

Medición del crecimiento Microbiano

- Determinación del número de microorganismos en una muestra.
- Determinación de la actividad metabólica, biomasa y proteínas.

Métodos para el conteo de microorganismos viables

- Cuenta en placa
 - Vaciado en placa
 - Extendido en placa
 - Asa calibrada
 - Miles y Mirsa
 - Filtración
- Número más probable (NMP)

Métodos para el conteo de microorganismos totales

- Recuento microscópico
 - Cuenta de Breed
 - Cámara de Neubauer
 - Cámara de Prettot Hausser
- Turbidimetría

Métodos para el conteo de microorganismos viables

- Estos métodos se basan en poner en evidencia la presencia de los microorganismos vivos.
- Requieren al menos 24 horas para el cultivo y la interpretación de resultados.
- Se emplean medios de cultivo generales, enriquecidos selectivos y diferenciales dependiendo de los microorganismos a cuantificar.

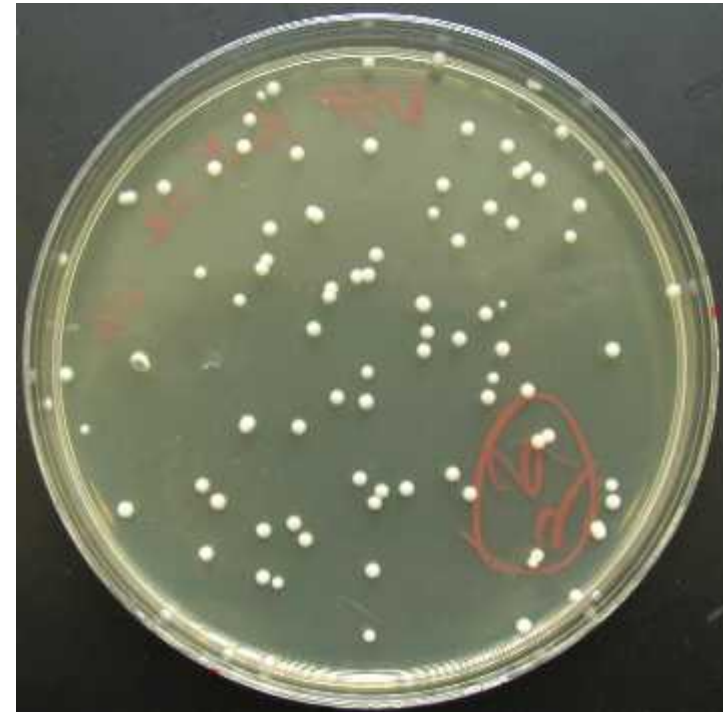


Cuenta en placa

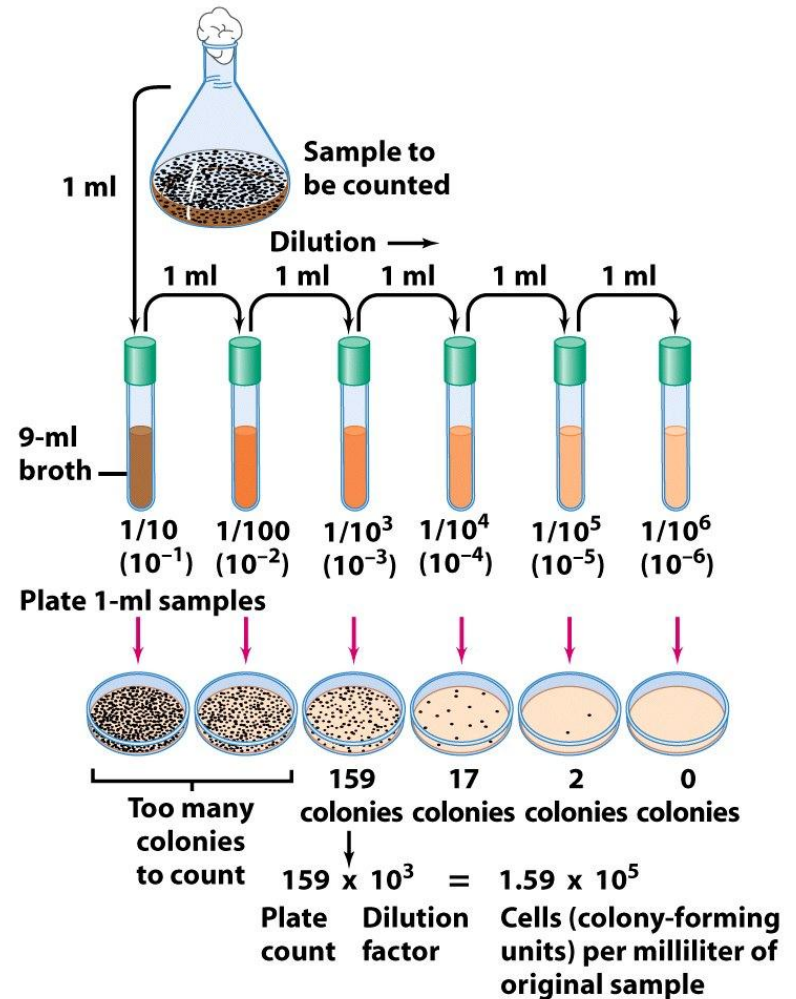
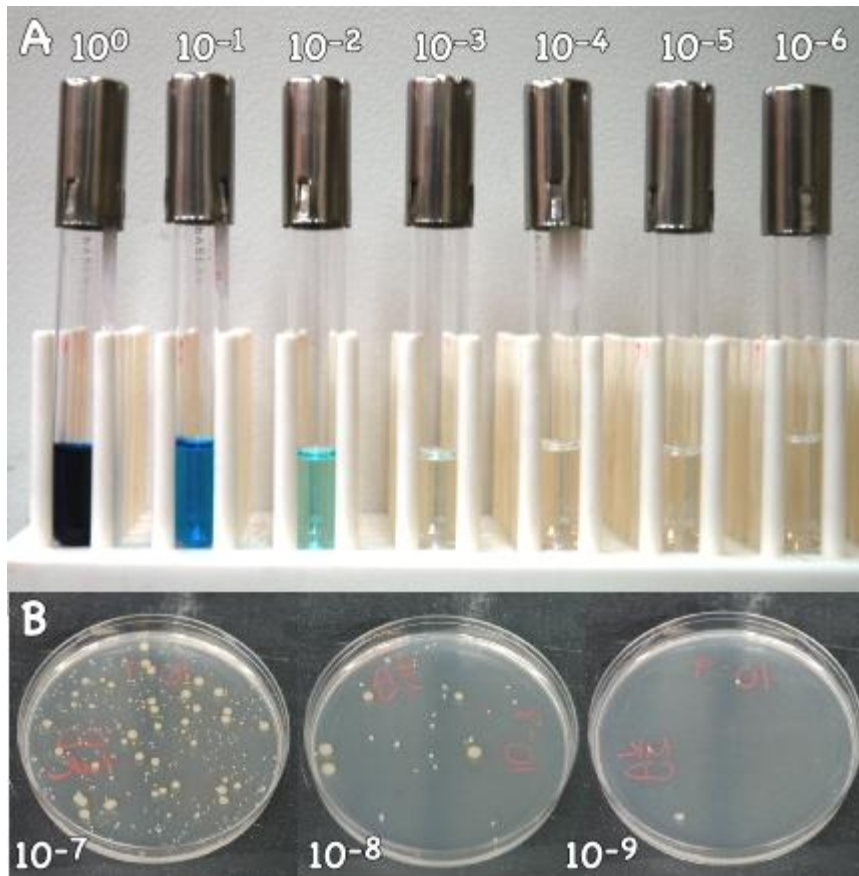
Se determina el número de microorganismos en una muestra en relación a las colonias que forman, las UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Se emplean soluciones diluidas o diluciones de una muestra concentrada para que cada colonia formada provenga de un solo microorganismo aunque algunas agrupaciones no pueden ser separadas por las diluciones. Se utilizan principalmente para la cuantificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

Se reporta como:

- UFC ****/unidad de volumen o peso

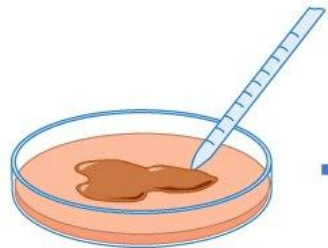


Diluciones y cuenta en placa

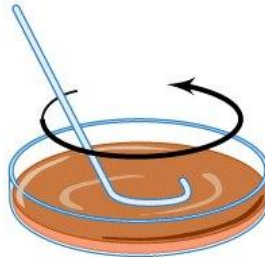


Vaciado en placa y extendido en placa

Spread-plate method

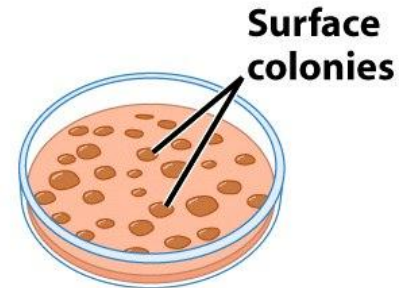
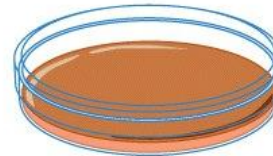


Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)



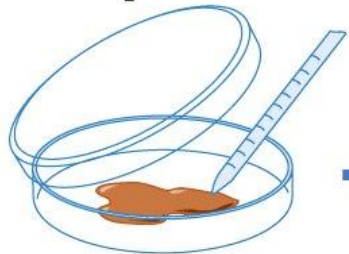
Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader

Incubation

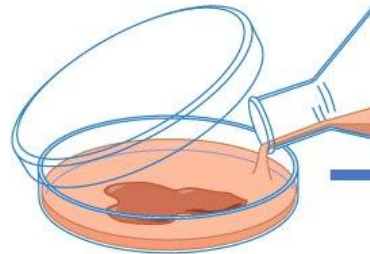


Typical spread-plate results

Pour-plate method

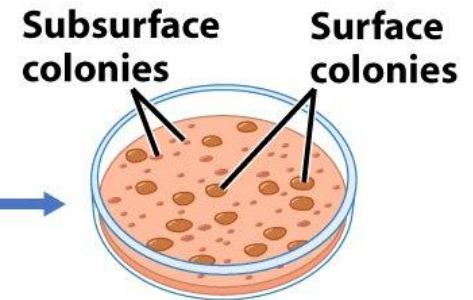
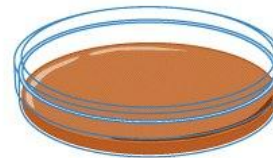


Sample is pipetted into sterile plate



Sterile medium is added and mixed well with inoculum

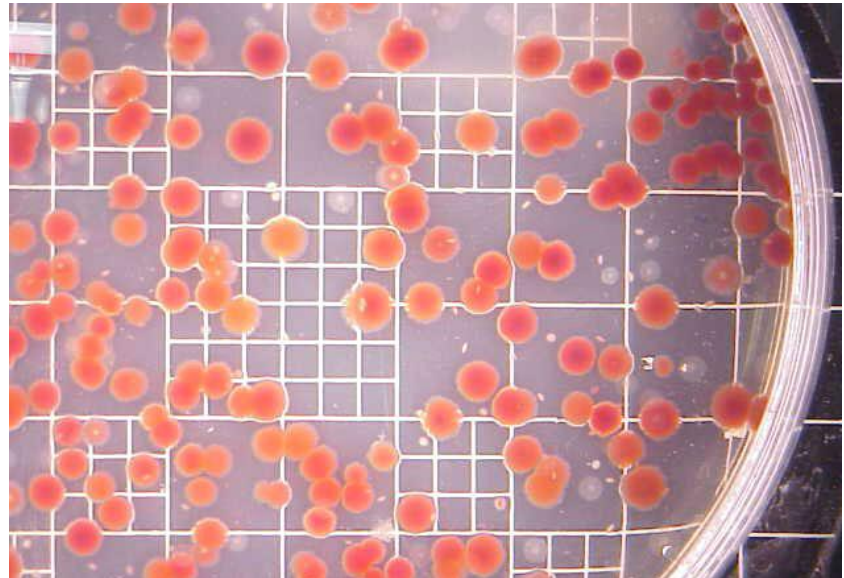
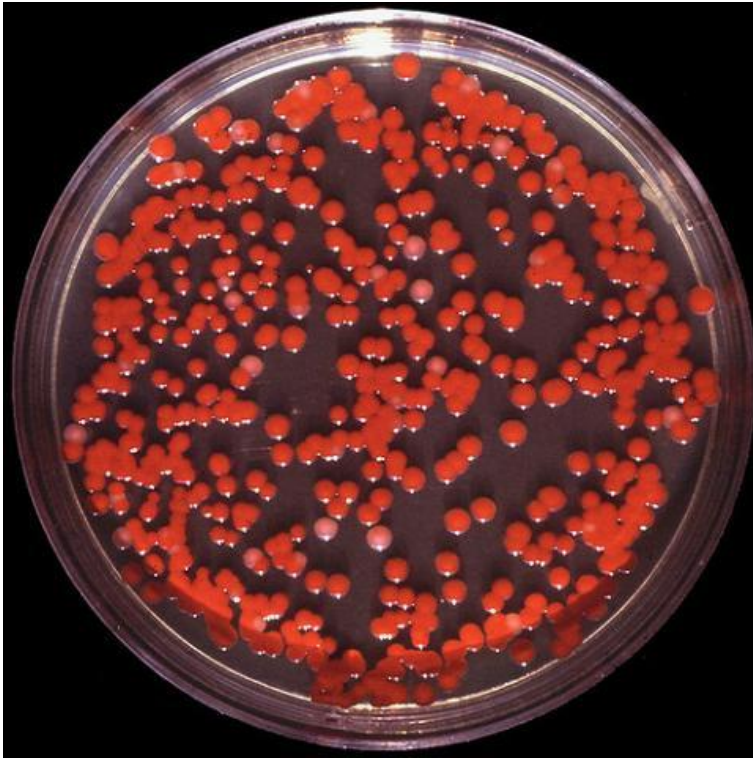
Incubation



Typical pour-plate results

Cuenta de colonias

Criterio: 25 a 250 UFC por placa

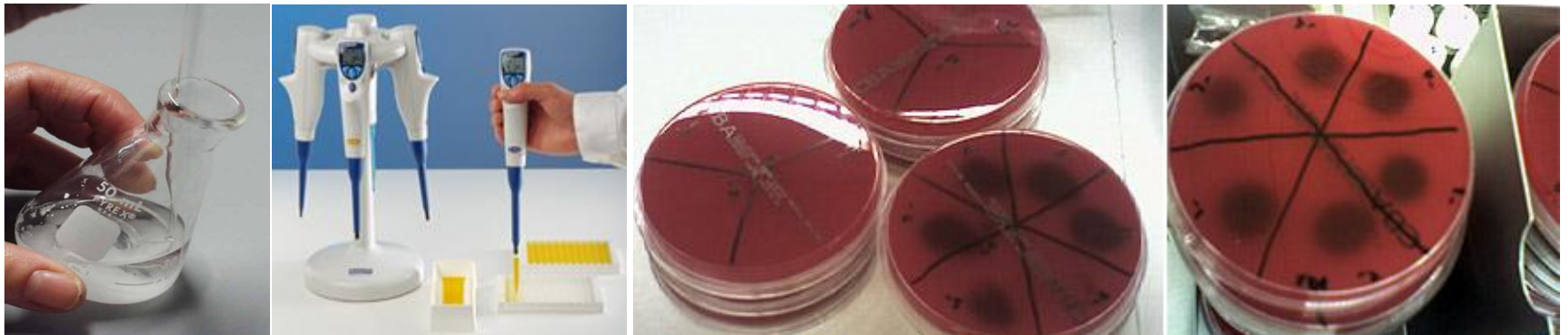


Pueden emplearse medios selectivos y diferenciales

Miles y Misra

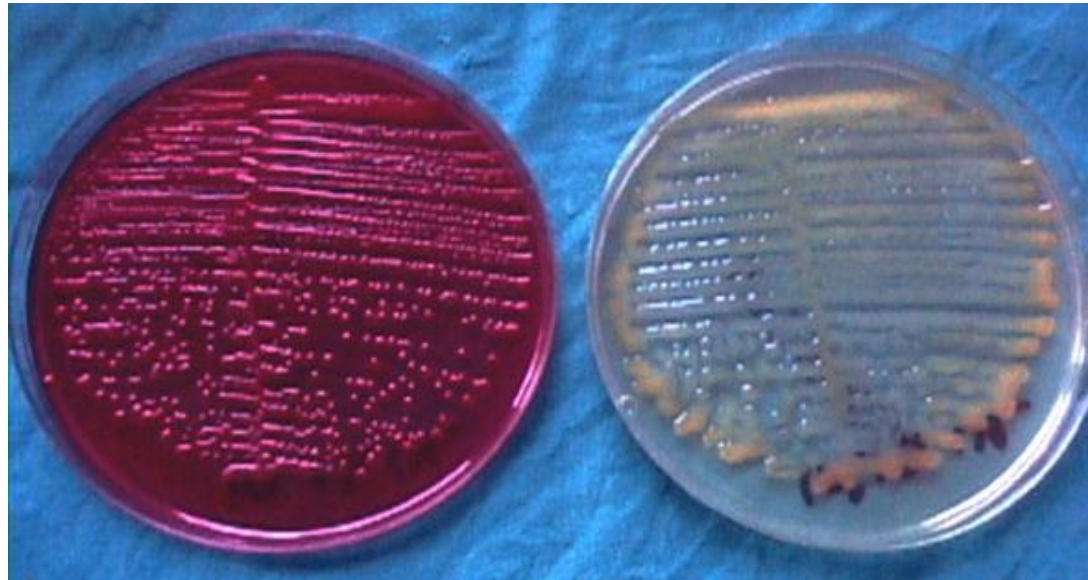
Involucra la preparación de diluciones seriadas de una suspensión bacteriana. Las placas son divididas en sectores separados. Se inocula cada sector una gota empleando una Pipeta Pasteur calibrada o bien micropipetas inoculando 0.02mL.

Las placas se incuban de 18 a 24 horas a la temperatura adecuada (37°C). Se toman en cuenta los sectores donde hay menos de 20 UFC. El número de bacterias viables se obtiene calculando la media de cada dilución en las repeticiones realizadas.

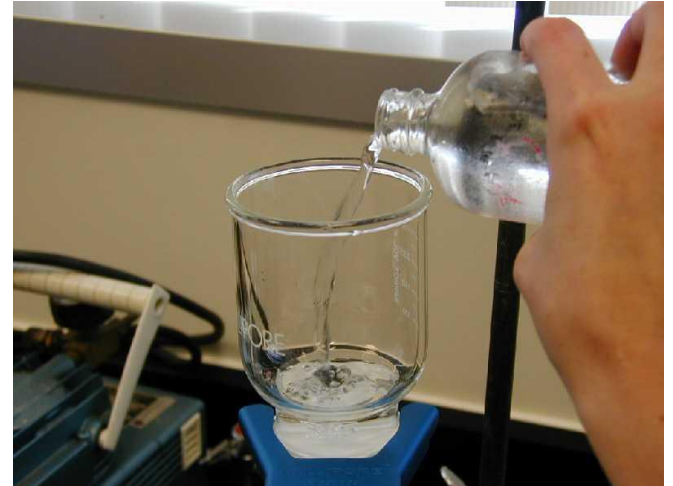


Asa calibrada

La utilización de agujas o asas calibradas permite tomar volúmenes pequeños, que son inoculados en la superficie del agar mediante la técnica de siembra masiva. Las colonias son contadas y se multiplican por el factor de dilución del asa empleada. El uso más frecuente de este método es en el urocultivo. Se determinan las UFC/g o mL de muestra.



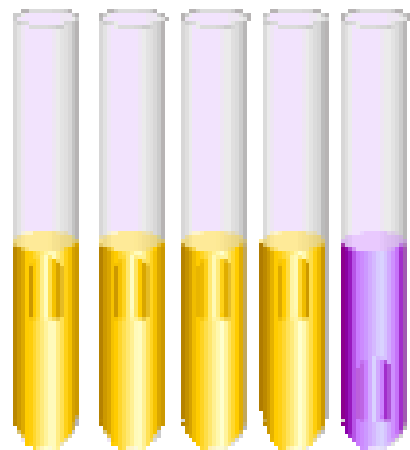
Filtración



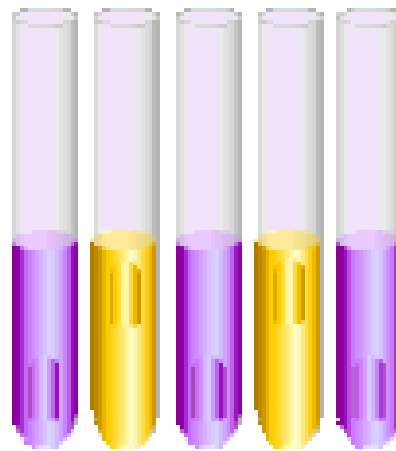
La membrana de celulosa retiene a los microorganismos en su malla con poros de $0.25\text{-}0.45\mu\text{m}$. Esta membrana se transfiere a un medio de cultivo para el desarrollo de colonias.

Número Más Probable (NMP)

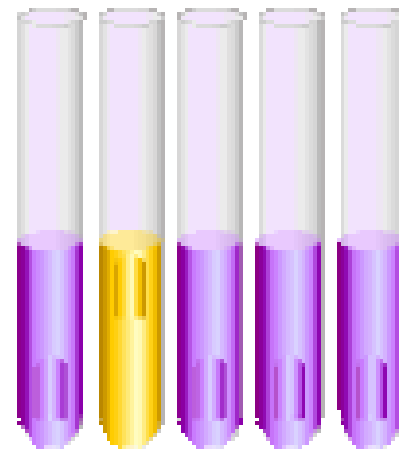
También llamada técnica de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.



**Double Strength
10 mL**



**BCPL
1 mL**



**BCPL
0.1 mL**

Número Más Probable (NMP)

CUADRO 3.- Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP.

	Número de tubos positivos obtenidos de tres							NMP			
E	tubos incubados, para las siguientes cantidades										
J	de muestra inoculada por tubo										
E	Producto										
M	líquido	(ml)	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	Producto	Otros		
P											
L	Otros										
O	productos	(g)	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	líquido	productos		
mayor dilución = menor concentración											
								ml ⁻¹	g ⁻¹		
1			3	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	15 (5)	150	(6)	
2			3	<u>3</u>	<u>3</u>	0		24 (5)	240	(6)	
3			2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	7 (6)	70	(7)	
4			<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2,4 (4)	24	(5)	
5			<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	0,21 (4)	2,1	(5)	

10-19-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

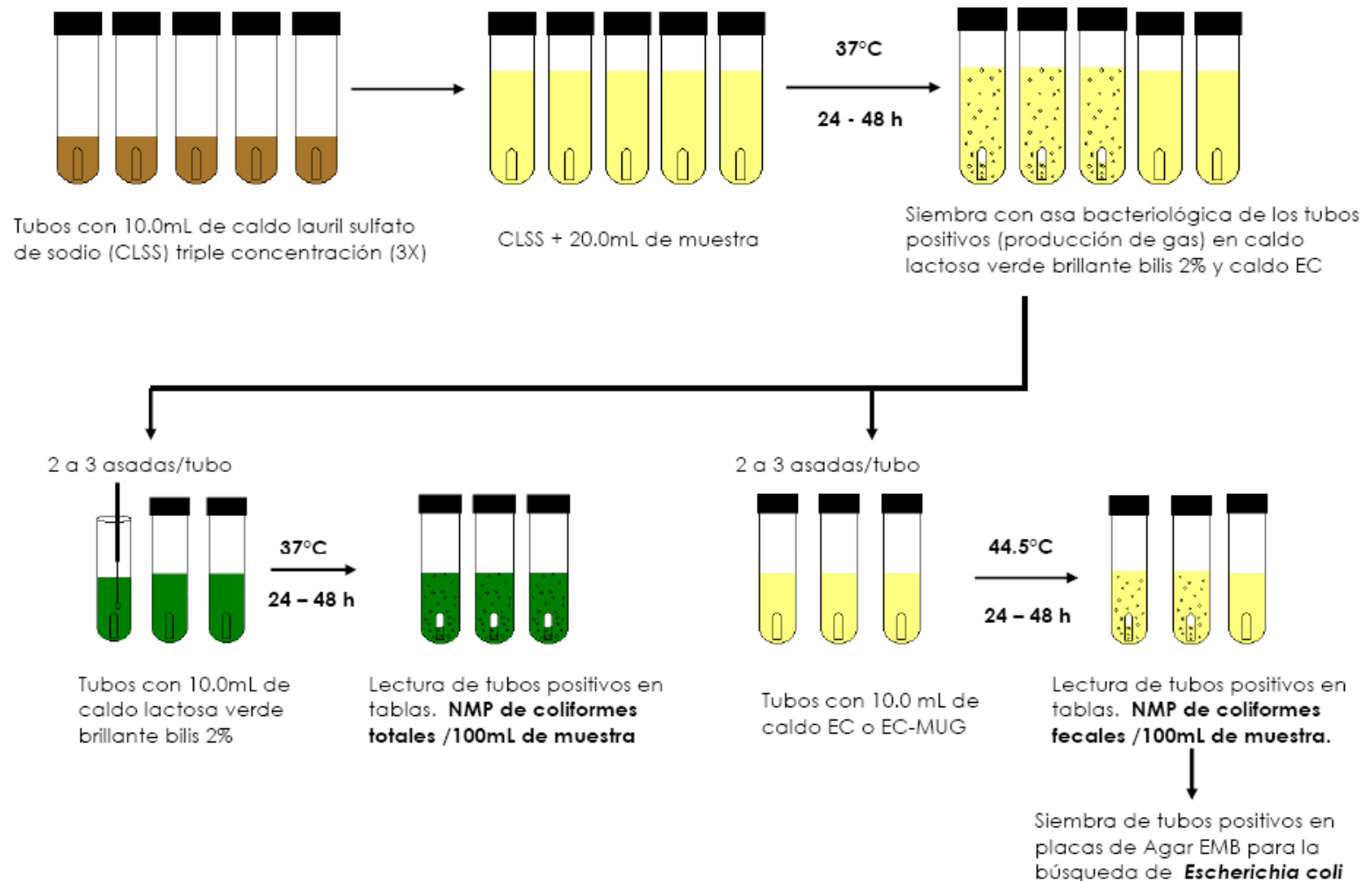
Cochran, W. C. (1950). Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number" Biometrics 6, 105-116.

Tablas de Cochran (1950)

Pos. tubos			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubos			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

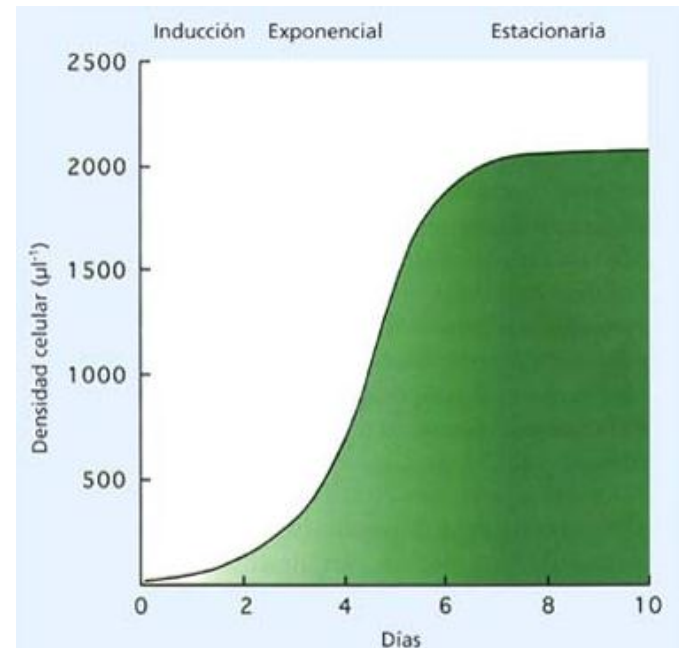
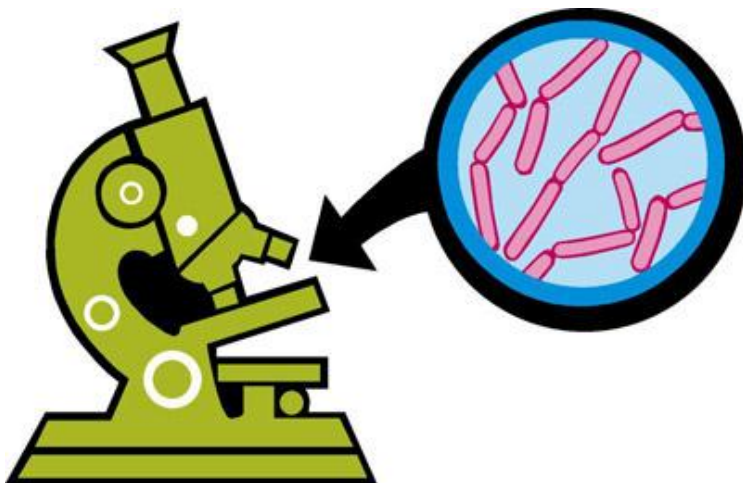
Análisis Microbiológico del Agua

b) Determinación del NMP de coliformes en agua y hielo potables (esquema general)

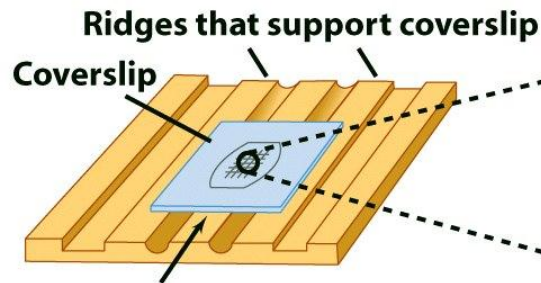


Métodos para el conteo de microorganismos totales

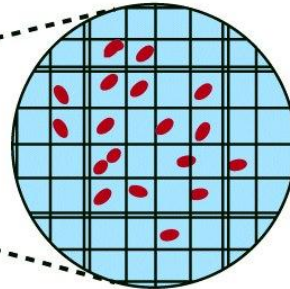
- Estos métodos se basan en poner en evidencia la presencia de los microorganismos vivos y muertos los cuales no se pueden distinguir.
- Son rápidos pero se requiere contar en algunos casos con curvas de calibración.



Recuento microscópico

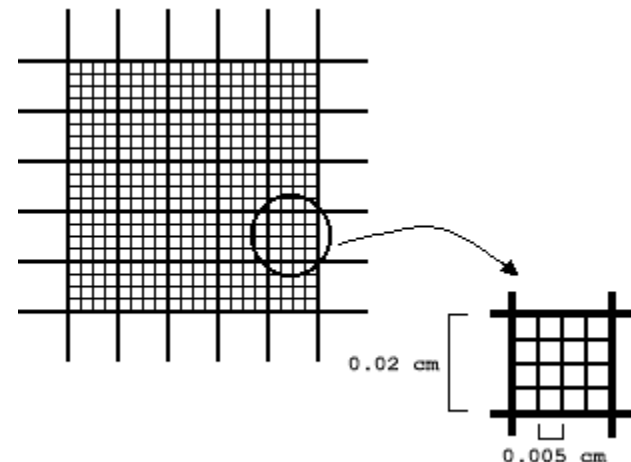
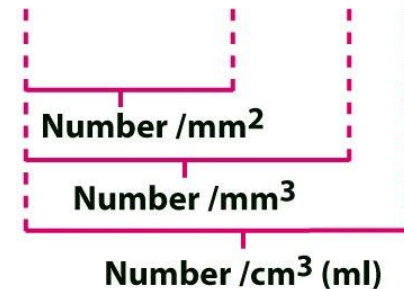


Sample added here; care must be taken not to allow overflow; space between coverslip and slide is 0.02 mm ($\frac{1}{50} \text{ mm}$). Whole grid has 25 large squares, a total area of 1 mm^2 and a total volume of 0.02 mm^3 .



Microscopic observation; all cells are counted in large square: 12 cells (in practice, several squares are counted and the numbers averaged.)

To calculate number per milliliter of sample:
 $12 \text{ cells} \times 25 \text{ large squares}$
 $\times 50 \times 10^3 = 1.5 \times 10^7$



Cámaras de Petroff-Hausser y de Neubauer



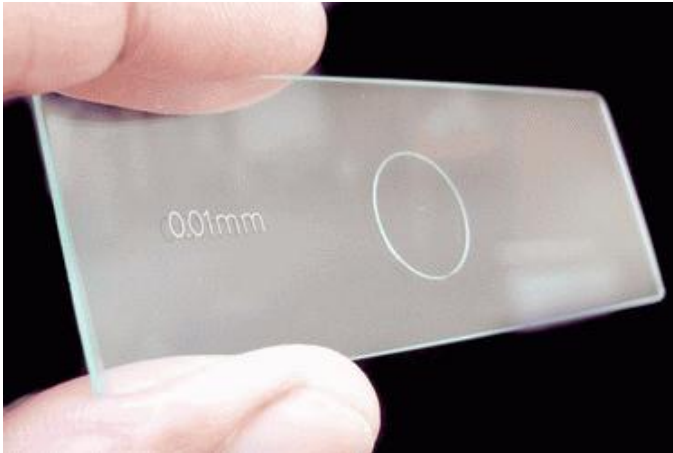
Limitaciones:

- Es muy tedioso, no es práctico para un gran número de muestras.
- No es muy sensible, se necesitan al menos 10^6 bacterias/mL para que sean observadas al microscopio.
- No distinguen células vivas de muertas.



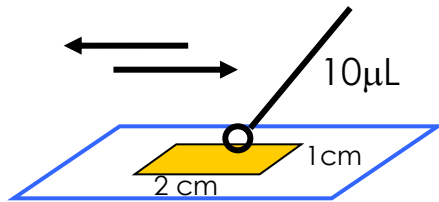
Cuenta de Breed

- Muestra a evaluar (directa o diluida)
- Microscopio
- Objetivo micrométrico
- Asa calibrada o micropipeta
- Portaobjetos
- Colorantes de Gram u otros colorantes.



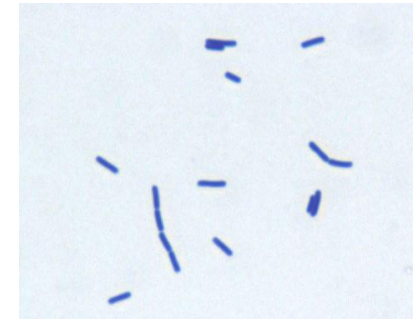
Cuenta de Breed

A



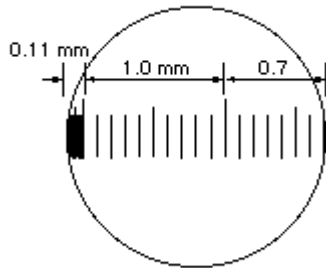
Área de la muestra = $b \times h$ y convertir a μm^2

Teñir



Observar 10 campos, contar las bacterias de cada uno de ellos y obtener el promedio $\bar{X}$

B



Determinar el área del campo: $A = \pi r^2$ (μm^2)

C

Factor = A_m / A_c

D

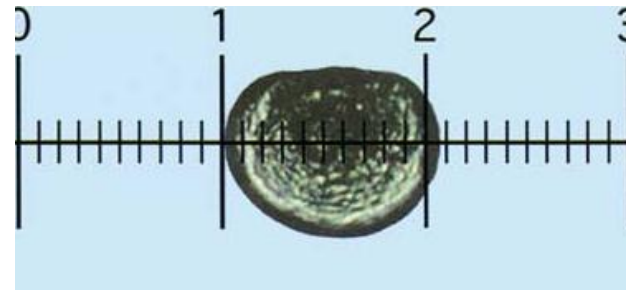
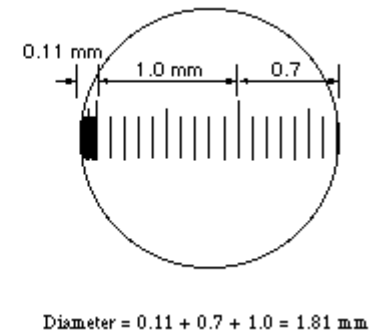
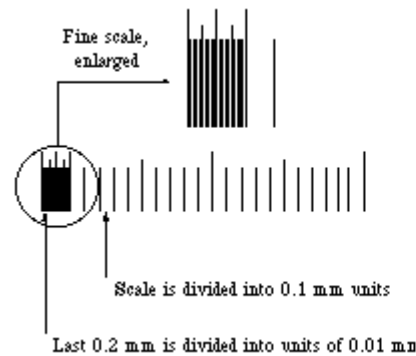
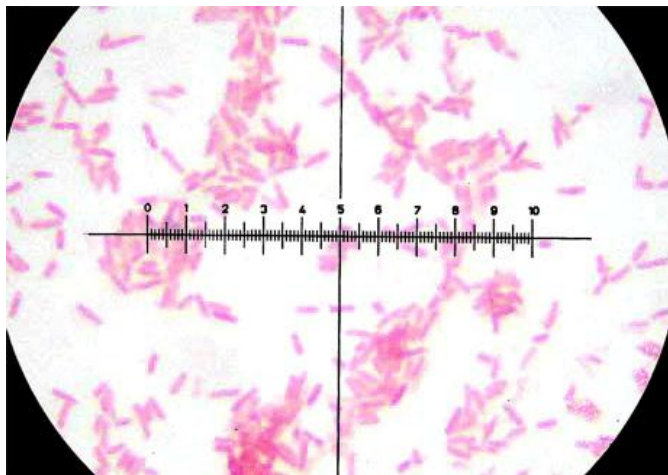
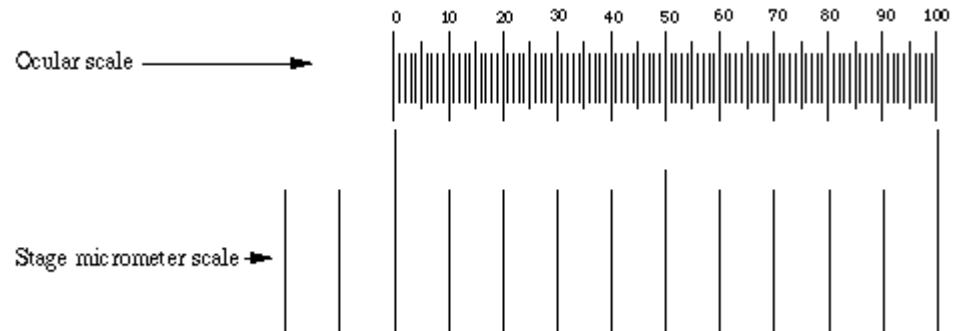
Calcular el número de bacterias por mL

$\bar{X} \times \text{Factor} \times 100 = \text{bacterias} \text{ ____ / mL}$

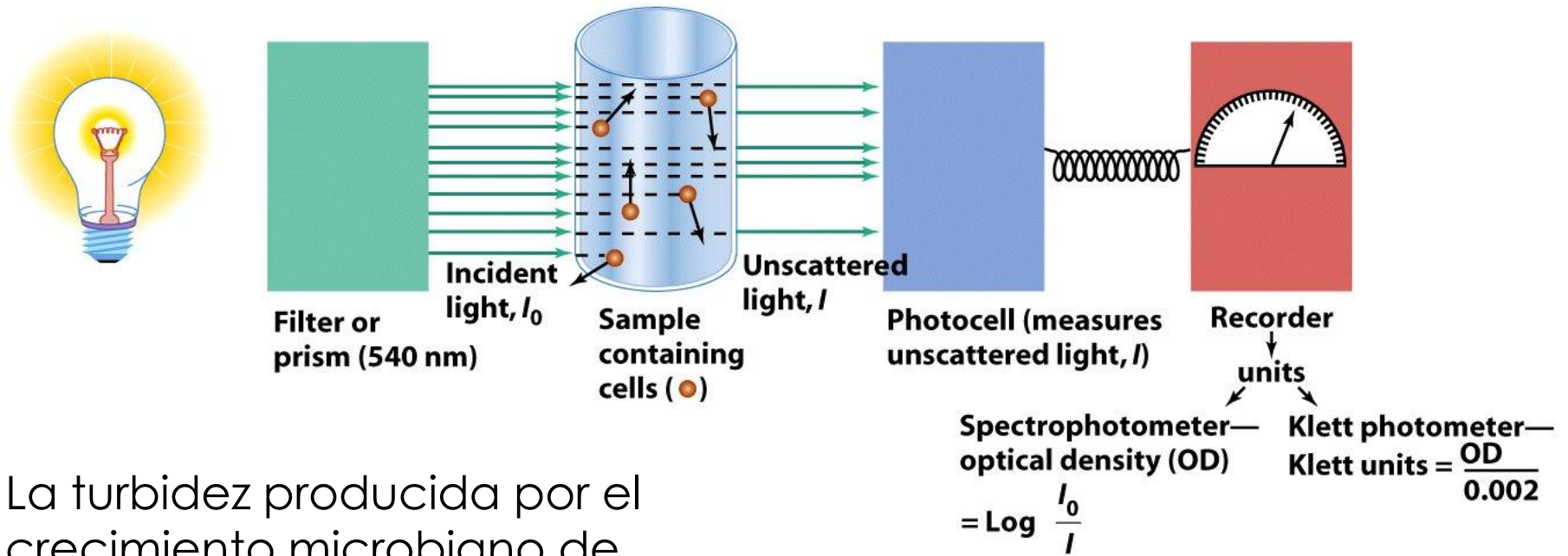
100 es la dilución inicial al tomar 0.01 mL

1 mL = 1000 μL
1 cm = 10 000 μm

Extra: Uso del equipo micrométrico



Nefelometría (Turbidimetría)

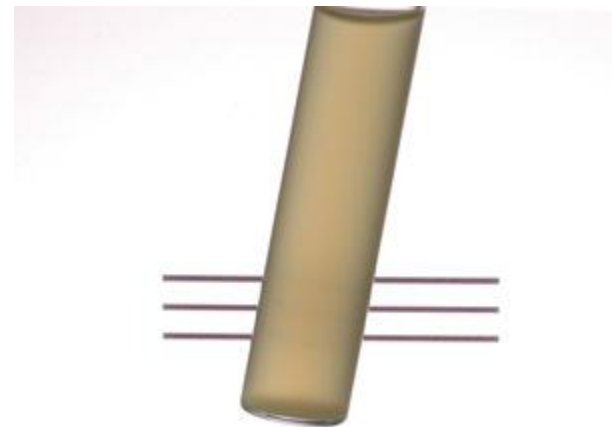
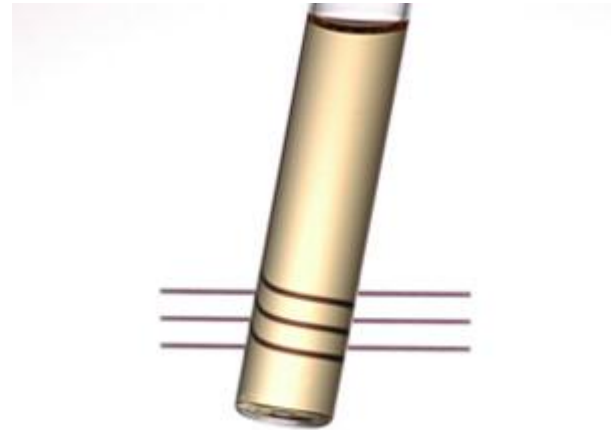
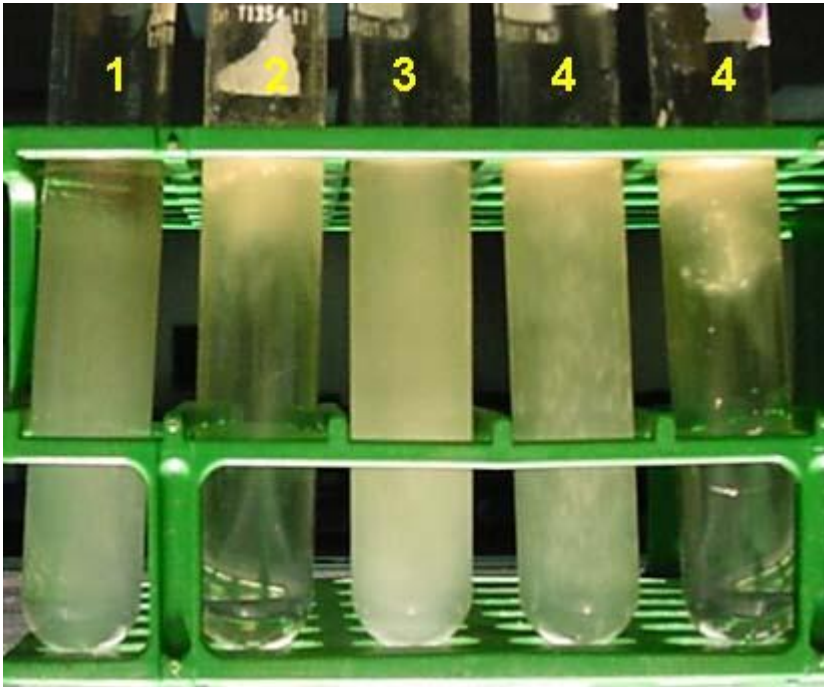


La turbidez producida por el crecimiento microbiano de microorganismos unicelulares puede ser medida de acuerdo a la capacidad de absorber la luz. La muestras a determinar son generalmente translúcidas cuando no presentan crecimiento microbiano.

Longitud de onda (λ)

- Bacterias 540nm
- Protozoarios 580nm
- Levaduras 600nm

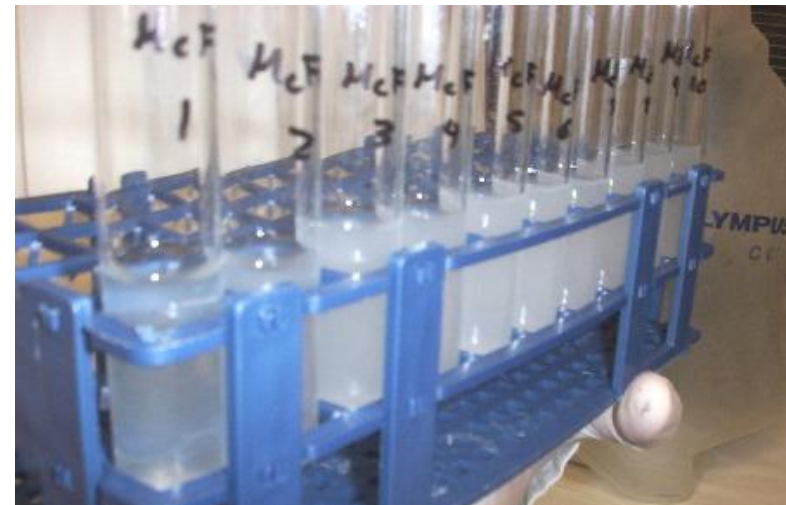
Turbidez



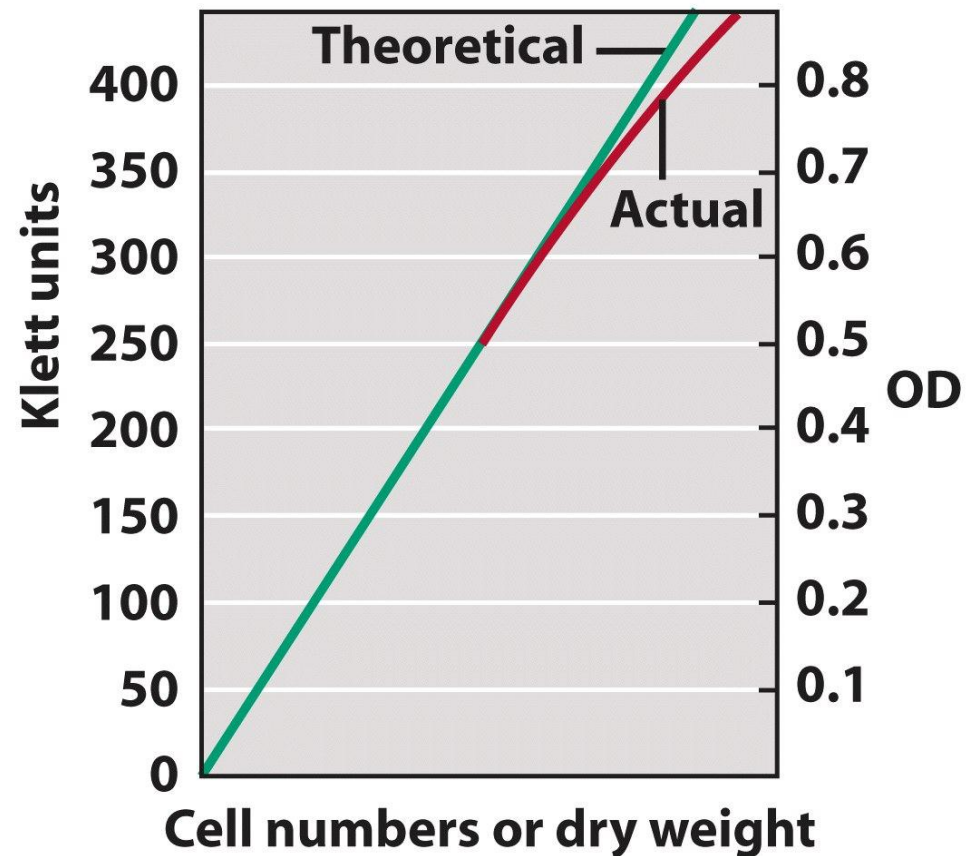
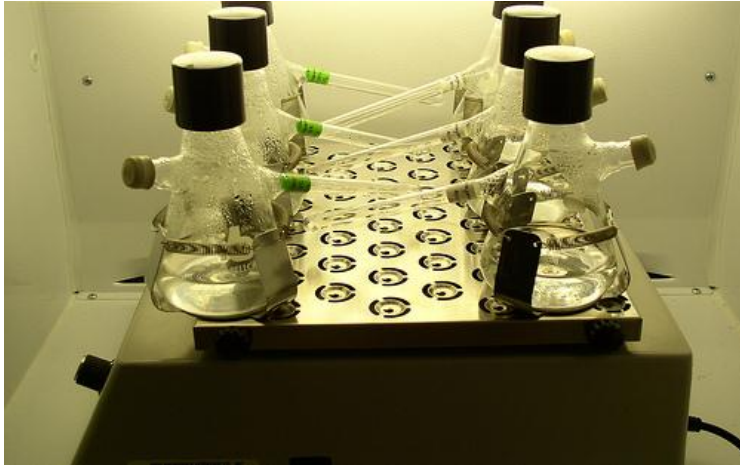
La turbidez se determina por la densidad óptica (DO) que puede ser expresada como Absorbancia, % de Transmitancia o Unidades Klett (UK).

Escala de Mc Farland

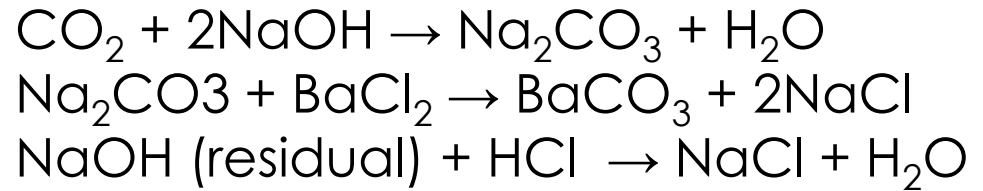
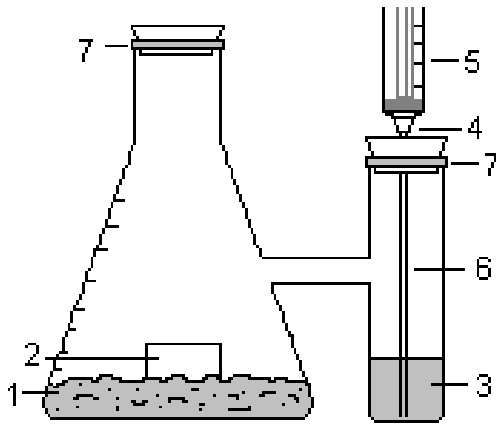
Tubo	Vol (mL) H ₂ SO ₄ 1%	Vol (mL) BaCl ₂ 1%	# de células /mL
0	10	0	0
1	9.9	0.1	3x10 ⁸ /mL
2	9.8	0.2	6x10 ⁸ /mL
3	9.7	0.3	9x10 ⁸ /mL
4	9.6	0.4	12x10 ⁸ /mL
5	9.5	0.5	15x10 ⁸ /mL
6	9.4	0.6	18x10 ⁸ /mL
7	9.3	0.7	21x10 ⁸ /mL
8	9.2	0.8	24x10 ⁸ /mL
9	9.1	0.9	27x10 ⁸ /mL
10	9.0	1.0	30x10 ⁸ /mL



Klett-Summerson Colorimeter



Actividad metabólica (producción de CO₂)

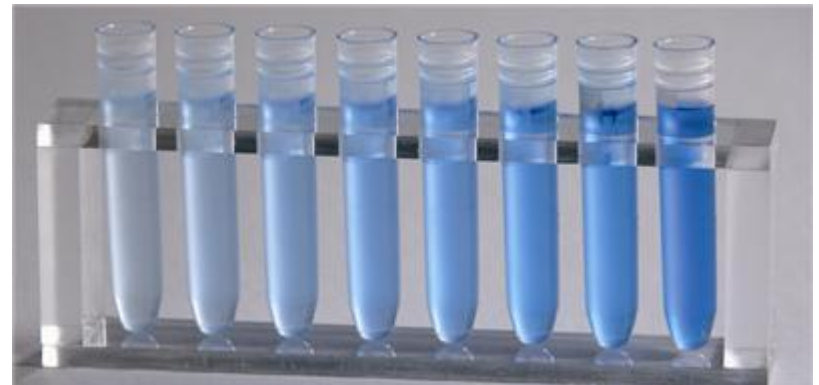


1. Muestra de suelo
2. Recipiente con agua
3. Solución de NaOH 0.5 N
4. Aguja #20 (Venocat calibre 17)
5. Jeringa desechable de 20mL
6. Tubo de plástico flexible de 1-2 mm de diámetro
7. Plastilina



Peso seco y determinación de proteína

- El peso seco (contenido de sólidos) de las células bacterianas que se encuentran en una suspensión se obtiene por el secado de un volumen en un horno a 105°C hasta peso constante.
- Es útil para grandes volúmenes. La desventaja de este método es que componentes volátiles de la célula pueden perderse por el secado y puede existir alguna degradación. La muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene una humedad relativa alta.
- La proteína se relaciona al crecimiento, por lo que un incremento en la cantidad de proteína en el paquete celular indica que hay mayor concentración de células.



Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Lowry

Curva de crecimiento Viables vs Totales

