado por nucleótidos (un azúcar + una base nitrogenada + fosfato)
- Los cuatro tipos de bases nitrogenadas encontradas en los nucleótidos son: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C).



Brock, 2019

# ADN

---

- El orden, o secuencia, de estas bases determina qué instrucciones biológicas están contenidas en una hebra de ADN.

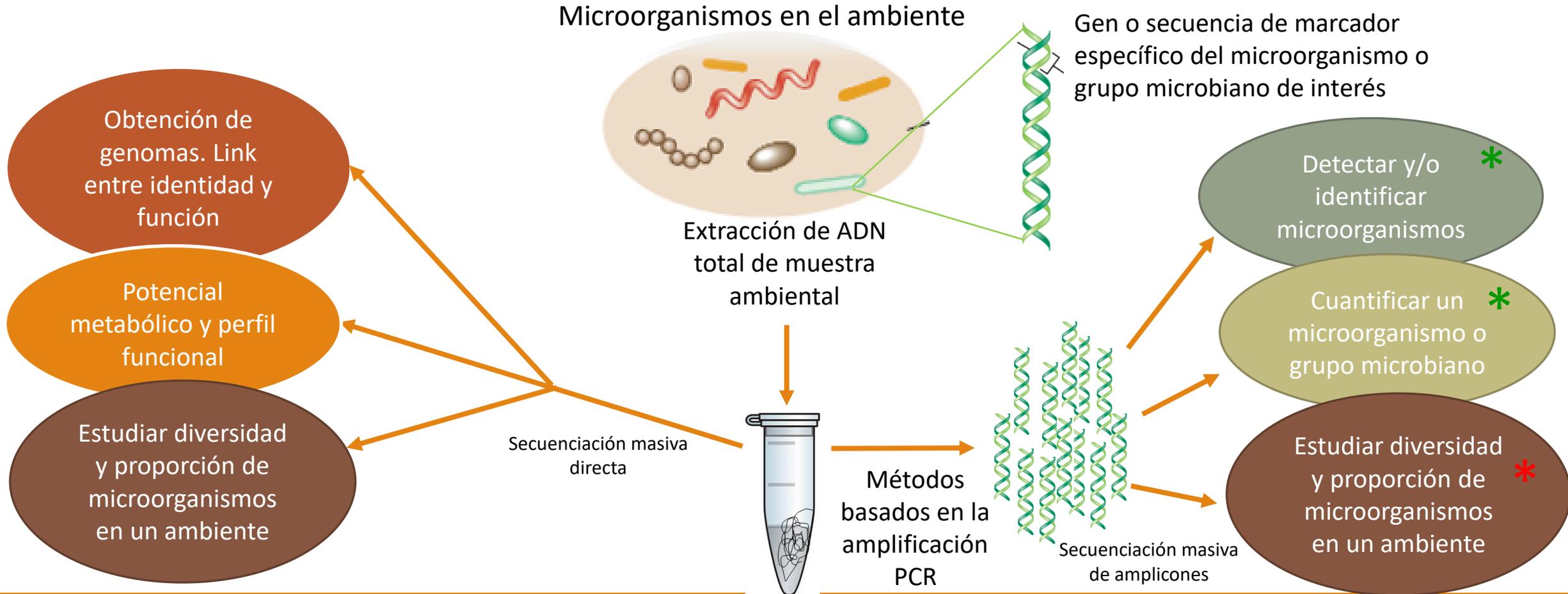
AGCTAAGT  $\neq$  AGGATCTA

- La información genética se encuentra en la secuencia de nucleótidos.

## Gen: unidad funcional de información genética

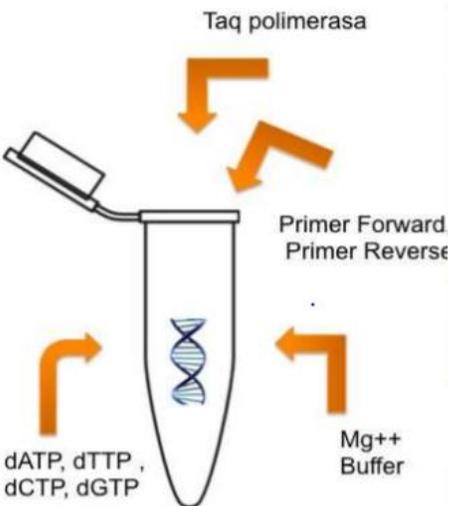
- Los genes forman parte de los cromosomas u otros elementos genéticos presentes en un organismo

# Métodos moleculares basados en ácidos nucleicos en muestras ambientales

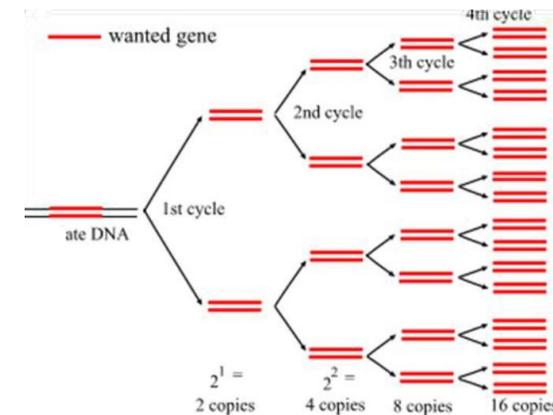
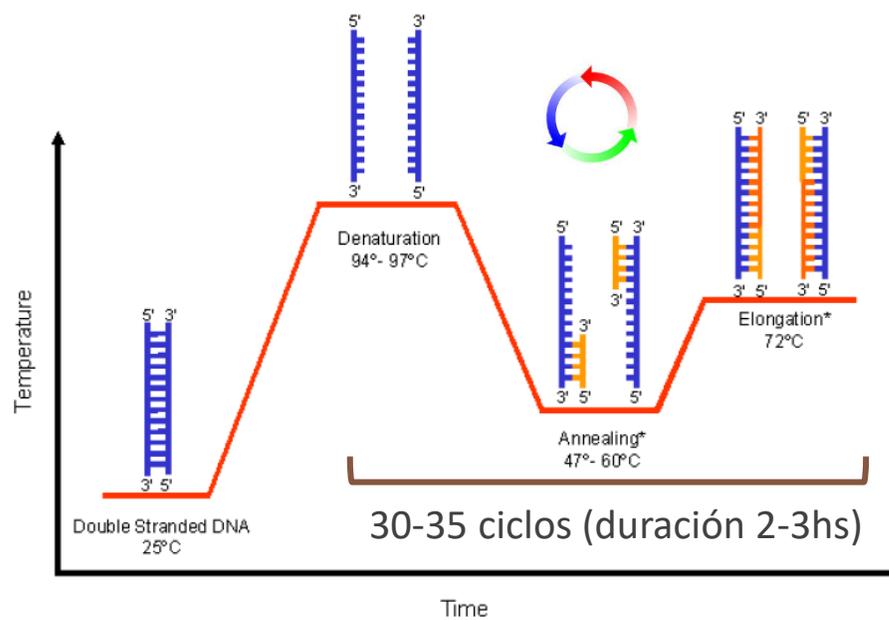


# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Reactivos,  
enzima, ADN  
molde



Condiciones de  
Temperatura y  
tiempo

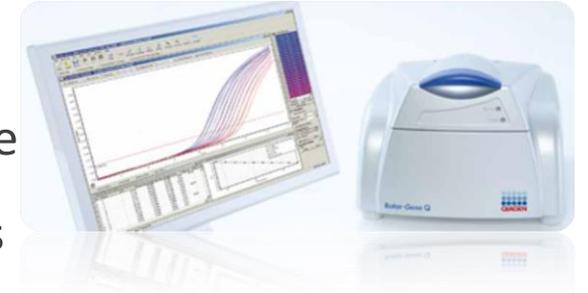


**Amplificación  
exponencial**

Ciclo 35: 2<sup>35</sup> copias del  
fragmento amplificado

# Real time PCR= PCR cuantitativa =qPCR

- Variante de PCR convencional
- Se cuantifica “en tiempo real” la cantidad de producto formado luego de cada ciclo de amplificación mediante el uso de fluorocromos (diferentes tipos de detección, SYBR Green o sondas de hidrólisis)
- La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto amplificado
- Alta sensibilidad y precisión
- Automatización
- Evita manipulación post PCR



# Aplicaciones

---

<https://www.epa.gov/esam/sam-pathogen-methods>

IDENTIFICACIÓN (CONFIRMACIÓN)

DETECCIÓN

CUANTIFICACIÓN

# Metodologías de EPA para *Salmonella* spp. (no Typhi)

Pathogen(s) [Disease]	Analytical Technique	Method Type	Analytical Method									
			Aerosol (growth media, filter, liquid)		Particulate (swabs, wipes, Sponge-Sticks, vacuum socks and filters)		Soil		Drinking Water		Post Decontamination Waste Water	
Non-typhoidal <i>Salmonella</i> (Not applicable to <i>S. Typhi</i> ) [Salmonellosis]	NA	Sample Preparation	EPA YP Protocol (EPA/600/R-16/109)	III	EPA YP Protocol (EPA/600/R-16/109)	III	EPA Method 1682 (EPA-821-R-06-14)	I	EPA Method 1200 (EPA 817-R-12-004) or Standard Method 9260 B: <i>Salmonella</i> or EPA YP Protocol (EPA/600/R-16/109)	I/III	EPA Method 1200 (EPA 817-R-12-004) or EPA Method 1682 (EPA-821-R-06-14) or Standard Method 9260 B: <i>Salmonella</i> or EPA YP Protocol (EPA/600/R-16/109)	I/I/III
	Culture	Analytical Technique	EPA Method 1682 (EPA-821-R-06-14) or EPA Method 1200 (EPA 817-R-12-004)	I	EPA Method 1682 (EPA-821-R-06-14) or EPA Method 1200 (EPA 817-R-12-004)	I	EPA Method 1682 (EPA-821-R-06-14) or EPA Method 1200 (EPA 817-R-12-004)	I	EPA Method 1682 (EPA-821-R-06-14) or EPA Method 1200 (EPA 817-R-12-004)	I	EPA Method 1682 (EPA-821-R-06-14) or EPA Method 1200 (EPA 817-R-12-004)	I
	Real-time PCR	Analytical Technique	Jyoti <i>et al.</i> 2011. Environ. Sci. Technol. 45(20): 8996-9002	II	Jyoti <i>et al.</i> 2011. Environ. Sci. Technol. 45(20): 8996-9002	II	Jyoti <i>et al.</i> 2011. Environ. Sci. Technol. 45(20): 8996-9002	II	Jyoti <i>et al.</i> 2011. Environ. Sci. Technol. 45(20): 8996-9002	II	Jyoti <i>et al.</i> 2011. Environ. Sci. Technol. 45(20): 8996-9002	II

[https://www.epa.gov/sites/default/files/2018-01/documents/sam\\_2017\\_appendix\\_c\\_1.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2018-01/documents/sam_2017_appendix_c_1.pdf)

# Ejemplo 1

---



## **Method 1200: Analytical Protocol for Non-Typhoidal *Salmonella* in Drinking Water and Surface Water**

**May 2012**

Método para la identificación, confirmación y cuantificación de *Salmonella* no tifoidea en agua potable y aguas superficiales.

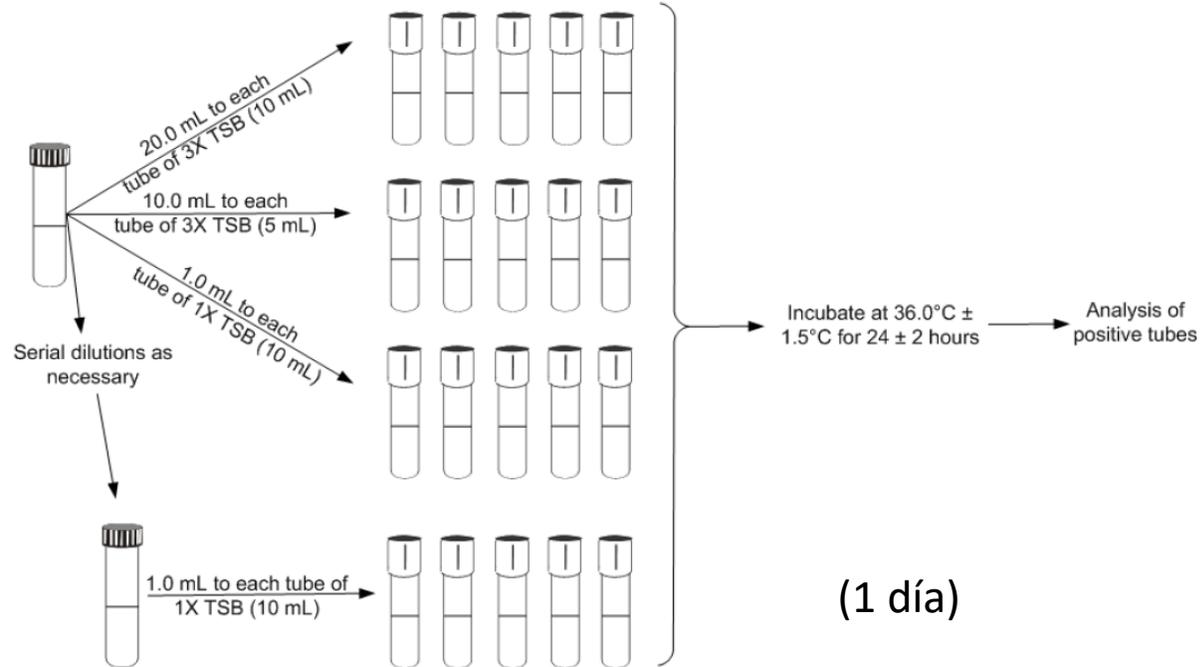
Método adaptado del método de biosólidos (EPA 1682)  
Detección o cuantificación (NMP) de *Salmonella* (no typhi)

18.1 Quantitative Analysis Dilution Scheme

Distribution of Sample to TSB  
Section 11.2.1

Incubation at 36.0°C ± 1.5°C for 24 ± 2 hours  
Section 11.2.3.

**Cuantificación  
(Número Más Probable)  
de  
*Salmonella***



**Detección de  
*Salmonella***

Dilución al ½ de la  
muestra en caldo TSB  
doble concentración

Incubate at 36.0°C ± 1.5°C for 24 ± 2 hours  
Analysis of positive tubes

**Confirmación** de  
tubos o caldos  
positivos (con  
turbidez)

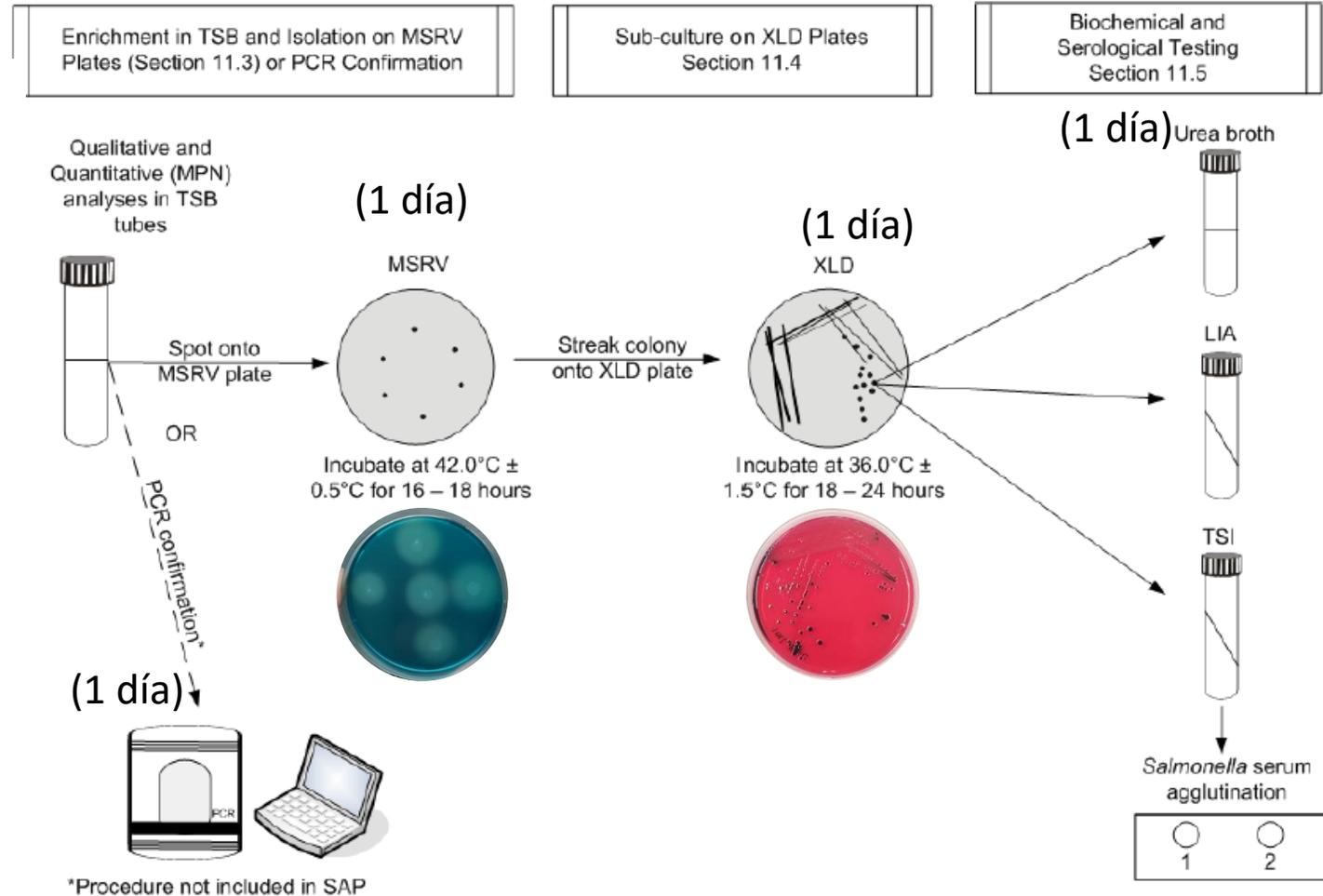
2.6 TSB tubes (MPN and qualitative analysis) exhibiting growth (turbidity) or growth from MSR/V plates may be confirmed by real-time polymerase chain reaction (PCR) in place of biochemical and serological confirmation.

**Identificación clásica de *Salmonella* no Typhi (3 días)**

**Confirmación**  
de tubos o caldos positivos (con turbidez)

**Identificación molecular de *Salmonella* no Typhi (<1 día)**

**18.2 Identification Flowchart**



# Ejemplo 2



## Method 1609.1: Enterococci in Water by TaqMan<sup>®</sup> Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Método para la evaluación de la calidad de aguas recreacionales y ambientes marinos



Desarrollo, validación y transferencia del procedimiento “Determinación de enterococos en aguas naturales, aguas residuales y lodos de plantas de tratamiento. Método molecular, empleando TaqMan Real Time PCR” al Laboratorio Ambiental de DINACEA-MA.

# Ejemplo 3: Cuantificación y detección de Cianobacterias y genes responsables de producción de toxinas en ambientes acuáticos



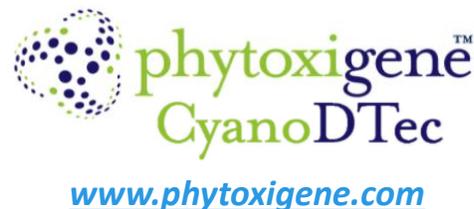
Identificación y cuantificación de:

- Filo *Cyanobacteria*
- Producción de Microcistinas y Nodularina
- Cylindrospermopsina
- Saxitoxinas

Rápido y específico

Material de referencia certificado

## Ensayo comercial Multiplex qPCR



Primers and TaqMan probes used in this study.

Target gene	Primer/probe name	Primer/probe sequence <sup>a</sup>
16S rRNA	16SF	AGCCACACTGGGACTGAGACA
	16SR	TCGCCATTGCGGAAA
	16SP	<u>FAM-CCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-BHQ1</u>
<i>mcyE/ndaF</i>	<u>mcyF + flap</u>	<u>AATAAATCATAATTTAGAACSGGVGATTAGG</u>
	<u>mcyR + flap</u>	<u>AATAAATCATAACGRBTVADTTGRTATTCAATTTCT</u>
	mcyP	<u>CY5-AATCAAGTTAAGGTVAATGGYTATCG-BHQ1</u>
<i>cyrA</i>	cyrF	GTCTGCCACGTGATGTTATGAT
	cyrR	CGTGACCGCCGTGACA
	cyrP	<u>CY3-CCTTTGGGAACGAAATTCTCGAAGCAACT-BHQ2</u>
<i>sxtA</i>	sxtF	GGAGTGGATTTCAACACCAGAA
	sxtR	GTTTCCAGACTCGTTTCAGG
	sxtP	<u>Texas Red-TGCCGATTTAGAAGAAAGTATCCTCTCAG-BHQ2</u>

Ohio EPA DES 705.0 Method and lab certification

# Ejemplo 4: Indicadores de contaminación fecal y rastreo de origen de contaminación

- Cuantificación de indicadores de contaminación fecal

- Microbial Source Tracking:

Se detectan microorganismos (o genes de microorganismos) asociados o específicos de ciertos hospederos (marcadores)

Provee información sobre la presencia y magnitud de la contaminación de ese animal específico

TARGET	MI CODE	RELEVANCE / DATA INTERPRETATION
General <i>Bacteroides</i>	GenBAC	One of the prominent bacterial groups inhabiting the intestinal tracts of warm blooded animals including humans, cattle, swine, horses and dogs. Quantification of total <i>Bacteroides</i> provides a general indicator of fecal contamination.
Total <i>Enterococcus</i>	TENT	Enterococci, a subset of fecal streptococci, are found in the feces of all warm blooded animals and are believed to have higher survival rates in water than fecal coliforms. As with total <i>Bacteroides</i> , the total <i>Enterococcus</i> assay provides a general indicator of fecal contamination.
Total <i>E. Coli</i>	TECOLI	The total <i>E. coli</i> assay also provides a general indicator of fecal contamination.
Human <i>Bacteroides</i>	HF183	Quantification of genetic markers of fecal <i>Bacteroides</i> from humans.
Ruminant Bacteria	BacR, Rum2Bac	Quantification of two genetic markers of fecal <i>Bacteroides</i> from a variety of grazing animals.
Canada Goose <i>Bacteroides</i>	CGBACT-1,2	Quantification of two genetic markers of fecal <i>Bacteroides</i> from Canada Geese.
Dog <i>Bacteroides</i>	DBACT	Quantification of a genetic marker of fecal <i>Bacteroides</i> from dogs.
Seagull <i>Catellibacillus</i>	GULL-CAT	Quantification of a genetic marker of <i>Catellibacillus marimammalium</i> shown to be an indicator of gull fecal contamination.
Human Polyomavirus	HPyVs	Evidence indicates that more than 70% of humans harbor and shed polyomaviruses in their urine.

EPA/600/R-05/064  
June 2005

<https://microbe.com/microbial-source-tracking/>



Microbial Source Tracking

**Microbial Source Tracking Guide Document**

# Ejemplo 4: Indicadores de contaminación fecal y rastreo de origen de contaminación

- Muestras de agua dulce o salobre
- Filtración por membrana + extracción de ADN
- qPCR
- **Gen blanco:** 16S rRNA *Bacteroides dorei*, bacteria aislada de seres humanos (Haugland et al., 2010)



**Method 1696: Characterization of Human Fecal Pollution in Water by HF183/BacR287 TaqMan® Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay**

# Guías y Normas

---

## **ISO 20395:2019(en)**

Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:20395:ed-1:v1:en>

## **ISO 11063:2020(en)**

Soil quality — Direct extraction of soil DNA  
<https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:11063:ed-2:v1:en>

## **ISO 17601:2016(en)**

Soil quality — Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil  
<https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:17601:ed-1:v1:en>



Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples

October 2004

# Guía EPA 2004



EPA 2004

# Convenio DINACEA- Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental, Facultad de Química

---

- Equipo docente responsable: Prof. Adj. Javier Menes, Prof. Adj. Lucía Ferrando y Prof. Titular Ana Fernández
- Actividades:
  - Desarrollo y transferencia de procedimiento para cuantificación de *Enterococcus* en aguas y lodos de PTAR
  - Asesoramiento en la implementación de técnicas moleculares y montaje del laboratorio de biología molecular
  - Dictado de dos cursos teórico- prácticos de capacitación- actualización:
    - *“Análisis microbiológico en muestras ambientales”*, diciembre 2019
    - *“Herramientas moleculares empleadas para estudiar procesos microbianos en el ambiente”*, Setiembre 2021

*¡Gracias  
por su  
atención!*

