A top-down view of a petri dish containing a bacterial culture. The agar surface is covered with numerous colonies of varying sizes and colors, including yellow, orange, white, and red. The colonies are scattered across the dish, with some appearing as small dots and others as larger, more distinct circular patches. The background is dark, making the colonies stand out.

MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA
POBLACIÓN BACTERIANA

MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
DE AGUAS

INDICE:

Tabla de contenido

MICROBIOLOGÍAS DE AGUAS. INTRODUCCIÓN	3
RECUENTOS CELULARES DIRECTOS	4
RECUENTOS DE BACTERIAS VIABLES	5
EN MEDIO SÓLIDO:	5
RECUESTO DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS:	5
MÉTODO DE RECUESTO EN PLACA DE SIEMBRA POR DISEMINACIÓN EN SUPERFICIE RECUESTO DE AEROBIOS TOTALES O DE ALGÚN OTRO MICROORGANISMO QUE SELECCIONEMOS QUE EL MEDIO DE CULTIVO:	8
EN MEDIO LÍQUIDO: DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MAS PROBABLE (NMP) DE MICROORGANISMOS POR ML, G / O 100 ML. (MEDIO LÍQUIDO)	9
TABLA 1: NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP) DE BACTERIAS EN ALIMENTOS, (TRES TUBOS POR CADA DILUCIÓN):	12

Objetivos:

- Conocimiento de los fundamentos de recuentos celulares directos en cuerpos de agua.
- Manejo práctico de las técnicas de utilizadas en el recuento de bacterias coliformes para aguas , técnica de NMP.
- Búsqueda de bacterias que marcan contaminación antrópica en cuerpos de agua: *E coli* , *Enterococcus* y *Pseudomana aeruginosa*.

Microbiologías de aguas. Introducción

El agua es esencial para la vida en nuestro planeta. Por ello se realizan seguimientos de la calidad del agua de ríos y mares. La contaminación antrópica del agua, es de importancia ya que es un vía de transmisión de enfermedades para el ser humano. Para conocer el estado bacteriológico del agua es necesario conocer el número y tipo de bacterias por unidad de volumen presentes en una muestra representativa. El recuento de bacterias por medios físicos o químicos nos permite establecer el número de microorganismos existentes, independientemente de que estén vivos o muertos y de sus características metabólicas.

El estudio de las poblaciones microbianas en agua se puede realizar por:

Recuentos celulares directos (físicos):

- ❖ Recuento directo en cámaras al microscopio óptico común.
- ❖ Microscopía de fluorescencia
- ❖ Recuento en contadores electrónicos de partículas.

Recuento de bacterias viables:

- ❖ Recuento de unidades formadoras de colonias.
- ❖ Determinación del número más probable.
- ❖ Estimación del número por el método de las diluciones por extinción.

Actividad bioquímica.

Observaciones

Los métodos de recuento celulares directos nos permiten conocer el número de bacterias, o partículas de tamaño similar. Sin embargo no nos indican si esas bacterias son metabólicamente activas.

Los métodos de bacterias viables son los más empleados y los que más concordancia tienen con la presencia de bacterias. Estos métodos utilizan medios de cultivo para el desarrollo de las bacterias por lo que la composición del medio de cultivo tiene una importancia capital, pues de acuerdo a su composición permitiremos el desarrollo de uno o varios géneros bacterianos, pero debemos tener en cuenta que un solo medio de cultivo **NO PERMITE EL DESARROLLO DE TODOS LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN UNA MUESTRA.** Utilizando varios medios de cultivo con composiciones diferentes y diversas condiciones ambientales, se podrán determinar un número mayor de géneros bacterianos en una muestra.

La masa celular, el contenido de nitrógeno y de fosfolípidos son promisorias para la detección y cuantificación de bacterias fijas y especialmente el contenido de fosfolípidos que puede informarnos sobre la calidad de las bacterias.

RECUENTOS CELULARES DIRECTOS

En cámaras al microscopio:

El más práctico es el que utiliza cámaras graduadas, Ej.: Petroff, Hauser o Neubauer. Estas cámaras son portaobjetos excavados y cuadrículados con precisión que forman pequeños cuadros de $1/400 \text{ mm}^2$. Se pone un cubreobjetos que queda $1/50 \text{ mm}$. del fondo de la excavación de manera que el volumen sobre el cuadro es de $1/20000 \text{ mm}^3$. Se parte de una solución homogénea de gérmenes y se carga la cámara con una pipeta cuenta glóbulos, se utiliza solución de cristal violeta fenicado (10 ml. de solución alcohólica de cristal violeta y 100 ml. de c.s.p. de agua destilada). Esta solución mata los gérmenes y los colorea. Se realizan luego del conteo, los cálculos correspondientes. La desventaja de este método es que no hay manera de saber si las células son viables o no.

Por epifluorescencia:

Se utiliza en muestras ambientales para estimar N° total de bacterias (no viables, y viables cultivables y no cultivables). Se basa en el uso de fluorocromos, como el naranja de acridina, que tienen la propiedad de absorber luz U.V. y emitir radiaciones dentro del espectro visible. El naranja de acridina se une a los fosfatos de los ácidos nucleicos emitiendo fluorescencia.

En contadores electrónicos de partículas:

Estos contadores se basan en los siguientes principios:

I.- Las células que atraviesan una abertura por la cual está pasando corriente, provocan cambios en la resistencia eléctrica que se registran como impulsos eléctricos. Se trabaja con una suspensión de bacterias.

II.- En los contadores ópticos electrónicos, un tubo fotomultiplicador detecta la luz que dispersan las células al pasar por un rayo. La dispersión es debida a la reflexión externa de las superficies celulares o por difracción de la luz que pasa tangencialmente a las superficies celulares.

RECUEENTOS DE BACTERIAS VIABLES

En medio sólido:

El recuento de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) determina U.F.C./g ó U.F.C./ml que desarrollan en placas de Petri con medio solidificado con agar.

Diferentes factores que influyen en el resultado:

- * **Medio de cultivo, composición, presencia de inhibidores.**
- * **Temperatura de incubación.**
- * **Presencia de oxígeno.**
- * **Humedad.**
- * **Tiempo de incubación.**

Variando estos factores, podemos obtener una amplia variedad de condiciones que favorecen el desarrollo de bacterias con distintas características ó de distintos géneros.

Comúnmente se usa el denominado "Recuento de bacterias aerobias mesófilas". Este método se describirá a continuación y es aplicable a otros grupos de microorganismos, sólo con cambiar el medio de cultivo y las condiciones de incubación.

RECUESTO DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS:

Método de recuento en placa por siembra por volcado:

(ver esquema 1):

Fundamento:

En este procedimiento se introduce una cantidad medida (generalmente 1 ml) del líquido ó dilución del sólido en una caja de Petri. Se adiciona agar fundido y enfriado a 45° suave, mediante agitación rotatoria de la caja se mezcla el inóculo con el agar. Cuando el medio se solidifica los microorganismos quedan atrapados en el agar. Luego de la incubación cada microorganismo desarrolla formando una colonia. La cuenta de colonias en la placa indica el número de unidades formadoras de colonias. La muestra original se diluye de tal manera que se desarrollen entre 30 y 300 colonias, entre estas cantidades la cuenta es más exacta y la posibilidad de interferencia entre los microorganismos es mínima.

Si la suspensión bacteriana es homogénea cada microorganismo dará origen a una colonia, si contiene conglomerados de células, es decir que la bacteria tiene tendencia a formar racimos o cadenas, el número de colonias será menor que el número de células individuales, pues cada conglomerado formara una colonia. Por ello los resultados se expresan en "U.F.C.". Este método es aplicable para alimentos, agua, leche y diversos productos. No es recomendable para las muestras ambientales pues la temperatura del agar fundido puede afectar la viabilidad de este tipo de bacterias.

Técnica:

1. Toma y preparación de la muestra

Identificación del sitio de la toma de muestra: Debe hacerse de manera unívoca. Si se dispone de GPS posicionar satelitalmente la ubicación, de lo contrario especificar el lugar de la manera más concreta posible.

Al momento de muestreo es necesario recavar, como mínimo, la siguiente información:

- Identificación unívoca de la muestra (nombre, código, etc.)
- Identificación del sitio de muestreo (georreferenciación: latitud, longitud)
- Tipo de fuente y características de la misma (pozo calzado, perforación, canal, río, represa, aljibe, profundidad del nivel estático y total si fuera pozo o perforación, diámetro de la perforación, pozo, cercanía a pozos negro o industrias, existencia de pozos abandonados, mar, costa agua de profundidad, etc.)
- Condiciones de muestreo (fecha y hora).
- Nombre de quien realizó el muestreo.
- Tipo de análisis a efectuar (físico-químico y/o microbiológico).
- Reactivo empleado para su preservación, en caso de ser utilizado.
- Cualquier otra observación que se considere de importancia.

La muestra a analizar se recoge en frascos de vidrio neutro con tapa esmerilada o colectores de plástico de capacidad conveniente 200 -500 mL y boca ancha, estériles. En caso que la muestra sea agua, la obtención debe realizarse de distintos puntos.

Grifo:

Limpia interior y exteriormente la boca del mismo, eliminando la materia orgánica. Esterilizar calentando con hisopo embebido en alcohol. Dejar correr un chorro de agua 5 min., abrir el frasco retirando la tapa y sosteniendo siempre con el papel protector, llenar el frasco y tapar.

IMPORTANTE: Una vez tomada la muestra se debe analizar inmediatamente, caso contrario **refrigerar entre 0 - 5°C**. Si la muestra está congelada, descongelar en su envase original durante 18 hs. entre 2 - 5°C.

Aguas superficiales:

Quitar la tapa y sumergir el frasco boca abajo 30 cm., invertir y cuando este lleno retirar del agua y tapar.

Diluciones:

Un factor de importancia es el diluyente empleado, ya que no debe resultar tóxico para ninguno de los microorganismos presentes.

El diluyente de uso general contiene 0,1 % de peptona en agua destilada o solución fisiológica (8,5 g de NaCl por litro de agua destilada). Tanto la composición del diluyente, como el tiempo de exposición deben estar estandarizados para obtener reproductibilidad de resultados.

Pasos a seguir:

- Una vez preparado el material a analizar, mezclar por agitación.
- Pipetear 10 veces con pipeta o jeringa estéril, para homogeneizar la suspensión, evitando formación de espuma.
- Transferir con la misma pipeta 1 ml a un tubo de dilución que contiene 9 ml de diluyente y mezclar.
- Repetir estos pasos hasta obtener el número necesario de diluciones. La concentración disminuye 10 veces en cada dilución sucesiva. Obteniendo las siguientes diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , etc. (ver esquema 1).

NOTA: Usar pipetas diferentes hasta la última dilución 10^{-5} para evitar errores por arrastre de microorganismos de la muestra.

2. Siembra:

Método de recuento en placa de siembra por diseminación en superficie recuento de aerobios totales o de algún otro microorganismo que seleccionemos que el medio de cultivo:

Objetivo:

Se prefiere utilizar este método cuando se trata de analizar muestras en las que se quiere observar la diversidad de colonias que presentan. Al desarrollar todas las colonias en la superficie, su aspecto puede ser estudiado con mayor facilidad y se puede estimar la proporción de los distintos tipos de colonias. Además, los microorganismos sensibles al calor no son inactivados, al no ponerse en contacto con el agar fundido.

El inconveniente de este método es debido al pequeño volumen utilizado, no da resultados totalmente satisfactorios en muestras que contienen pocos microorganismos.

Técnica: (ver Esquema 1):

1. Toma y preparación de muestras:

Seguir instrucciones del método anterior.

2. Diluciones:

Seguir instrucciones del método anterior.

3. Siembra:

→ Preparar placas de petri con 20 ml de medio para recuento en placa.

→ Dejar solidificar y secar las placas en posición invertida y abiertas, a 37°C durante 30' a 1 hora. Si las placas se preparan con anterioridad guardar en la heladera.

→ Tomar alícuotas de 0,1 ml. de las diluciones a sembrar. Las siembras deben hacerse por duplicado o triplicado.

→ Comenzar la inoculación desde la dilución mayor hasta llegar a la más concentrada, utilizando la misma pipeta que se llenara y vaciará entre 3 y 5 veces, para homogeneizar bien la dilución.

→ Depositarlas en la superficie del agar.

→ Sembrar tres diluciones como mínimo.

→ Extender las alícuotas sobre la superficie del medio, rápidamente, utilizando varillas de vidrio en forma de bastón de hockey (espátula de Drigalsky), esterilizada previamente con alcohol y calor directo.

4. Incubación:

Incubar las placas 24-48 hs. a 35-37°C.

5. Cálculo de recuento:

→ Calcular el número de gérmenes siguiendo las indicaciones del método A.

→ Tener en cuenta el factor de dilución a sembrar (0,1 ml en lugar de 1 ml), por lo que además de multiplicar por la dilución, se multiplica también por 10.

En medio líquido: Determinación del Número mas probable (NMP) de microorganismos por ml, g / o 100 ml. (Medio líquido)

Este método se utiliza cuando la muestra presenta **baja carga bacteriana**. Permite detectar hasta 1100 microorganismos por g, ml ó 100 ml, según si se trata de muestras sólidas o líquidas. Es la técnica que se utiliza para la determinación de coliformes totales y de *Enterococcus*.

Técnica: (Ver esquema 2)

1. Inoculación:

En este práctico se utilizará caldo nutritivo, distribuido en 9 ml. en tubos de ensayo.

Se inocula 1 ml de cada una de las diluciones de la muestra en los tubos de ensayo, utilizando tres tubos por dilución.

2. Incubación:

Se incuba 24-48 hs. a 35-37°C en baño termostatzado.

3. Lectura:

Los tubos con crecimiento se observan como turbidez visible del medio de cultivo.

4. Cálculo:

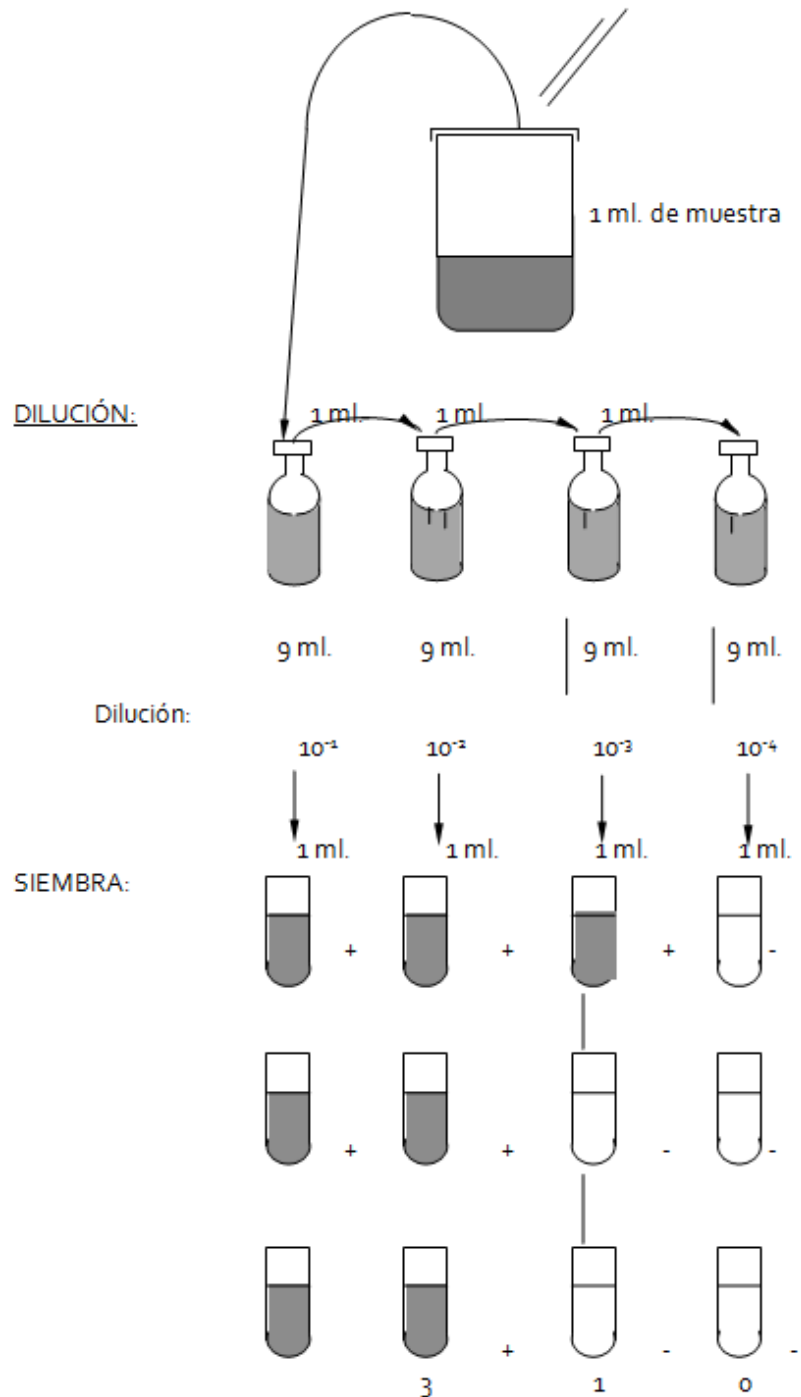
Para determinar el N.M.P., considerar la dilución más alta en la que los tres tubos presentaron crecimiento y las dos diluciones superiores más próximas. Con ese número obtenido ir a la tabla para determinar el N.M.P.

Ejemplo:	Dilución	Nº de tubos positivos
	1: 100	3
	1: 1.000	1
	1:10.000	0

Estos resultados corresponden en la tabla de N.M.P. a 400 microorganismos por gramo o por ml.

Para calcular el NMP de diluciones mayores que las que figuran en la Tabla (10-1, 10-2 y 10-3), **multiplicar el NMP por el factor adecuado**: 10, 100, 1000, etc. Por ejemplo, si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones 10-2, 10-3 y 10-4, multiplicar por 10; si las diluciones son 10-3, 10-4 y 10-5, multiplicar por 100.

ESQUEMA 2: TÉCNICA PARA RECuento DE NÚMERO MAS PROBABLE DE MICROORGANISMOS



RESULTADO:
 Nº de tubos (+) en cada dilución.
 Cálculo del NMP: 310 en tabla $40 \times 10 = 400$ microog/ml. ó microorq/g.

TABLA 1: Número más probable (NMP) de bacterias en alimentos, (tres tubos por cada dilución):

Nº de tubos positivos en cada dilución							
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución. 10 ⁻³	NMP por gramo	Límites de confianza			
				99%		95%	
0	1	0	3	<1	23	<1	17
1	0	0	4	<1	28	1	21
1	0	1	7	1	35	2	27
1	1	0	7	1	36	2	28
1	2	0	11	2	44	4	35
2	0	0	9	1	50	1	38
2	0	1	14	3	62	5	48
2	1	0	15	3	65	5	50
2	1	1	20	5	77	8	61
2	2	0	21	5	80	8	63
3	0	0	23	4	177	7	129
3	0	1	40	10	230	10	180
3	1	0	40	10	290	20	210
3	1	1	70	20	370	20	280
3	2	0	90	20	520	30	390
3	2	1	150	30	660	50	510
3	2	2	210	50	820	80	640
3	3	0	200	<100	1900	100	1400
3	3	1	500	100	3200	200	2400
3	3	2	1100	200	6400	300	4800

Calculada a partir de los datos de MAN (1975).

De cada dilución se inoculan tres tubos de medio, cada uno con 1 ml.

Conteo por filtros de Membrana:

Se basa en el uso de filtros de membrana. Estos filtros tienen porosidad uniforme para detener los microorganismos.

Técnica:

1. Un disco filtrante estéril se pone en la unidad de filtración.
2. Se hace pasar un volumen de líquido por el disco filtrante mediante la ayuda de la bomba de vacío y luego se coloca sobre una almohadilla absorbente, saturada con un medio de cultivo apropiado.
3. Se acomoda sobre una caja de Petri.
4. Se incuba a temperatura y tiempo apropiado.
5. Luego de la incubación se desarrollaran las colonias sobre el disco filtrante.

Aplicaciones:

Se puede examinar grandes volúmenes de agua o aire.

La membrana se puede pasar de un medio a otro con el propósito de seleccionar y diferenciar microorganismos.

Se obtienen más rápido los resultados.

Bacterias que se buscan por ser marcadoras de contaminación antrópica

Presencia-Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*: las *Pseudomonas* son bacterias muy comunes en napas freáticas debido a su versatilidad respecto a las fuentes de carbono que pueden utilizar y a sus bajos requerimientos nutricionales. Se trata de bacilos que producen pigmentos y no forman esporas. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista por excelencia y es el agente etiológico de varios procesos infecciosos. Por su relativa resistencia al cloro es considerado un indicador de la eficiencia de los procesos de cloración. Su presencia en sistemas de almacenamiento, tanque y cisternas, responde a un estado deficiente de limpieza de dichas instalaciones. Para verificar su presencia se realiza siembra por estriado en dos medios de cultivo diferenciales. En cada uno de estos medios de cultivo las colonias presuntivas deben expresar dos tipos de pigmentos (fluoresceína y piocianina). Luego, si la expresión de ambos pigmentos es positiva, se debe realizar confirmación de las colonias presuntivas mediante la realización de pruebas bioquímicas.

Presencia-ausencia de *Escherichia coli*: esta bacteria, habitante normal del intestino humano, es utilizada como indicador de contaminación fecal de aguas. Las cepas patógenas de *E. coli* causan infecciones del tracto intestinal (generalmente agudas y no presentan mayores complicaciones, excepto en niños y adultos con deficiencias nutricionales). Sin embargo, es importante destacar que algunas cepas de *E. coli* tienen poder patogénico y causan enfermedades muy importantes como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). La presencia de colonias sospechosas de *E. coli* se determina en medio sólido EMB- Levine, siendo las colonias presuntivas de *E. coli* de color negro con brillo verde metalizado. La confirmación se realiza a través de pruebas bioquímicas. Los tubos positivos para coliformes tantes se siembren en EMB y se identifican las colonias que presentan verde brillantes