

Trabajo Práctico N° 5 Estudio cuantitativo de bacterias

RECUESTO DE COLONIAS EN PLACA

Es un método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra.

El recuento de microorganismos, en este caso, se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible. Pero debido a que una muestra no es totalmente homogénea con respecto a su composición microbiológica, es posible que una colonia se origine de un microorganismo o de cientos de ellos, dando en este último caso un recuento menor del real.

También es posible que muchas de las bacterias presentes en la muestra no puedan crecer en las condiciones elegidas (pH, temperatura, medio de cultivo, tiempo, etc.). En este caso el recuento también será inferior al real. Lo que si se sabe es que cada colonia observada se formó a partir de por lo menos un microorganismo. Esta es una condición necesaria y suficiente. Entonces la colonia es considerada una unidad formadora de colonia (ufc) a los efectos de los cálculos.

Se admite, por lo tanto, que en los métodos de recuento de microorganismos vivos, son inevitables los errores. Especialmente cuando se examinan muestras pequeñas, es posible cometer grandes errores.

Técnica Operatoria

Preparar una suspensión al 10 % de suelo en 50 ml. de agua destilada. La tierra debe estar seca y recién recogida.

Mantener en agitación la suspensión anterior durante 30 a 60 minutos. Puede utilizarse agitación manual o magnética.

Preparar diluciones seriadas de 1/10, 1/ 100, 1/ 1.000, 1/ 10.000 y 1/ 100.000 de la suspensión anterior respetando un volumen final de 5 ml.

Se rotulan 5 placas (una para cada dilución) sembrar 0.1 ml (con pipeta limpia en cada una) de cada dilución en una placa de Petri con Agar Nutritivo y con ayuda de una asa de Digralski extenderlo por toda la placa.

Incubar a 37 °C durante 2- 3 días en estufa o incubadora.

Observar las placas en busca de efectos de inhibición.

Realizar el recuento de los microorganismos presentes en la muestra del suelo. Para realizar el conteo se escogen las placas que muestren entre 30 y 300 colonias. Para visualizar mejor es conveniente ubicar la placa sobre una caja con tapa de vidrio y luz, dividiendo la superficie total de la placa en sectores cuadrículados. Dar el resultado en ufc/g (no en bacterias por gramo):

$\text{Ufc/g} = \text{N}^\circ \text{ de colonias en placa (entre 30 y 300)} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$
--



Técnica de extensión en placa para el recuento de colonias viables: Se pipetea la muestra asépticamente sobre un medio agarizado. Luego se esteriliza el asa de Digrafsky introduciéndolo en alcohol, flameando y enfriando. El asa estéril se usa para esparcir la suspensión sobre la superficie del medio.

ESTIMACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

Este método se basa en la presunción de que las bacterias se hallan uniformemente distribuidas en un medio líquido, o sea que las muestras del mismo tamaño de un mismo producto tendrían el mismo número de microorganismos. Naturalmente las muestras contienen algunos gérmenes más o menos. Entonces la cifra media es el número más probable.

Las bacterias rara vez están separadas de sus vecinas. Ellas se agrupan en racimos, en especial cuando se reproducen activamente. Además la agitación puede deshacer o inducir a la formación de racimos. Por lo tanto carecen de valor las pruebas que se obtienen de una prueba aislada.

Si el número de gérmenes es grande, la diferencia entre las muestras será pequeña, pero si es pequeño las diferencias relativamente serán mayores.

Esta técnica se usa principalmente para la estimación de bacilos coliformes en caldo Mac Conkey, pero puede ser empleada para casi toda clase de gérmenes en muestras líquidas.

Es posible calcular el número de gérmenes por cada 100 ml. con cualquier combinación de resultados obtenidos de tales muestras. Existen tablas para muestras de 10ml., 1ml. y 0,1 ml. utilizando cinco o tres tubos para cada tamaño de la muestra.

Técnica Operatoria

Se mezclan las muestras mediante vigorosas sacudidas e inversiones. Si se trata de una muestra de agua potable debe agregarse un inhibidor de cloro.

Se pipetea las cantidades mencionadas de suspensión de muestra y se colocan en tubos con 5 ml de medio de cultivo (caldo Mac Conkey):

Tres tubos con 10 ml. (en medio reforzado)

Tres tubos con 1 ml. (en medio simple)

Tres tubos con 0,1 ml. (en medio simple)

Se aconseja el empleo de medios reforzados (de doble concentración) para grandes volúmenes de muestra para evitar que el medio se diluya demasiado.

Para observar si las bacterias producen gas los tubos con medio de cultivo deben contar con una campana de Durham en su interior, la cual se coloca antes del proceso de esterilización.

Se incuban durante 24 o 48 hs. a 35- 45 °C.

Se observa el crecimiento considerando positivos los tubos que manifiestan turbidez, cambios de color o producción de gas.

Se tabulan los números de tubos positivos y se consultan las tablas.

TABLA 1

Número más probable en 100 ml. usando 3 tubos sembrados con 10, 1 y 0,1 ml. de muestra

Tubos positivos			NMP	Tubos positivos			NMP	Tubos positivos			NMP
10 ml.	1 ml.	0.1 ml		10 ml.	1 ml.	0.1 ml		10 ml.	1 ml.	0.1 ml	
0	0	0	3	1	2	0	11	2	3	3	53
0	0	1	6	1	2	1	15	3	0	0	23
0	0	2	9	1	2	2	20	3	0	1	39
0	1	3	3	1	2	3	24	3	0	2	64
0	1	0	6	1	3	0	16	3	0	3	95
0	1	1	9	1	3	1	20	3	1	0	43
0	1	2	12	1	3	2	24	3	1	1	75
0	2	3	6	1	3	3	29	3	1	2	120
0	2	0	9	2	0	0	9	3	1	3	160
0	2	1	12	2	0	1	14	3	2	0	93
0	2	2	16	2	0	2	20	3	2	1	150
0	3	3	9	2	0	3	26	3	2	2	210
0	3	0	13	2	1	0	15	3	2	3	290
0	3	1	16	2	1	1	20	3	3	0	240
0	3	2	19	2	1	2	27	3	3	1	460
1	0	3	4	2	1	3	34	3	3	2	1100
1	0	0	7	2	2	0	21	3	3	3	1100+
1	0	1	11	2	2	1	28				
1	0	2	15	2	2	2	35				
1	1	3	7	2	2	3	42				
1	1	0	11	2	3	0	29				
1	1	1	15	2	3	1	36				
1	1	2	19	2	3	2	44				

ACTIVIDADES

1- Responda el siguiente cuestionario

1. ¿Qué permite determinar el estudio cuantitativo de bacterias?
2. ¿Qué tipo de muestras se pueden analizar? Ejemplifique.
3. ¿En qué consiste el medio Mc Conkey reforzado y por qué se lo utiliza?
4. Mencione las limitaciones del método del recuento de colonias en placa.
5. ¿Por qué carecen de valor los resultados de una prueba aislada en NMP?
6. Describa las características observadas en los tubos donde considera que hubo crecimiento bacteriano.
7. Teniendo en cuenta la composición del medio utilizado para NMP, ¿cómo lo clasificaría y por qué?
8. Describa cómo obtendría una dilución de 10^{-5} de la muestra a analizar