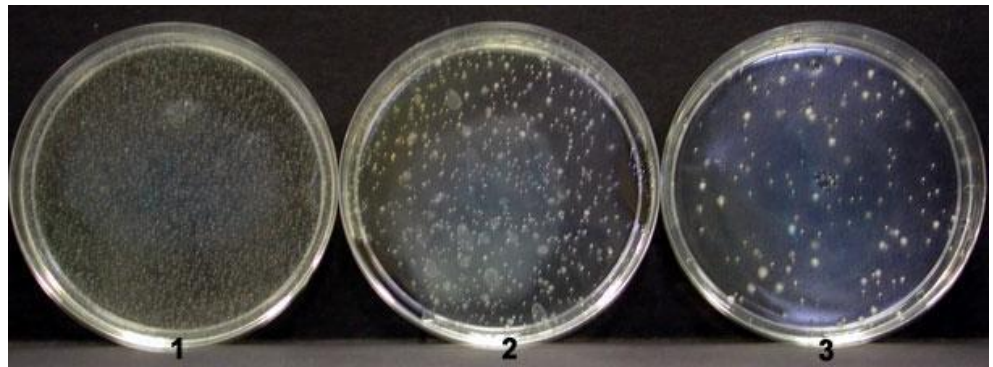


**NOLA EBATZI
MIKROBIOLOGIAREN GAINEKO
ALDERDI PRAKTIKOAK**

2. MIKROORGANISMOEN ZENBAKETA



Inés Arana, Maite Orruño eta Isabel Barcina

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia saila
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

2. MIKROORGANISMOEN ZENBAKETA

Metodo asko daude mikroorganismoak zenbatzeko jatorri ezberdinetako laginetan. Metodo bakoitzak bere berezitasunak dauzka datuak transformatzeko eta laginaren mikroorganismo-dentsitatea kalkulatzeko orduan: Unitate Kolonia- Eratzaileak (UKE), mikroorganismoen kopuru totala, ...

Bakterioak eta onddoak zenbatzeko, laginaren mililitroko edo gramoko Unitate Kolonia-Eratzaileak (UKE) kuantifikatzea metodo erraza da. Aurreko kapituluan jada problemak ebatzi dira metodo hau erabiliz. Dena den, kontuan hartu behar da diluzio bakoitzeko 3 edo 5 plaka erein behar direla.

Laginaren diluzio hamartarrak egiten badira eta diluzio bakoitzeko plaka bat baino gehiago ereiten badira, aukera batzuk daude emaitzak interpretatzeko. Gure kasuan, metodo errazena erabiliko dugu: 30-300 kolonia dituen diluzioa aukeratu eta batezbestekoa kalkulatu:

$$\text{UKE/ml} = \frac{\text{zenbatutako koloniak (batezbestekoa)}}{\text{ereindako ml-ak}} \times \text{Diluzio faktorea}$$

$$\text{UKE/ml} = \frac{\text{zenbatutako koloniak (batezbestekoa)}}{\text{ereindako ml-ak}} \times \frac{1}{\text{Kontzentrazio faktorea}}$$

Aurreko kapituluan ikasitakoa erabiliz, ebatzi hurrengo problemak:

2.1. Kalkulatu lagin hauetako bakterioen dentsitatea (UKE/ml) emandako informazioarekin: diluzioak eta zenbaketak. Kontuan hartu plaka bakoitzean 100 μl erein direla.

Lagina	Diluzioa	Plaka 1	Plaka 2	Plaka 3
1	10^{-3}	1816	1698	1885
	10^{-4}	180	159	186
	10^{-5}	16	19	10
2	10^{-2}	475	477	480
	10^{-3}	45	48	51
	10^{-4}	5	10	4
3	10^0	335	328	324
	10^{-1}	32	28	29
	10^{-2}	5	3	2

- 2.2. Lagin baten 100 µl ereiten badira 3 plakatan, zein izango da teknikaren Unitate Kolonia-Eratzaileen detekzio-muga? Eta, 5 plakatan ereiten badira?
- 2.3. Bakterio-kultura baten dentsitatea $5 \cdot 10^8$ UKE/ml-koa da. Badakigu 0,1 ml erein zirela plakan eta, inkubatu ondoren, 50 kolonia zenbatu direla. Zein zen ereindako diluzioa?
- 2.4. Mikroorganismo-kultura baten dentsitatea kalkulatu da mikrotantaren teknika erabiliz (10-20 µl-ko tantak jarri barreiatu gabe hazkuntza-medio duen plaka batean). Lortutako emaitzak taulan agertzen dira:

Diluzioa	Kontaketa 1	Kontaketa 2	Kontaketa 3
10^{-3}	180	159	186
10^{-4}	16	19	10

Erabilitako bolumena 10 µl-koa bada, zein da laginaren bakterio-dentsitatea?

- 2.5. Mikrotanta-teknikaren kasuan, lagin bakoitzeko 10 µl-ko erreplikak erabiltzen badira, zein izango da zenbaketa-teknika honen detekzio-muga?

Zenbaki Gertagarrienaren Teknika (ZG) maiz erabiltzen den beste zenbaketa-teknika bat da. Hazkuntza-medio likidoa duen hodi multzo batean (3 edo 5 hodi diluzio bakoitzerako) jatorrizko laginaren diluzioak txertatzea da teknika honen oinarria. Inkubazioaren ondoren hazkuntza zein hoditan gertatu den ikusi ondoren probabilitate taulak (MacGrady taulak) begiratu behar dira, laginean egon daitekeen bakterio kopuru gertagarriena jakin ahal izateko. Ebatzi hurrengo problemak atxikitako MacGrady taula erabiliz.

MacGrady taula (1 ml/hodi, 3 hodi/diluzio, 3 diluzio). Emaitza bakterio/ml-tan adierazten da.

Hodien irakurketa	ZG	Hodien irakurketa	ZG	Hodien irakurketa	ZG
000	-	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

2.6. Ur-lagin baten 1:10 eta 1:100 diluzioak prestatzen dira. Aldi berean, 3 multzo prestatzen dira, bakoitza 10 ml salda elikagarri dituzten 3 saio-hodiekin. Hodi multzoetan, lagina diluitu gabe (3 hodi), laginaren 1:10 diluzioa (3 hodi) eta laginaren 1:100 diluzioa (3 hodi) inokulatzen dira. Inokulatutako bolumena ml batekoa da. Hodiak 20°C-tan inkubatzen dira eta 48 orduren buruan irakurtzen dira. Hazkuntza badago uhertasuna agertuko da. Taulan emandako datuak erabiliz, zein izango da ur-laginaren bakterio-dentsitatea?

Lagina	Emaitzak*		
	H	H	H
1:10 diluzioa	H	H	H
1:100 diluzioa	EH	H	EH

*H = hazkuntza = uhertasuna; EH = ez dago hazkuntzarik = hazkuntza-medio gardena

2.7. Aurreko adibidea erabiliz, hodietan hazkuntzarik ez balego, nola adieraziko zenuke bakterioen dentsitatea azterketaren emaitzak emateko orduan?

2.8. Tarta baten mikroorganismo-kontaketa egiteko, hurrengo prozedura jarraitzen da: hartu 62,5 g tarta eta 187,5 ml peptona-ur tanponatua duen ontzi esteril batera gehitu. Esekidura honekin 3 diluzio hamartar jarraitu prestatzen dira. Aldi berean, 4 hodi-multzo prestatzen dira, bakoitza 10 ml MacConkey salda dituzten 3 saio-hodirekin. 44,5 °C-tan inkubatu eta gero, hauek dira lortutako emaitzak:

Prozedura	Emaitzak*		
62,5 g tarta + 187,5 ml peptona-ur	H	H	H
10 ⁻¹ diluzioa	H	H	M
10 ⁻² diluzioa	H	M	M
10 ⁻³ diluzioa	M	M	M

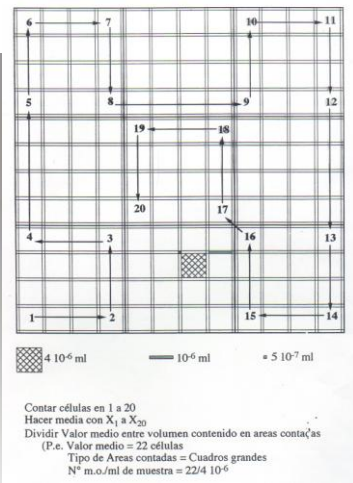
*Hodiak esekiduraren edo diluzioen mililitro batekin inokulatzen dira. H = horia, M = morea.

Zein da tartaren mikrobio-dentsitatea bakterio/g-tan adierazia?

MacConkey saldaren konposaketa hurrengoa da: 20 g peptona, 10 g laktosa, 5 g idiaren behazun lehorra, 0,03 g bromokresol-purpura eta litro bat ur destilatu. Datu hauekin, informazio gehiago eman ahal izango zenuke bakterioei eta bere metabolismoari buruz?

Mikroskopian oinarrিতa dauden metodoak ere erabil daitezke mikroorganismoak zenbatzeko (mikroskopia fotonikoa, epifluoreszentziakoa,...).

Mikroorganismo handienak (legamiak, protistak,...) kontaketa-ganberak erabiliz zenbatu daitezke.



Hurrengo formulak erabili behar dira mikroorganismoen kopurua kalkulatzeko:

Lagina diluitua bada:

$$\text{Mikroorganismo/ml} = \frac{\text{batezbesteko mikroorganismo /lauki}}{\text{ml/lauki}^*} \times \text{Diluzio faktorea}$$

Lagina kontzentratua bada:

$$\text{Mikroorganismo/ml} = \frac{\text{batezbesteko mikroorganismo /lauki}}{\text{ml/lauki}^*} \times \frac{1}{\text{Kontzentrazio faktorea}}$$

Kontuz unitateekin! Kalkuluak egin ondoren, lortzen dugun zenbakia unitate egokietan adierazi beharko dugu: mikroorganismo/bolumen

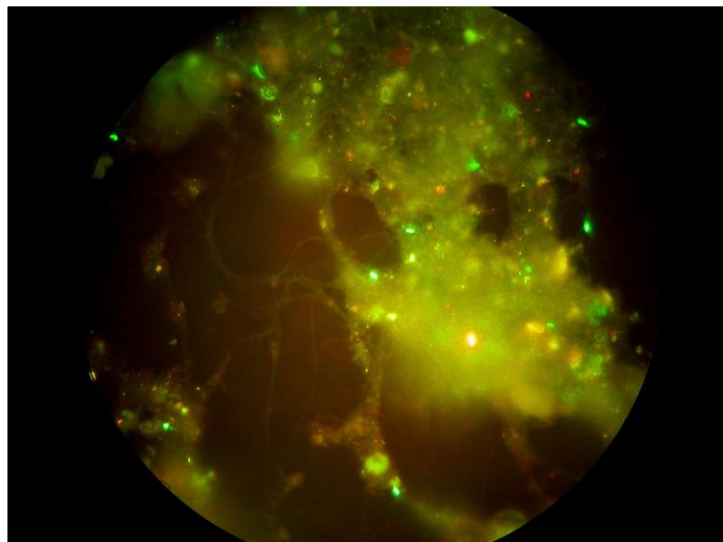
* Erabiltzen dugun kontaketa-ganberaren arabera faktore hau ezberdina izango da, ml/lauki edo lauki/ml-tan adierazten da.

2.9. Legamien esekidura batean dauden mikroorganismoen kopurua zenbatzen da. Kontaketa-ganberan jarri baino lehen esekidura diluitzen da (1:1000 diluzioa). Fabrikatzaileak emandako ganberaren faktorea $0,25 \cdot 10^{-6}$ ml/lauki da. Taulan agertzen dira lortutako emaitzak, zein izango da esekiduraren dentsitatea (legamia/ml)?

Lauki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Legamiak	12	14	12	11	12	14	15	12	9	11	12	14	15	10	11	9	10	11	12	14

2.10. Legamiak zenbatzeko kontaketa-ganbera erabiliz, zein izango litzateke metodoaren detekzio-
muga 20 lauki zenbatuko bagenitu? Ganberaren faktorea: $1,5 \cdot 10^5$ lauki/ml.

Epifluoreszentzia mikroskopia fluorokromoekin tindatutako mikroorganismoak zenbatzeko erabil daiteke. Oso teknika egokia da bakterioak zenbatzeko.



Kasu honetan, hurrengo formula erabiliko dugu bakterio-dentsitatea kalkulatzeko:

$$\text{Mikroorganismo/ml} = \frac{\text{mikroorganismo/eremu}}{\text{ml/iragazki}} \times \text{Mikroskopiaoren faktorea} \times \text{Diluzio faktorea}$$

Mikroskopiaoren faktorea eremu/iragazki-tan adierazten da

2.11. Ur-lagin baten bakterio-dentsitatea jakin behar da. Horretarako, laginaren $100 \mu\text{l}$ hartzen dira eta akridina-laranja tindatzaile fluorokromoaz tindatzen dira eta iragazi egiten dira polikarbonatozko iragazkia erabiliz ($0,2 \mu\text{m}$ -tako). Gero, epifluoreszentzia mikroskopioan, 20 eremutan dauden bakterioak zenbatzen dira. Lortutako emaitzak honako hauek dira:

Eremu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Bakterioak	15	12	11	9	21	16	13	13	15	20	22	13	14	12	18	17	9	22	18	18

Mikroskopiaoren faktorea 30.954 eremu/iragazki dela jakinez, zein da laginaren bakterio-dentsitatea? Laginaren 10^{-2} diluzioaren mililitro bat iragaziz gero, zein izango litzateke laginaren bakterio-dentsitatea?

- 2.12. Lagin batzuen bakterio-dentsitatea aztertzeko epifluoreszentzia mikroskopia erabili da. Mikroskopiaoren faktorea 64.761,9 eremu/iragazki dela jakinez, kalkulatu hurrengo laginen bakterio-dentsitatea taulan agertzen diren datuak erabiltzen.

Lagina	Iragazitako bolumena	Diluzioa	Bakterio/eremu
1	1 ml	Lagina	25/32/31/30/35/21/14/21/21/20
2	100 µl	10 ⁰	22/22/21/22/23/23/21/17/21/21
3	50 µl	10 ⁻¹	23/23/22/21/23/24/15/31/24/24
4	100 µl	10 ⁻²	6/8/11/9/13/7/7/8/9/11

- 2.13. Epifluoreszentzia mikroskopia erabiltzen badugu bakterioak zenbatzeko, zein izango litzateke metodoaren detekzio-muga hurrengo baldintzetan?

Iragaz daiteken bolumen maximoa: 5 ml

Zenbatutako eremuak: 30

Mikroskopiaoren faktorea: 34.520 eremu/iragazki

- 2.14. Butroi ibaiaren ur-laginak hartu ziren. Laborategian, 1000 ml-ko matraze bat prestatu zen laginaren 500 ml-rekin. Matrazea *E. coli*-rekin inokulatu zen (10⁶ UKE/ml, gutxi gorabehera) eta 20°C-tan inkubatu zen 6 egunetan. Aldian behin, alikuotak hartu ziren *E. coli* eta protozoo flagelatuak zenbatzeko. *E. coli* kontatzeko EMB agarra (hautakorra eta bereizgarria, *E. coli*-k kolonia berde metalikoak eratzen ditu) erabili zen. Protozoo flagelatuak zenbatzeko epifluoreszentzia mikroskopia erabili zen, horretarako alikuotak iragazi ziren iragazkiak (poroen diametroa 0,8 µm-koa) erabiliz eta DAPI fluorokromoarekin tindatu ziren (epifluoreszentzia mikroskopiaoren faktorea: 64761,9 eremu/iragazki).

Hurrengo emaitzak lortu ziren:

Denbora (egunak)	Dil	Inokulatutako bolumena (µl)	Kolonia/plaka	Dil	Iragazitako bolumena (ml)	Flagelatu/eremu
0	10 ⁻³	100	96/96/108	L	40	4/6/6/5/4/1/1/3/4/5 6/4/4/3/1/2/1/4/4/3
1	10 ⁻³	100	106/111/98			
2	10 ⁻¹	100	240/216/248	10 ⁻¹	5	8/7/6/7/8/8/5/5/7/8 8/7/7/5/5/7/8/3/7/5
3	L*	100	315/296/298			
4	L	100	88/76/78	10 ⁻¹	20	3/4/3/3/0/3/4/1/4/2 0/0/2/4/3/6/7/7/6/4
5	L	1000	265/267/281			
6	L	1000	166/166/168	10 ⁻¹	40	4/4/3/4/5/0/0/3/4/3 3/2/4/4/2/1/0/6/4/2

* L = lagina

Zer eragina dute protozoo flagelatuek *E. coli*-ren biziraupenean?

2.15. Fase egonkorrean bakterio-kultura baten dentsitatea $4 \cdot 10^8$ zelula/ml-koa dela susmatzen dugu. Hau egiaztatzeko bakterioak zenbatuko ditugu epifluoreszentzia mikroskopia erabiliz. Eredu bakoitzean 20-30 bakterio zenbatzea gomendagarria da. Mikroskopiaaren faktorea hau 20.000 eremu/iragazki da. Informazio hau kontuan hartuta, zeintzuk dira iragazi behar ditugun laginaren diluzioa eta diluzioaren bolumena?

2.16. Mikroorganismo-kultura baten 10^{-3} diluzioaren 20 ml prestatu behar ditugu. Nola egingo zenuke?

Gero,

- Diluzioaren 5 ml iragazten dira bakterio kultibagarriak kuantifikatzeko. Iragazkia hazkuntza-medio egoki baten gainean kokatzen da. Inkubatu eta gero, 125 kolonia zenbatzen dira. Zein da laginaren dentsitatea UKE/ml-tan adierazia?
- Diluzioaren 10 ml iragazten dira iragazki baten bidez (poroen diametroa $0,22 \mu\text{m}$ -koa duena) eta akridina-laranjarekin tindatzen dira. Mikroskopia egindako zenbaketak hauek dira: 15/14/13/20/12/10/15/17/16/17. Mikroskopiaaren faktorea 1.920 eremu/iragazki bada, zein da bakterio-dentsitatea?

2.17. Hurrengo datuak erabiliz, zein da Gram negatiboen portzentajea kultura-misto batean? Azaldu zure erantzuna

- 10^{-2} diluzioa; iragazitako bolumena = 2 ml; mikroskopiaaren faktorea = 15.000 eremu/iragazki. Bakterioen zenbaketak: 22/21/20/23/22/22/23/24/25/25.
- MacConkey agarra zuten 3 plaka erein eta gero, kolonien zenbaketak hauek ziren: Laktosa positiboak = 170/165/182; Laktosa negatiboak = 80/70/76.

Metodo klasikoa eta oso erraza mikroorganismoak kuantifikatzeko **absorbantziaren neurketan** oinarrituta dago. Mikrobio-esekidura baten absorbantzia uhin-luzera jakin batean neurtzen da eta lortutako baloreak dentsitatean (zelula/ml) transformatzen dira. Jakina, baloreak transformatu ahal izateko aurretiko azterketa beharrezkoa da. Horretarako, mikrobio-esekiduraren diluzioak prestatzen dira eta diluzio bakoitzeko absorbantzia eta dentsitatea (bakterio/ml) kalkulatu dira. Informazio honekin ekuazio bat lortzen da parametro biak (absorbantzia eta dentsitatea) erlazionatzen duena. Horrela, geroko azterketetan mikrobio-dentsitatea erraz kalkulatu daiteke absorbantzia neurtzen.

2.18. Fase esponenzialean, *Klebsiella pneumoniae*-ren kultura baten absorbantzia 0,2koa da (600 nm-tan neurtuta). Plaka batean kulturaren 10^{-4} diluzioaren 0,2 ml erein ondoren, 40 kolonia zenbatu dira.

- Kalkulatu kulturaren dentsitatea.
- Kulturaren bolumena 3 ml-koa bada, kalkulatu UKE totalak.
- Absorbantzia 0,5 bada, zeintzuk dira prestatu behar diren diluzioak 100 kolonia zenbatzeko 0,2 ml erein ondoren?

2.19. *Escherichia coli*-ren kultura batetik abiatuta, hainbat esekidura prestatu dira. Esekidura hauen absorbantzia eta dentsitatea (UKE/ml) kalkulatu dira. Lortutako emaitzak taulan agertzen dira:

Esekidura	Absorbantzia (550 nm)	Bakterio/ml
1	0,020	$3,55 \cdot 10^6$
2	0,052	$2,04 \cdot 10^7$
3	0,102	$5,65 \cdot 10^7$
4	0,164	$1,95 \cdot 10^8$
5	0,213	$4,75 \cdot 10^8$
6	0,264	$6,90 \cdot 10^8$

Kultura baten absorbantzia 0,18 balitz, zein izango litzateke esekiduraren dentsitatea?

2.20. Absorbantzia eta dentsitatea (*Klebsiella pneumoniae*/ml) erlazionatzen duen hurrengo ekuazioa lortu da: bakterio/ml = $1,032 \cdot 10^7$ Abs - $2,19 \cdot 10^5$.

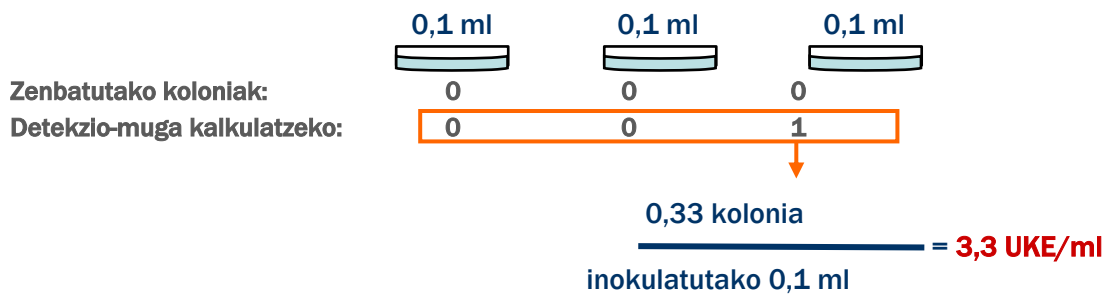
Klebsiella pneumoniae-ren kultura baten alikuota bat hartzen da eta, 10 aldiz diluitu ondoren, absorbantzia neurtzen da 600 nm-tan. Lortutako balorea 0,49 da, zein da kulturaren dentsitatea?

PROBLEMAK EBAZTEKO PROPOSAMENAK

2.1. UKE/ml? Inokulatutako bolumena = 100 µl/plaka

Lagina	Inokulatutako bolumena	Plaka 1	Plaka 2	Plaka 3	UKE/ml
1	10^{-3}	1816	1698	1885	
	10^{-4}	180	159	186	$1,75 \cdot 10^7$
	10^{-5}	16	19	10	
2	10^{-2}	475	477	480	
	10^{-3}	45	48	51	$4,8 \cdot 10^5$
	10^{-4}	5	10	4	
3	10^0	335	328	324	
	10^{-1}	32	28	29	$2,97 \cdot 10^3$
	10^{-2}	5	3	2	

2.2. Unitate Kolonia-Eratzaileen detekzio-muga: 100 µl/plaka, 3 plaka/lagin.



Detekzio-muga: Kolonia bat/3 plaka = 3,3 UKE/ml

Zenbatutako koloniak 0 kolonia/3 plaka = **Detekzio-muga: < 3,3 UKE/ml**

Unitate Kolonia-Eratzaileen detekzio-muga: 100 µl/plaka, 5 plaka/lagin

Detekzio-muga: <2 UKE/ml

2.3. Dentsitatea = $5 \cdot 10^8$ UKE/ml. 0,1 ml/plaka. 50 kolonia, ereindako diluzioa?

$$\frac{50 \text{ kolonia} \times D}{\text{inokulatutako } 0,1 \text{ ml}} = 5 \cdot 10^8 \text{ UKE/ml} \quad \Rightarrow \quad D = 10^6$$

2.4. Mikrotanta (10 µl/tanta). UKE/ml?

Ereindako diluzioa	Zenbaketa 1	Zenbaketa 2	Zenbaketa 3	UKE/ml
10^{-3}	180	159	186	
10^{-4}	16	19	10	$1,5 \cdot 10^7$

2.5. Mikrotanta teknikaren detekzio-muga? 10 µl/tanta, 3 erreplika/lagin (diluzioa).

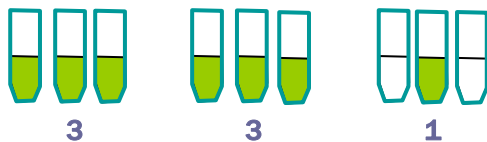
$$\frac{0,33 \text{ kolonia}}{\text{inokulatutako } 0,01 \text{ ml}} = 33,3 \text{ UKE/ml}$$

Detekzio-muga: kolonia bat/3 tanta = 33,3 UKE/ml
 Benetazko kasua: 0 kolonia/3 tanta = **Detekzio-muga: <33,3 UKE/ml**

2.6. ZG. Bakterio-dentsitatea?



Inokulatutako bolumena = ml bat lagin edo diluzio
 Inkubatu 48 ordu 20°C-tan
 Begiratu hazkuntza (uhertasuna)



45 bakterio/ml

2.7. ZG. Detekzio-muga?



Benetazko kasua (hodi positiboak):
 Detekzio-mugaren kasua:

0	0	0
1	0	0

0,3 bakterio/ml

Detekzio-muga <0,3 bakterio/ml

2.8. ZG. Mikroorganismoak?

Prozedura	Emaitza*		
62,5 g tarta + 187,5 ml ur-peptona	H	H	H
10 ⁻¹ diluzioa	H	H	M
10 ⁻² diluzioa	H	M	M
10 ⁻³ diluzioa	M	M	M

*M = Morea = Hazkuntzarik ez; H = Horia = Laktosaren hartzidura

Hodien irakurketa = 321 = 15 mikroorganismo

Diluzioa = 62,5/250 = 1:4

ZG = 15 x 4 = 60 bakterio Gram - Lak+/g

2.9. Legamien esekidura. Diluitu 1.000 aldiz. Ganberaren faktorea = $0,25 \cdot 10^{-6}$ ml/lauki.
legamia/ml?

Lauki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Legamiak	12	14	12	11	12	14	15	12	9	11	12	14	15	10	11	9	10	11	12	14

$$\frac{12 \text{ legamia/lauki}}{0,25 \cdot 10^{-6} \text{ ml/lauki}} \times 1.000 = 4,8 \cdot 10^{10} \text{ legamia/ml}$$

2.10. Kontaketa-ganbera. Zenbatutako laukiak = 20. Faktorea = $1,5 \cdot 10^5$ lauki/ml.
Detekzio-muga?

Benetazko kasua (zelula/lauki):

0

Detekzio-mugaren kasua:

zelula bat/20 lauki

$$\text{Zelula bat/20 lauki} \times 1,5 \cdot 10^5 \text{ lauki/ml} = 7,5 \cdot 10^3 \text{ legamia/ml}$$

Detekzio-muga $< 7,5 \cdot 10^3$ legamia/ml

2.11. Epifluoreszentzia mikroskopioa. Iragazitako bolumena = 100 μ l. Faktorea = 30.954 eremu/iragazki.
Bakterio-dentsitatea?

Eremu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Bakterioak	15	12	11	9	21	16	13	13	15	20	22	13	14	12	18	17	9	22	18	18

$$\frac{15,4 \text{ bakterio/eremu} \times 30.954 \text{ eremu/iragazki}}{0,1 \text{ ml/iragazki}} = 4,77 \cdot 10^6 \text{ bakterio/ml}$$

Iragazitako bolumena = 1 ml. 10^{-2} diluzioa. Faktorea = 30.954 eremu/iragazki. Bakterio-dentsitatea?

$$\frac{15,4 \text{ bakterio/eremu} \times 30.954 \text{ eremu/iragazki} \times 100}{1 \text{ ml/iragazki}} = 4,77 \cdot 10^7 \text{ bakterio/ml}$$

2.12. Epifluoreszentzia mikroskopioa. Faktorea = 64.761,9 eremu/iragazki.

Lagina	Iragazitako bolumena	Diluzioa	Bakterio/eremu	Bakterio/ml
1	1 ml	Lagina	25/32/31/30/35/21/14/21/21/20	$1,62 \cdot 10^6$
2	100 μ l	10^0	22/22/21/22/23/23/21/17/21/21	$1,38 \cdot 10^7$
3	50 μ l	10^{-1}	23/23/22/21/23/24/15/31/24/24	$2,98 \cdot 10^8$
4	100 μ l	10^{-2}	6/8/11/9/13/7/7/8/9/11	$5,76 \cdot 10^8$

2.13. Epifluoreszentzia mikroskopioa. Iragazitako bolumen maximoa = 5 ml. Faktorea = 34.520 eremu/iragazki. 30 eremu

Egiazko kasua (zelula/eremu): 0

Detekzio-mugaren kasua: zelula bat/30 eremu



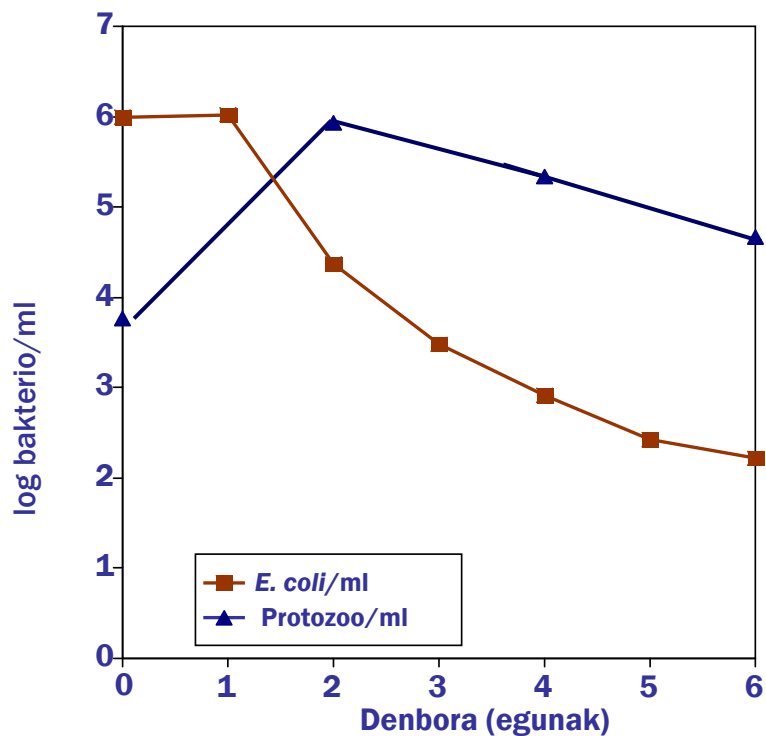
$$\frac{\text{Bakterio bat/30 eremu} \times 34.520 \text{ eremu/iragazki}}{5 \text{ ml/iragazki}} = 230 \text{ bakterio/ml}$$

Detekzio-muga < 230 bakterio/ml

2.14. Zer eragina dute protozoo flagelatuak *E. coli*-ren biziraupenean? (Faktorea = 64761,9)

Denbora (egunak)	DI	Ereindako bolumena (µl)	Kolonia/plaka	UKE/ml	DI	Iragazitako bol. (ml)	flagelatu/eremu	Flagelatu/ml
0	10 ⁻³	100	96/96/108	10 ⁶	L	40	4/6/6/5/4/1/1/3/4/5 6/4/4/3/1/2/1/4/4/3	5,75 10 ³
1	10 ⁻³	100	106/111/98	1,05 10 ⁶				
2	10 ⁻¹	100	240/216/248	2,35 10 ⁴	10 ⁻¹	5	8/7/6/7/8/8/5/5/7/8 8/7/7/5/5/7/8/3/7/5	8,48 10 ⁵
3	M*	100	315/296/298	3,03 10 ³				
4	M	100	88/76/78	8,07 10 ²	10 ⁻¹	20	3/4/3/3/0/3/4/1/4/2 0/0/2/4/3/6/7/7/6/4	1,07 10 ⁵
5	M	1000	265/267/281	271				
6	M	1000	166/166/168	166,67	10 ⁻¹	40	4/4/3/4/5/0/0/3/4/3 3/2/4/4/2/1/0/6/4/2	4,70 10 ⁴

L = lagina



2.15. Epifluoreszentzia mikroskopioa. Iragazitako bolumena? Diluzioa?

$$\frac{25 \text{ bakterio/eremu} \times 20.000 \text{ eremu/iragazki}}{V \text{ ml/iragazki}} = 4 \cdot 10^8 \text{ bakterio/ml}$$

$$V = 1,25 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \quad \Longrightarrow \quad V = 1,25 \text{ ml} \quad D = 10^3$$

2.16. 10^{-3} diluzioaren 20 ml

- 10^{-1} diluzioa = ml bat lagin + 9 ml diluitzaile
- 10^{-2} diluzioa = 10^{-1} diluzioaren ml bat + 9 ml diluitzaile
- 10^{-3} diluzioa = 10^{-2} diluzioaren 2 ml + 18 ml diluitzaile

UKE/ml?

$$\frac{125 \text{ kolonia} \times 10^3}{5 \text{ ml}} = 2,5 \cdot 10^4 \text{ UKE/ml}$$

Bakterio/ml? Bakterio/eremu = 14,9 (batezbestekoa)

$$\frac{14,9 \text{ bakterio/eremu} \times 1.920 \times 10^3}{10 \text{ ml}} = 2,86 \cdot 10^6 \text{ bakterio/ml}$$

2.17. Gram negatibo kultibagarrien portzentajea?

$$\frac{22,7 \text{ bakterio/eremu} \times 15.000 \times 10^2}{2 \text{ ml}} = 1,7 \cdot 10^7 \text{ bakterio/ml}$$

$$\frac{[172,33 \text{ (Lak+)} + 75,33 \text{ (Lak-)}] \text{ kolonia} \times 10^3}{0,1 \text{ ml}} = 2,48 \cdot 10^6 \text{ UKE Gram -/ml}$$

14,59 %

2.18. Kulturaren dentsitatea?

$$\frac{40 \text{ kolonia} \times 10^4}{0,2 \text{ ml}} = 2 \cdot 10^6 \text{ UKE/ml}$$

UKE 3 ml-tan?

$$2 \cdot 10^6 \text{ UKE/ml} \times 3 \text{ ml} = 6 \cdot 10^6 \text{ UKE}$$

Diluzioa?

0,2 Abs ————— 2 10⁶ UKE/ml

0,5 Abs ————— 5 10⁶ UKE/ml

$$\frac{100 \text{ kolonia X D}}{0,2 \text{ ml}} = 5 \cdot 10^6 \text{ UKE/ml}$$

$$D = 10^{-4}$$

2.19. Esekiduraren dentsitatea? Absorbantzia (550 nm) = 0,18

Esekidura	Absorbantzia (550 nm)	Bakterio/ml	Log bakterio/ml
1	0,020	3,55 10 ⁶	6,55
2	0,052	2,04 10 ⁷	7,31
3	0,102	5,65 10 ⁷	7,75
4	0,164	1,95 10 ⁸	8,29
5	0,213	4,75 10 ⁸	8,68
6	0,264	6,90 10 ⁸	8,84

$$\text{Log bakterio/ml} = 8,982 \text{ Abs} + 6,683 \quad (r = 0,97)$$

$$1,994 \cdot 10^8 \text{ bakterio/ml}$$

2.20. *Klebsiella pneumoniae*. Bakterio/ml = 1,032 10⁷ Abs – 2,19 10⁵.

Absorbantzia = 0,49; dentsitatea?

$$N^{\circ} \text{ bakterio/ml} = 1,032 \cdot 10^7 \cdot 0,49 - 2,19 \cdot 10^5$$

$$4,84 \cdot 10^6 \text{ bakterio/ml}$$