

TP N°5: Cinética del crecimiento bacteriano y Métodos de recuento. Pruebas bioquímicas

Objetivos:

- Determinar y describir las características del crecimiento bacteriano.
- Evaluar el crecimiento microbiano en distintos medios utilizando curvas de crecimiento, conteo directo y conteo por dilución y siembra.
- Determinar concentración bacteriana por recuento de viables UFC/mL o g, por número más probable NMP

Las bacterias son capaces de realizar una serie de transformaciones químicas mediante reacciones enzimáticas que se traducen en síntesis de nuevos productos, transporte, movimiento y duplicación celular. Se considera crecimiento bacteriano al aumento ordenado de todos los componentes celulares con el consiguiente aumento del número de células bacterianas, o sea que el resultado final del crecimiento bacteriano es la duplicación celular. El crecimiento bacteriano se inicia con la captación de nutrientes a partir del medio ambiente y los pasos intermedios entre la captación de nutrientes y la división celular constituyen el metabolismo bacteriano. El metabolismo bacteriano está compuesto de dos etapas: una de síntesis o Anabolismo y una de destrucción o Catabolismo. Durante el anabolismo o fase anabólica las sustancias simples se convierten en sustancias complejas y durante el catabolismo o fase catabólica las sustancias complejas se convierten en sustancias simples. Existen diferentes métodos para la medición del crecimiento bacteriano, entre ellos tenemos:

Recuento 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 sí se sabe es que cada colonia observada se formó a partir de por lo menos un microorganismo. Esta es una condición necesaria y suficiente. La colonia se considera 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 errores.

La enumeración en medios sólidos se funda en que cada bacteria desarrollará 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 UFC.

Procedimiento

Preparar una suspensión al 10% de suelo en 50 ml. de agua destilada. 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, 1/ 100.000 de la suspensión anterior respetando un volumen final de 5 ml.

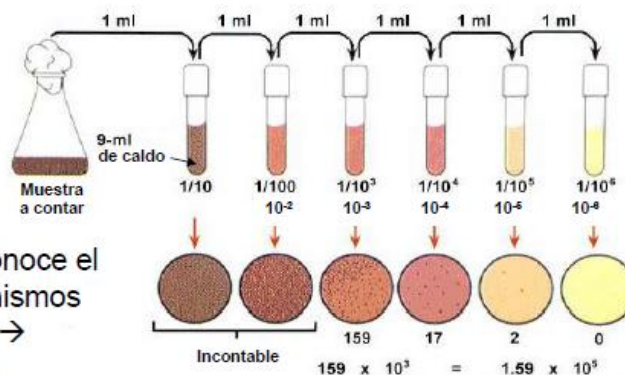
Se rotulan 5 placas (una para cada dilución) sembrar 0.1 ml (con pipeta limpia en cada una) de cada dilución en una placa de Petri con Agar Nutritivo y con ayuda de un asa de Drigalsky extenderlo por toda la placa. Incubar a 37 °C durante 2- 3 días en estufa. Observar las placas en busca de efectos de 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 cuadriculados. Dar el resultado en ufc/g.

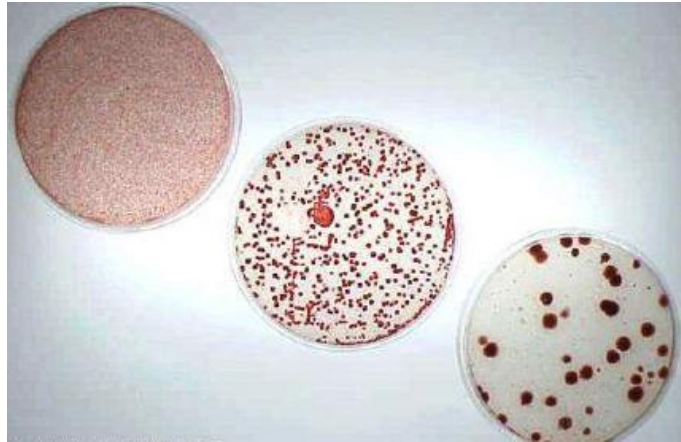
$$\text{Ufc/g} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias en placa (entre 30 y 300)} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

- No debe ser muy alto → para poder contarlas
- No debe ser muy bajo → para que tenga significado estadístico

No. colonias
→ 30 - 300

- ✓ Normalmente no se conoce el número de microorganismos viables → diluciones → usualmente seriadas





Estimación del número más 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. 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. Esta técnica se usa principalmente para la estimación de bacilos coliformes en caldo MacConkey, pero puede ser empleada para diferentes clases de microorganismos en muestras líquidas.

Procedimiento

Es posible calcular el número de bacterias por cada 100 ml. de muestras. Existen tablas para muestras de 10ml., 1ml. y 0,1 ml. utilizando tres tubos para cada tamaño de la muestra. Se mezclan las muestras mediante vigorosas sacudidas e inversiones. Se pipetea las cantidades mencionadas de suspensión de muestra y se colocan en tubos con 5 ml de medio de cultivo (caldo MacConkey).

Tres tubos con 10 ml. (de doble concentración), tres tubos con 1 ml. (en medio simple), tres tubos con 0,1 ml. (en medio simple).

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 (10ml, 1ml y 0,1 ml)

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

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Realizar el recuento de colonias en placas y la estimación del NMP, siguiendo los procedimientos detallados anteriormente, para ello se utilizarán las colonias de bacterias de los anteriores trabajos prácticos.

BIBLIOGRAFÍA

Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

- Brock, T. & M. Madigan. 1993. MICROBIOLOGÍA. 6ta Edición. Prentice Hall Hispanoamérica S. A. México.
- Ranea, F. 2002. <http://www.microbiologia.com.ar/fisiologia/crecimiento.html>