

MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA POBLACION BACTERIANA

MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA POBLACION BACTERIANA	1
OBJETIVOS:	1
MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA POBLACION BACTERIANA	2
TECNICAS DE ENUMERACION DE BACTERIAS:	¡Error! Marcador no definido.
2.1. INTRODUCCION:	2
MÉTODOS Y MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA POBLACION BACTERIANA:	2
Observaciones:	2
A) RECUENTOS CELULARES DIRECTOS:	3
A.1. En cámaras al microscopio:	3
A.2. Por epifluorescencia:	3
APARATOS:	¡Error! Marcador no definido.
A.3. En contadores electrónicos de partículas:	3
B) RECUENTO DE BACTERIAS VIABLES:	4
Recuento de bacterias aerobias mesófilas:	4
ESQUEMA 1:	8
TECNICA PARA RECUENTO DE U.F.C. EN PLACA	8
ESQUEMA 2: TECNICA PARA RECUENTO DE NUMERO MAS PROBABLE DE MICROORGANISMOS	12
TABLA 1: NUmero mas probable (NMP) de bacterias en alimentos, (tres tubos por cada diluciOn):	13
C) MEDIDAS PARA DETERMINAR MASA CELULAR:	14

OBJETIVOS:

Conocimiento de los fundamentos de recuentos celulares directos, de bacterias viables y determinación de masa celular.

Manejo práctico de las técnicas de:

- Recuento en placa por diseminación en superficie y por volcado.
- Recuento por determinación del número más probable (NMP).

Medidas cuantitativas de la población bacteriana

Para conocer el estado bacteriológico de un material 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.

Con los recuentos de microorganismos por métodos biológicos determinamos la población microbiana viable y cultivable. La viabilidad en microbiología se define como la capacidad del microorganismo para multiplicarse en medio sólido formando una colonia. Lo verificamos, por medio de la observación de colonias en medios sólidos o por el desarrollo bacteriano en medios líquidos. Para esto, por la carga bacteriana que poseen las muestras, se realizan diluciones para poder contarlos, las mismas deben hacerse de una forma estandarizada. La enumeración en medios sólidos se funda en que cada Bacteria desarrollara en una colonia, pero debemos tener en cuenta que las bacterias que se hallan en crecimiento no siempre se encuentran aisladas, por ello, una colonia puede provenir de una o más bacterias, en base a este criterio, los recuentos en medios sólidos las expresamos como UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS POR MILILITRO O GRAMA según corresponda.

Las bacterias se distribuyen muy irregularmente en el ambiente natural, especialmente en las interfases sólido-líquido y el líquido si este mantiene un flujo. La adhesión bacteriana y la formación de biopelículas y microcolonias en superficies bañadas por líquidos con componentes que pueden nutrir las, tiene una importancia muy grande, por el grado de biodeterioro que producen.

Existen diferentes métodos para realizar el recuento de las bacterias, ellos son:

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.

Masa celular (físico)

- Directa: por pesada.
- Indirecta:
 - contenido de nitrógeno (químico).
 - por turbidimetría.
 - contenido de fosfolípidos.

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 diferentes condiciones ambientales, se podrán determinar un número mayor de géneros bacterianos en una muestra.

La masa celular, 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.

Recuento 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.

Recuento 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:

I. Toma y preparación de la muestra:

- Las muestras pueden comprender:
- a) Superficies.
 - b) Sólidos.
 - c) Líquidos.

d) Aire o gases.

- Superficies:
 - Los muestreos pueden realizarse por:
 - Hisopos en caso de superficies pequeñas.
 - Esponjas en caso de superficies mayores.
 - Placas rodak.

• Hisopados:

Se utilizan hisopos de algodón o alginato, previamente estériles y embebidos en solución fisiológica estéril y escurridos. Se hisopa una superficie de 100 cm². Los hisopos se sumergen en solución fisiológica estéril (10 ml.). Se realizan luego diluciones al décimo.

Espanjados:

Se utilizan esponjas de poliuretano de (13 cm. x 7,5 cm. x 4 cm.) esterilizadas y bolsas de plástico que se invierten a modo de guante sobre la mano del operador, haciendo que la parte interna pase a ser externa, se toma la esponja y se frota la superficie a estudiar. Luego del muestreo, se vuelve la bolsa a su posición original, quedando la esponja en el interior y se anuda la bolsa. Se agrega a la bolsa una cantidad conocida de diluyente (100 ml.) y a partir de allí se realizan las diluciones.

• Muestras sólidas:

Se requiere un tratamiento previo de la muestra para liberar a un medio fluido los microorganismos aprisionados en el interior de la muestra.

Para alimentos, por ejemplo, se utilizan aparatos eléctricos de trituración y mezcla, provisto de cuchillos cortantes (homogeneizadores). Trabajando con una cantidad de muestra conocida, se prepara una suspensión homogénea que permite realizar posteriormente diluciones.

Es importante controlar la velocidad del homogeneizador para que no destruya las células microbianas y el tiempo debe ser suficiente para liberar las bacterias y conseguir una distribución uniforme, generalmente se realiza durante 2 min.

La homogeneización se realiza con un volumen de solución diluyente estéril equivalente a 9 veces la muestra, de modo que se obtiene una dilución 1 en 10.

• Muestras líquidas:

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

- Grifo:

Limpiar 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.

- Aguas superficiales:

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

2. 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.

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.

3. Siembra:

Pipetear por duplicado en placas de Petri, alícuotas de 1 ml. de cada una de las diluciones. En los casos que se desconoce el número aproximado de gérmenes presentes, se aconseja sembrar toda la serie de diluciones. Si no, es conveniente sembrar tres diluciones distintas en función a la cifra de microorganismos esperada.

Agregar 15 ml de medio fundido y templado a 44° - 46°. Es importante controlar la temperatura del medio, para evitar la inactivación de bacterias.

Mezclar el inóculo con el medio fundido por movimientos de rotación y vaivén en distintas direcciones.

No dejar pasar más de 15 minutos desde que se efectúa la dilución hasta que se siembra.

4. Incubación:

Dejar solidificar el agar y secar las placas en posición invertida y abiertas en una estufa a 37°C durante 30 min.

Incubar a 35 - 37°C durante 24 - 48 hs.

5. Cálculo de recuento:

Elegir dos placas correspondientes a una dilución que presente entre 30 y 300 colonias.

Contar todas las colonias de cada placa. Se puede utilizar un contador de colonias con un dispositivo de luz y una lupa que aumente 2-3 veces el diámetro de la colonia.

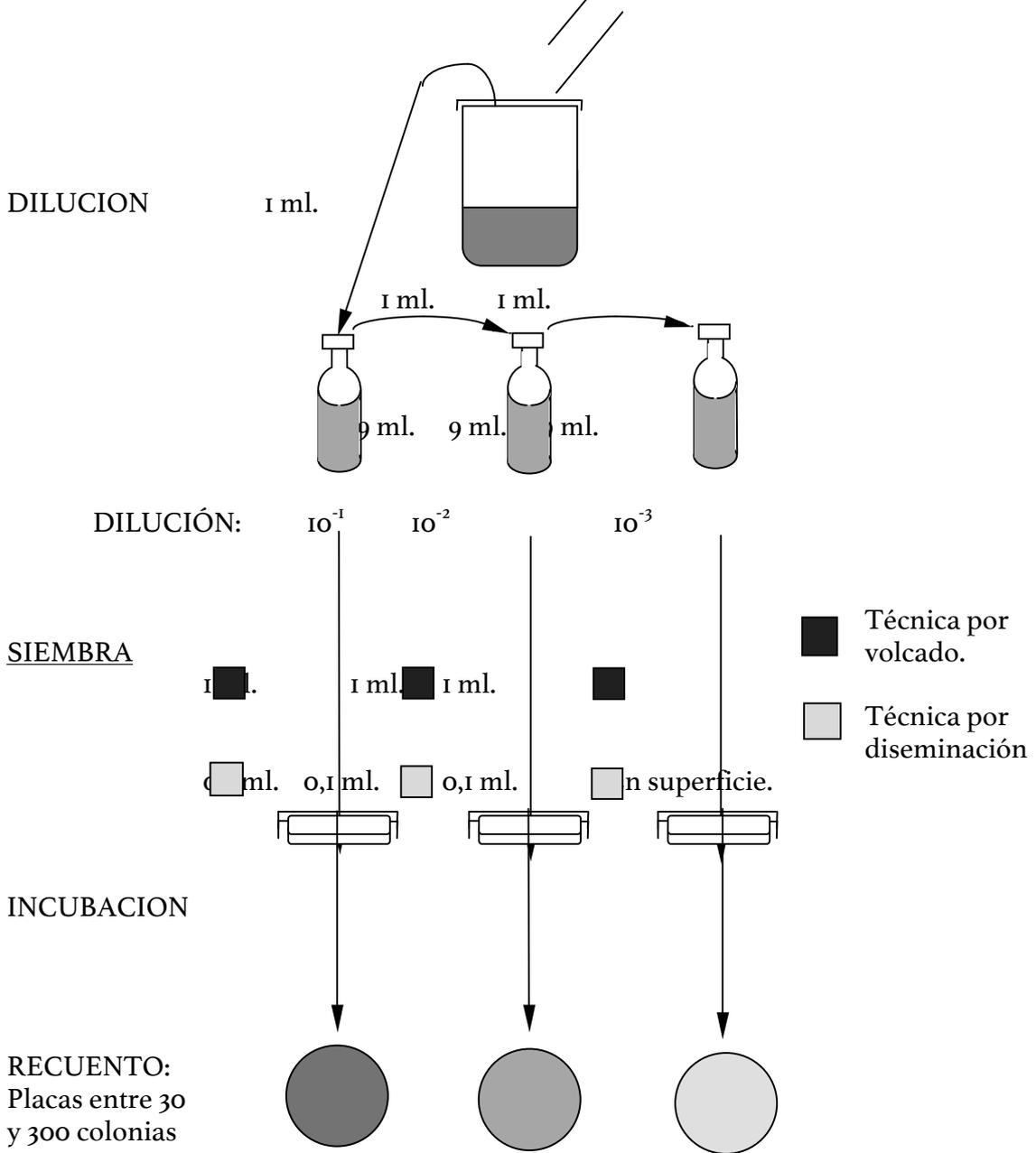
Hallar la media aritmética de los dos valores y multiplicar por el factor de dilución, que es la inversa de la dilución de las placas seleccionadas. Por ej.: si la placa seleccionada es 10^{-2} multiplicar por 100, 10^{-3} multiplicar por 1000, etc.

Informar los valores como U.F.C. por unidad de peso, unidad de volumen o unidad de superficie, según corresponda (ver esquema 1):

- u.f.c./g.
- u.f.c./ml.
- u.f.c./cm².

ESQUEMA I:

TECNICA PARA RECUESTO DE U.F.C. EN PLACA



CALCULO DE LA CUENTA:

Recuento por siembra por volcado (B.1.1.)

□ Recuento por disseminación en superficie (B.1.2.)

■ Número U.F.C. por inversa de la dilución = UFC/ml, UFC/g ó UFC/cm².

□ Número U.F.C. por inversa de la dilución x 10 = UFC/ml, UFC/g ó UFC/cm².

Método de recuento en placa de siembra por diseminación en superficie:

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. Calculo 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.

B.2. En medio líquido: Determinación del número más probable (N.M.P.) de microorganismos por ml, g/ ó 100 ml:

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.

Técnica:

(Ver esquema 2)

- 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.

- Incubación:

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

- Lectura:

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

- Cálculo:

Para determinar el N.M.P., considerar la dilución más alta en la que al menos un tubo presentaron crecimiento y las dos diluciones anteriores 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.

e) Número estimado de bacterias:

Determinación del número más probable:

Utilizando 2 series de 8 frascos cada una, se siguen los mismos pasos c y d del método anterior. Se determina el número característico con el cual entramos en la tabla. Para determinar el número más probable, buscamos las tres últimas cifras significativas (*).

Ejemplo Nº 1:

Frasco N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilución Sembrada		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Serie A	+	+	+	+	+	-	-	-
Serie B	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	2	2 (*)	1 (*)	1 (*)	0	0	0

Nº Característico: 2 - 1 - 1.

Nº más Probable: 13 x 10² = 1300

El Nº característico 211, corresponde en Tabla Nº 1 al NMP 13 BSR pero la dilución del primer número es de 10e (-2), por lo tanto para la dilución 0,01 el NMP será 13 x 1/10e (-2) = 1300.

Ejemplo Nº 2:

Frasco N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilución sembrada	0	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Serie A	+	+	+	+	+	-	-	-
Serie B	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	2	1	1	1			

Nº característico: 111.

Nº más probable: 2,0.

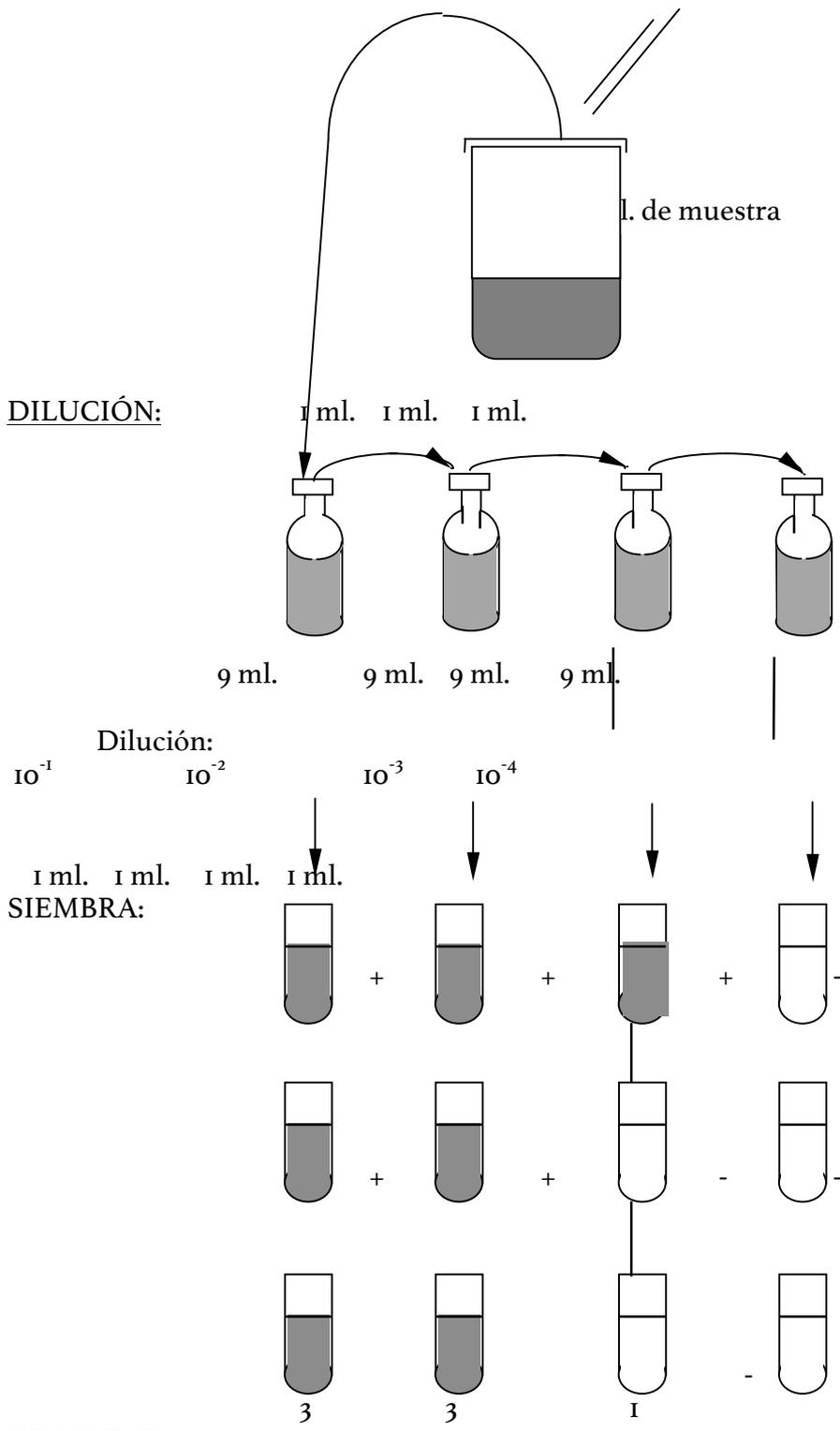
Dilución: 10⁻².NMP: 200 Bac/ml.

Con el número característico se entra en las tablas y se obtiene el número más probable, que debe corregirse según la dilución que corresponda al primer frasco considerado para obtener el número característico.

Tabla de Mac Creedy para determinación del número más probable de bacterias con dos series de diluciones:

Número Característico	Número probable de bacterias	Número característico	Número probable de bacterias
000	0,0	121	3,0
001	0,5	200	2,5
010	0,5	201	5,0
011	0,9	210	6,0
020	0,9	211	13,0
100	0,6	212	20,0
101	1,2	220	25,0
110	1,3	221	70,0
111	2,0	222	110,0
120	2,0		

ESQUEMA 2: TECNICA PARA RECuento DE NUMERO MAS PROBABLE DE MICROORGANISMOS



RESULTADO:
 N° de tubos (+) en cada dilución.
 Cálculo del NMP: 331 en tabla 500 microog/ml. ó microorg/g.

TABLA I: NUmero mas probable (NMP) de bacterias en alimentos, (tres tubos por cada diluciOn):

Nº de tubos positivos en cada dilución							
Diluc. 10^{-1}	Diluc. 10^{-2}	Diluc. 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.

B.3. 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.

MEDIDAS PARA DETERMINAR MASA CELULAR:

Directo por pesada:

Es aplicable a determinados gérmenes, aquellos en que las suspensiones sean muy uniformes. Se utiliza balanza de precisión y frascos estériles con tapa. Se coloca en estos una cantidad de suspensión de un cultivo sólido en el que el tiempo de incubación sea siempre el mismo para todas las determinaciones. Se pesa y se refiere luego a un volumen determinado.

Por contenido de nitrógeno:

Se mide la población bacteriana en términos de nitrógeno bacteriano, considerando que las bacterias tienen un promedio de 14% de nitrógeno en materia seca.

Luego del cultivo, se deben lavar las células para liberarlas del medio de cultivo y luego se practica un análisis químico cuantitativo para determinar el nitrógeno.

Como desventaja presenta la laboriosidad del método y su aplicación es sólo a poblaciones muy concentradas.

Determinación de la densidad celular por Turbidimetría:

Es un método práctico y muy usado, pero tiene el inconveniente que se mide gérmenes vivos y muertos y que presenta errores. Está basado en que las suspensiones bacterianas producen una turbidez proporcional al número de bacterias, dicha turbidez se compara con patrones (Ej. patrón de Mc. Farland).

La turbidez también se puede medir por fotolorimetría, siendo la densidad óptica del cultivo proporcional a la densidad celular.