

5.5: Laboratorio 4. Métodos de recuento de poblaciones microbianas

Objetivos

- Conocer diferentes métodos para estimar el crecimiento microbiano
- Analizar los efectos del medio ambiente sobre el desarrollo de los microorganismos
- Aplicación práctica de las técnicas de medición del crecimiento microbiano

Desarrollo práctico

Primer día:

Determinar la curva de crecimiento de una cepa de *Staphylococcus* sp. midiendo el incremento de la masa celular (Densidad óptica) en el tiempo

Preparación del inóculo: Sembrar 1 ml del cultivo de *Staphylococcus* sp. en un frasco Erlenmeyer que contiene 100 ml de caldo nutritivo, incubar a 150 rpm en un baño a 37° C durante 12 h. Luego del período de incubación, tomar una alícuota de dicho cultivo y medir su absorbancia (DO) a 640 nm.

Comparar el crecimiento de la cepa en diferentes tipos de medios de cultivo

Crecimiento control: inocular 1 ml del cultivo del microorganismo de 12 h a un frasco Erlenmeyer con 100 ml de caldo de cultivo fresco, incubar a 150 rpm en un baño a 37° C. Medir la DO cada 30 min a 1 h aproximadamente, hasta T10. Tabular las lecturas de DO.

Influencia del antibiótico sobre el crecimiento microbiano: inocular 1 ml del cultivo del microorganismo de 12 h a un frasco Erlenmeyer con 100 ml caldo de cultivo fresco, incubar a 150 rpm en un baño a 37°C. Medir la DO cada 30 min a 1 h y al tiempo 6 (T6) aproximadamente, adicionar el antibiótico a la concentración adecuada. Tabular las lecturas de DO.

Recuento de células viables por el método de dilución a partir del cultivo control y cultivo con antibiótico

A partir del **cultivo control** y del **cultivo con antibiótico** a tiempo 6, extraer 2 ml del mismo y realizar el recuento de células viables. A partir de cada cultivo realizar diluciones seriadas factor 10 en solución fisiológica y sembrar 0,1 ml de cada dilución sobre placas de agar nutritivo por duplicado. Incubar a 37°C durante 24 - 48 h. Realizar el recuento y expresar los resultados como UFC/ml.

Recuento directo al microscopio

Cargar la cámara de recuento a partir de un cultivo de levaduras que posea una suspensión aproximada de 10⁶ cél/ml, utilizando una pipeta Pasteur. Contar al microscopio y estimar el recuento de células teniendo en cuenta las características de la cámara y las diluciones practicadas. Expresar los resultados en cél/ml.

Determinación del número de bacterias por la técnica del NMP

Se practicará el recuento de bacterias coliformes totales en una muestra de agua de río o de pozo u otra, procediendo de la siguiente manera:

- Sembrar las siguientes series de tres tubos con el medio Mac Conkey:
 - 10 ml de agua en 3 tubos con 10 ml de medio de doble concentración
 - 1 ml de agua en 3 tubos con 10 ml de medio de simple concentración.
 - 0,1 ml de agua en 3 tubos con 10 ml de medio de simple concentración.
- Incubar los tubos a 37°C por 24 - 48 h.

Caldo Mac Conkey: Peptona de caseína 20 g, lactosa 10 g, bilis de buey desecada 5 g, púrpura de bromocresol 0,01 g, agua destilada 1000 ml, pH=7

Segundo día

- Confeccionar las curvas de crecimiento a partir de los resultados obtenidos de DO a partir del cultivo de crecimiento control y del cultivo de crecimiento con antibiótico. Calcular los parámetros de crecimiento en cada curva y comparar.
- Realizar los recuentos de células viables en las placas. Calcular y tabular los recuentos de viables en cada curva.

- Observar los tubos de NMP con reacción positiva (producción de gas y viraje ácido del medio), armar el número de serie, obtener el número de tabla y calcular el NMP.

Responda las siguientes preguntas

¿Qué efecto tendría sobre la curva de crecimiento bacteriano (crecimiento control) cada una de las siguientes condiciones?

- a) Incubar en un baño con agitación a 25°C
- b) Incubar en un baño con agitación a 30°C
- c) Incubar en un baño con agitación a 37°C
- d) Utilizar como inóculo un cultivo de 48 hs de crecimiento en vez de las 12 hs recomendadas.

Tratamiento de los materiales usados:

- Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpie adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Descarte todo material contaminado en las bolsas para residuos patógenos.
- Lávese las manos con jabón.

This page titled [5.5: Laboratorio 4. Métodos de recuento de poblaciones microbianas](#) is shared under a [not declared](#) license and was authored, remixed, and/or curated by [María M. Reynoso, Carina E. Magnoli, Germán G. Barros y Mirta S. Demo](#).