



MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA
POBLACIÓN BACTERIANA

MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
DE SUELOS

INDICE:

Tabla de contenido

MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA POBLACIÓN BACTERIANA EN SUELOS	3
RECuentos de bacterias viables	3
RECuento de bacterias aerobias mesófilas:	4
TOMA DE MUESTRA	5
DILUCIONES:	6
MÉTODO DE RECuento EN PLACA DE SIEMBRA POR DISEMINACIÓN EN SUPERFICIE:	9
EN MEDIO LÍQUIDO: DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MAS PROBABLE (NMP) DE MICROORGANISMOS POR ML, G / O 100 ML. (MEDIO LÍQUIDO) MÉTODO POCO USADO EN SUELOS.	10
TABLA 1: NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP) DE BACTERIAS EN ALIMENTOS, (TRES TUBOS POR CADA DILUCIÓN):	13

Objetivos:

- Conocer el numero de microorganismos presentes en un suelo aplicando las técnicas actuales de recuento bacteriano y conociendo las ventajas y desventajas de cada uno.

*Recuento en placa por diseminación en superficie y volcado.

*Recuento por determinación del número más probable (NMP)

*Valorar la responsabilidad, interacción, cooperación y respeto para fomentar una eficiente labor grupal.

MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA POBLACIÓN BACTERIANA EN SUELOS

Los suelos son matrices complejas y heterogéneas. La variabilidad de las propiedades presentes en un suelo varían con el espacio y el tiempo, esto presentan un desafío para la evaluación de un sitio y la detección de cambios dentro y entre sitios. La variación espacial incluye la variación horizontal y vertical en el espacio.

Las bacterias se distribuyen muy irregularmente en el ambiente natural, matriz suelo, 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 nutrirlas, tiene una importancia muy grande, por el grado de biodeterioro que producen. Por ello el muestreo y el detalle de cómo y donde se toma la muestra es relevante.

El análisis microbiológico del suelo estudia la presencia, abundancia y actividad de las poblaciones microbianas presentes en ese momento. 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 para ver que método utilizamos tenemos que tener presente que buscamos y para que buscamos. 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 GRAMO** según corresponda.

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

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 45º 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.

Toma de muestra

Lo primero que se debe hacer a la hora de tomar muestras es el diseño, este debe estipular la forma y el número de muestras a tomar teniendo en cuenta que debe recogerse una muestra por cada porción de terreno con características particulares. Las muestras deben ser tomadas al azar, recorriendo la parcela o el lote en cuadrículas, zigzag o diagonales o sobre el trazado de una transecta lineal. La transecta es una línea recta imaginaria con puntos de muestreo localizados a intervalos regulares.

La muestra puede ser, una muestra simple: es la que se obtiene mediante una sola extracción. Generalmente, este tipo de muestreos no se llevan a cabo a campo debido a la gran heterogeneidad del suelo. O una muestra compuesta, que se refiere a la muestra de suelo y/o rastrojo obtenida por la extracción de varias muestras simples o submuestras, reunidas en un recipiente o bien mezcladas (homogeneizadas) de aproximadamente 0,5 a 1 Kg de suelo. Se recomienda la extracción de 15-20 submuestras por sitio de muestreo. El peso de cada submuestra debe ser de aproximadamente 200 gramos de suelo o por lo menos de igual volumen que las demás submuestras. En el caso de rastrojo se colecta x 40 cm). La utilización de muestras compuestas para el análisis es un efectivo método para obtener una adecuada estimación de la media de un parámetro reduciendo los costos y tiempo de análisis. Las muestras compuestas: a) deben ser homogéneas; b) cada submuestra debe contribuir de igual manera (mismo volumen) a la muestra compuesta; c) cada submuestra debe ser tomada siguiendo el mismo procedimiento en cuanto a instrumento utilizado, profundidad, etc.; y d) las submuestras deben ser independientes y no presentar interacción.

Acondicionamiento de las muestras

En el campo las muestras deben ser colocadas en bolsas de polietileno o frascos de vidrio boca ancha estériles, debidamente rotuladas y acondicionadas en una conservadora hasta su llegada al laboratorio. De esta manera, se evita que sufran exceso de calor e insolación y que se alteren sus condiciones originales. El rótulo de cada muestra estará identificado (letras o números) y hora y fecha, ubicación precisa, GPS, y cadena de custodia.

Al llegar al laboratorio se las muestras compuestas se trabajan para homogenizar y se separaran por cuarteos. Luego se requiere un tratamiento previo de la muestra para liberar a un medio fluido los microorganismos aprisionados en el interior de la muestra.

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.

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).

1. 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.

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

2. 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.

3. Cálculo de recuento:

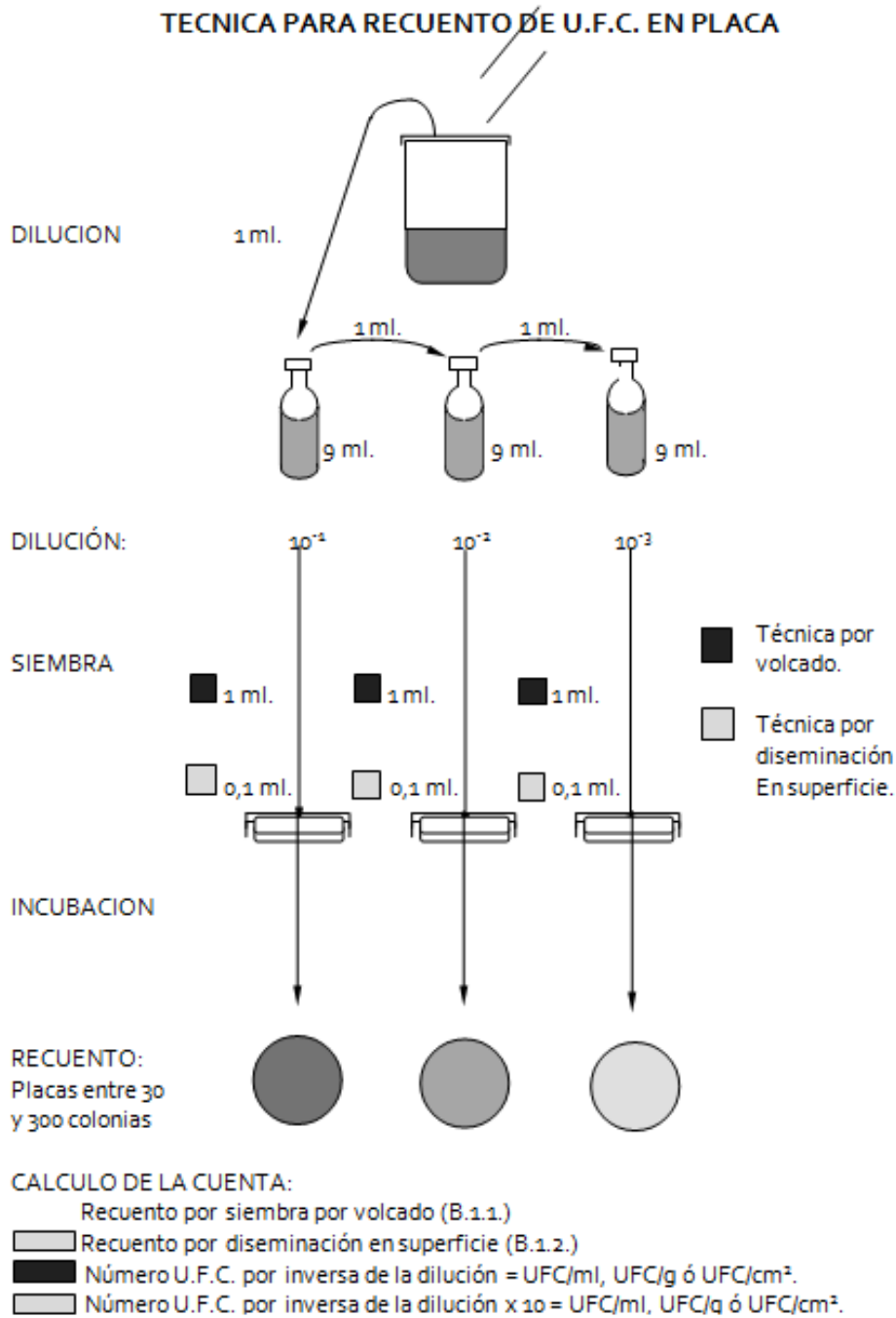
Elegir dos placas correspondientes a una dilución que presente entre **30 y 300 colonias**. Contar todas las colonias de cada placa. Se puede utilizar un contador de colonias con un dispositivo de luz y una lupa que aumente 2-3 veces el diámetro de la colonia.

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 1:



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. 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) método poco usado en suelos.

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)

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:

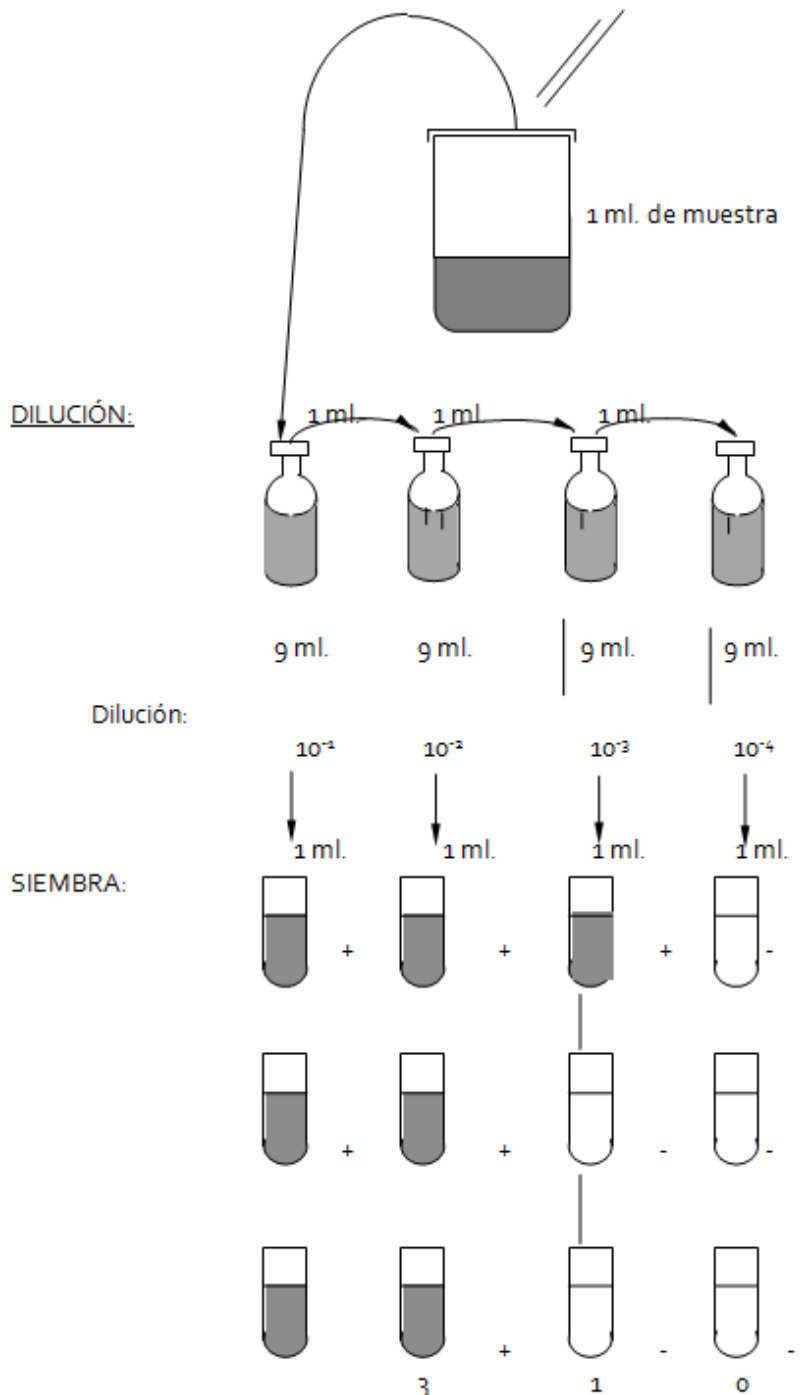
Para determinar el N.M.P., considerar la dilución más alta en la que los tres tubos presentaron crecimiento y las dos diluciones superiores más próximas. Con ese número obtenido ir a la tabla para determinar el N.M.P.

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 $40 \times 10 = 400$ microorg/ml. ó microorg/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.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

- Recuento en placa por diseminación en superficie y volcado.
 - Recuento por determinación del número más probable (NMP) de las muestras provistas por la cátedra.
-