

DETERMINACION DE BACTERIAS AEROBIAS TOTALES EN UNA MUESTRA DE AGUA

Por bacterias aerobias totales se entienden todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, heterótrofas, mesófilas y criófilas capaces de crecer en un medio de agar nutritivo

MATERIAL NECESARIO

- Placas con medio TSA
- Tubos con solución salina conteniendo 4.5 ml
- Pipetas estériles

PROCEDIMIENTO

1.- Tomar un frasco con la muestra de agua cuyo numero de bacterias se quiere determinar y hacer diluciones decimales de la muestra. Las diluciones se realizan tomando 0.5 ml de la muestra de agua y pasándolo a un tubo que contenga 4.5 ml de solución salina. De esta manera se ha conseguido disminuir el número de bacterias 10 veces por lo que a esta dilución se le denomina la 10^{-1} . De ella se toma 0.5 ml que se pasan a otro tubo con 4.5 ml obteniendo así la dilución 10^{-2} . Y así sucesivamente hasta llegar a una dilución de la que se sospeche que va a haber un número de células inferior a 100 por mililitro.

2.- Una vez hechas las diluciones, se eligen tres de ellas, para realizar la siembra por triplicado es decir se siembran tres placas de cada una de las diluciones elegidas con 0.1 ml. La siembra se realiza con espátula.

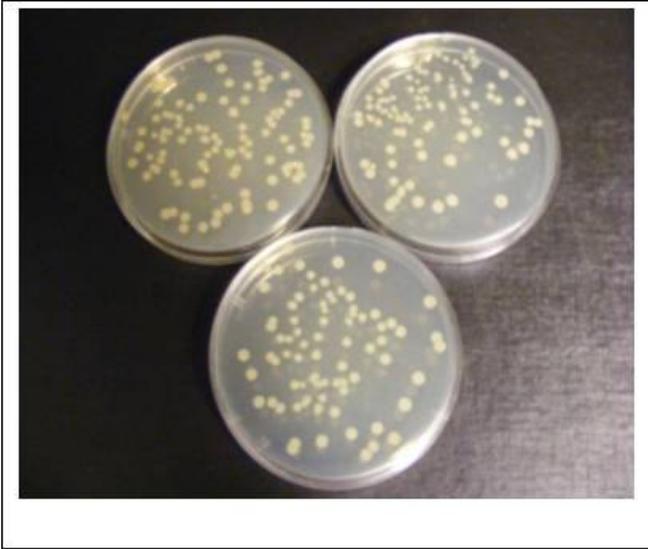
3.- Una vez sembradas las placas se llevan a incubar a 37°C durante 48 h para el recuento de las bacterias mesófilas y a 22°C para determinar las bacterias criófilas.

Lectura e interpretación de los resultados.

Transcurrido el tiempo de incubación pertinente se cuentan todas las colonias crecidas en las placas. Se elige aquella dilución en la que el número de colonias por placa se encuentre entre 30 y 300. descartando las otras diluciones para el recuento. Solo se contarán las colonias de aquellas placas que posean menos de 30 en el caso de que sea una muestra sin diluir. El resultado se expresará en unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. A la hora de obtener este resultado hay que tener en cuenta que se han sembrado 0.1 ml y el factor de dilución.

Veamos un caso práctico: Se han contado las tres placas sembradas de la dilución 10^{-4} y se ha obtenido un recuento de 43, 45 y 47 colonias respectivamente en las tres placas. Para expresar el resultado del recuento, primeramente se hace la media de las tres placas $(43+45+47:3=45)$ que sería de 45 colonias. Puesto que se ha sembrado 0.1 ml. para saber el número de colonias por mililitro será necesario multiplicar por 10, por tanto será $45 \times 10 = 4.5 \times 10^2$ en el mililitro de la dilución 10^{-4} . Así, en la muestra original el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC /ml) será de $4.5 \times 10^2 \times 10^4$ es decir, 4.5×10^6 UFC/ml

Recuento



PROBLEMAS

1. Calcule el número de UFC/mL de una muestra si al hacer diluciones y sembrar en placa 500 µl de cada una se obtienen los siguientes resultados.

Dilución 10^{-6} : 1021 – 1003 - 899

Dilución 10^{-7} : 88 – 91 - 75

Dilución 10^{-8} : 10 - 24 - 7

SOLUCION

Elegiríamos la dilución 10^{-7} , ya que tiene un número de colonias comprendido entre 30 y 300.

La media de colonias obtenidas en esa dilución, a partir de la siembra de un volumen de 0.5 mL es 85 UFC, por tanto

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{85}{0.5} 10^7 = 170 \times 10^7 = 1.7 \times 10^9 \frac{UFC}{mL}$$

2.- Calcule el número de UFC/mL de un cultivo de *Escherichia coli*, incubado durante 24 horas en medio TSB si al hacer diluciones y sembrar en placa 200 µl de cada una de las diluciones en tres placas por dilución, se obtienen los siguientes resultados.

Dilución	Colonias contadas en Placa 1	Colonias contadas en Placa 2	Colonias contadas en Placa 3
10^{-5}	923	1256	857
10^{-6}	75	95	102
10^{-7}	6	11	9
10^{-8}	2	1	0

SOLUCION

Elegiríamos la dilución 10^{-6} , ya que tiene un número de colonias comprendido entre 30 y 300.

La media de colonias obtenidas en esa dilución, a partir de la siembra de un volumen de 0.2 mL es 91 UFC, por tanto

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{91}{0.2} 10^6 = 455 \times 10^6 = 4.55 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}$$

DETERMINACION DE BACTERIAS AEROBIAS TOTALES Y CON ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN UNA MUESTRA DE SUELO

A.- DETERMINACION DE BACTERIAS AEROBIAS TOTALES

MATERIAL NECESARIO

Tierra tamizada

Tubos con 4.5 ml de solución salina

Placas con medio TSA

Placas con medio agar-celulosa, agar-almidón y agar-leche

PROCEDIMIENTO

Se pesan 0.5 g de tierra tamizada y se adiciona a un tubo que contiene 4.5 ml de solución salina. A esta primera dilución la denominamos como 10^{-1} (0.5 g de tierra en 4.5 ml de solución salina) La cual se agita en el agitador de tubos durante 15 seg. Y se deja reposar durante 1 minuto para que sedimenten las partículas de mayor tamaño.

A continuación se procede a seguir haciendo diluciones seriadas de esta suspensión inicial, para ello, se toman 0.5 ml de la suspensión y se pasa a un nuevo tubo con 4.5 ml de solución salina (10^{-2}). De esta manera cada nueva dilución va a tener 10 veces menos de bacterias que la anterior. El número de diluciones va a depender de la densidad de bacterias a la que se quiere llegar, el número de diluciones a realizar no debe ser superior a la 10^{-8} .

Una vez realizadas las diluciones se eligen tres de ellas para sembrarlas, de cada dilución, se siembran tres placas, adicionando 0.1 ml de la dilución a cada placa y extendiendo la suspensión con una espátula de vidrio. Una vez sembradas las placas se incuban a 28° C durante 48-72 horas para proceder a su lectura.

Lectura e interpretación de los resultados

Pasado el tiempo de incubación, se realiza un recuento del número de colonias que aparecen por placa y se hace la media entre las tres placas sembradas de la misma dilución. A continuación se estima en número de unidades formadoras de colonias que existen en un gramo de la tierra utilizada, teniendo en cuenta la dilución en la que se ha realizado el recuento, que se ha partido de 0.5 g de suelo y que se ha sembrado un volumen de 0.1 ml en la placa.

Por ejemplo, si han aparecido 23, 27 y 25 UFC en cada una de las placas de la dilución 10^{-5} y se han sembrado 0.1 ml de la dilución en cada placa, el cálculo será el siguiente:

La media de UFC será $23+27+25:3=25$ UFC

Como habíamos sembrado tan solo 0.1 ml de la dilución 10^{-5} el número de UFC en 1 ml será 10 veces mayor es decir $25 \times 10 = 250$ UFC/ml de la dilución 10^{-5}

B.- DETERMINACION DE BACTERIAS CON ACTIVIDADES ENZIMATICAS

El propósito de esta práctica es aislar bacterias del suelo capaces de degradar una serie de sustratos naturales como pueden ser el almidón, la celulosa o las proteínas es decir con actividades amilolíticas, celulolíticas o proteínolíticas respectivamente.

MATERIAL NECESARIO

Tierra tamizada

Tubos con 4.5 ml de solución salina

Placas con medio agar-celulosa, agar-almidón o agar leche.

PROCEDIMIENTO

1. Utilizar las mismas diluciones realizadas para el recuento de bacterias aerobias totales.
2. Sembrar las diluciones sobre los medios con almidón celulosa ò leche según la actividad buscada.
3. Incubar las placas a 30°C durante al menos 48 horas.

En nuestro caso vamos a buscar bacterias proteolíticas por tanto vamos a sembrar en medio agar-leche cuya composición es la siguiente:

Leche en polvo 5g en 50 ml de agua destilado

Agar 1g en 50 ml de agua destilada

Esterilizar a 115°C durante 20 minutos

Dejar enfriar a 55-60 °C

Mezclar con cuidado y repartir en placas

Lectura e interpretación de los resultados

Pasado el tiempo de incubación, en las placas de agar-celulosa y de agar leche se comprueba la producción de enzimas viendo directamente los halos de hidrólisis alrededor de las colonias, en el caso del almidón sería necesario usar lugol como revelador observándose la hidrólisis del almidón alrededor de las bacterias como halos amarillos transparentes sobre un fondo azul oscuro debido a la presencia de almidón no hidrolizado.

Los recuentos se realizan al igual que en el caso de las bacterias aerobias totales, teniendo en cuenta el número de halos presentes en cada caso, el volumen sembrado en la placa por el método de la espátula de vidrio y la dilución de la placa en la que se está realizando la lectura.



AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEL AIRE MEDIANTE EL METODO DE SEDIMENTACION EN PLACA

El aire, además de partículas en suspensión, es portador de microorganismos mesófilos aerobios ó de sus esporas. Por ello puede ser causa de la contaminación de los alimentos y de superficies como de infecciones en el hombre y en los animales (patologías cutáneas y respiratorias).

Existen diversos métodos para el análisis bacteriológico del aire, y aquí vamos a realizar el que se conoce como *método de sedimentación en placa*. Este método es uno de los más sencillos para la determinación de los microorganismos del aire, pero los resultados son sobre todo orientativos de las cifras de microorganismos presentes en el, ya que los valores obtenidos dependen de una serie de factores como: las corrientes de aire que se produzcan en los distintos tiempos ó el tamaño de las partículas en suspensión.

El método consiste, en dejar abiertas durante 30, 60 y 90 minutos una serie de 3 placas con un medio general como el TSA en el lugar cuyo nivel de contaminación se quiere estudiar. Transcurrido el tiempo deseado, se cierran las placas y se dejan incubar a 28°C durante 24-48 horas. Tras este tiempo se observan las placas y se podrá determinar la variedad y la cantidad de microorganismos presentes en el aire mediante la visualización y el recuento de los diferentes tipos de colonias que aparecen.



ANALISIS BACTERIOLOGICO DE SUPERFICIES MEDIANTE EL METODO DEL HISOPO

El objetivo de esta práctica es comprobar el estado higiénico del lugar de trabajo ó poner de manifiesto la presencia de microorganismos en algún tipo de superficie de cualquier tipo.

Existen varios métodos para llevar a cabo este tipo de análisis, y aquí vamos a realizar el método del hisopo, el cual es apropiado para cualquier tipo de superficie, sea plana ó no.

Este método es el mas antiguo de los utilizado en el análisis microbiológico de superficies, sobre todo de aparatos y utensilios. Esta especialmente recomendado para estudiar superficies muy contaminadas, ya que permite realizar diluciones decimales de la muestra. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Delimitar la superficie que se va a analizar mediante una plantilla de papel de aluminio esteril, con una abertura de dimensiones conocidas (por ejemplo 9cm^2).
- Humedecer el hisopo estéril en un tubo de solución salina con 4.5 ml estéril y restregar varias veces por la superficie delimitada de la plantilla.
- Introducir de nuevo el hisopo en el tubo de solución salina y dejar en reposo el hisopo dentro del tubo entre 15-30 minutos de manera que los microorganismos se liberen del algodón al líquido.
- Sembrar 0.1 ml del liquido en una placa con medio TSA.
- Incubar la placa a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24-48 h y realizar el recuento, expresándolo como UFC por unidad de superficie.

Si lo que se quiere es conocer los diferentes tipos de microorganismos presentes en una superficie determinada (por ejemplo la piel o las mucosas humanas) bastara con tomar el hisopo estéril sin humedecer y tocar en la zona de estudio. A continuación, se siembra una placa de TSA haciendo estrías con el hisopo directamente sobre la superficie del agar y se llevara a incubar a 37°C durante 24-48 horas.