

# MÉTODOS BÁSICOS DE ENUMERACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS

ACTIVIDADES. SOLUCIONES PROPUESTAS



Inés Arana, Maite Orruño

Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

## Soluciones propuestas a Autoevaluación

Pregunta	Tema 1	Tema 2	Tema 3	Tema 4
1	c	c	c	a
2	e	a	c	c
3	c	b	a	c
4	b	b	b	c
5	a	c	a	b
6	b	c	b	b
7	a	a	a	a
8	c	b	b	b
9	a	c	a	a
10	c	b	a	b
11	c	c	b	a
12	b	b	c	b
13	a	b	b	c
14	c	c	b	b
15	c	c	c	b
16	a	a	a	a
17	c	a	b	b
18	c	a	a	b
19	b	a	c	-
20	a	c	c	-

## Proyecto general I

Caracterización microbiológica de un río, periodo anual. Las poblaciones bacterianas que se determinarán serán: bacterias totales, quimioorganotrofas y *Escherichia coli*.

**Subproyecto 1 (Tema 1):** El río a estudio, tras recorrer 5 km desde su nacimiento sin pasar cerca de ninguna población reseñable, atraviesa una pequeña ciudad que cuenta con una depuradora de aguas residuales que vierte las aguas tratadas al río. 9 km más abajo del origen, transcurre por una zona ganadera. A partir de ahí hasta la desembocadura, 20 km desde el nacimiento, no hay poblaciones ni actividades reseñables. El área de estudio pertenece geográficamente al País Vasco. Con esta información, describa cómo planificaría el estudio microbiológico anual del agua del río, indicando la localización de las estaciones de muestreo que considera oportunas y los criterios que considera para la elección de las mismas, la periodicidad del muestreo. Además, debe seleccionar el recipiente y procedimiento de muestreo, y el transporte de las muestras al laboratorio.

**Propuesta:** Situar una zona de muestreo al menos (P) en cada uno de los puntos que muestran una actividad/característica reseñable y realizar un estudio anual (1 muestra/mes): *El río a estudio, tras recorrer 5 km desde su nacimiento (P1) sin pasar cerca de ninguna población reseñable, atraviesa una pequeña ciudad (P2, antes del municipio) que cuenta con una depuradora de aguas residuales que vierte las aguas tratadas al río (P3, tras la depuradora). 9 km más abajo del origen, transcurre por una zona ganadera (P4, punto intermedio antes de la zona ganadera y P5 tras su paso). A partir de ahí hasta la desembocadura, 20 km desde el nacimiento, no hay poblaciones ni actividades reseñables (P6, P7,...). El área de estudio pertenece geográficamente al País Vasco (considerar las épocas lluviosas, no muestrear inmediatamente después de una tormenta o de un periodo de temperaturas extremadamente elevadas, etc.). Además, debe seleccionar el recipiente y procedimiento de muestreo, y el transporte de las muestras al laboratorio (botella de vidrio [la más recomendable] o de plástico esterilizables y con tapón de rosca que asegure cierre hermético. Procedimiento de muestreo en función del acceso al cauce: directo o utilizar un cubo de recogidas. Importante: medir la temperatura *in situ*.*

**Subproyecto 2 (Temas 3 y 4):** Describa los métodos de enumeración a utilizar. En el caso de cuantificación de bacterias cultivables, quimioorganotrofas y *Escherichia coli*, indique el medio de cultivo seleccionado, composición y método de elaboración.

**Propuesta:** Lo más básico, enumeración del número total de bacterias/microorganismos utilizando microscopia de epifluorescencia. En caso de cuantificar bacterias quimioorganotrofas, preparación de diluciones decimales seriadas y siembra de varias diluciones por triplicado en Agar Nutriente; para *E. coli*, podría utilizarse un Agar selectivo/diferencial adecuado (Agar McConkey, Agar EMB).

**Subproyecto 3 (Tema 2):** Indique los métodos de control de microorganismos que utilizará para la esterilización de los muestreadores seleccionados, los medios de cultivo elaborados, el material necesario para sembrar las muestras, los diluyentes y, finalmente, la retirada del material contaminado.

**Propuesta:** El método más generalizado, esterilización en autoclave; pero debe revisarse en función de las elecciones previas.

## Proyecto general II

Un compañero de laboratorio le presta 500 placas de agar MacConkey que usted necesita para un experimento y usted acepta el préstamo encantado, pero no confía mucho en la calidad del medio de cultivo. ¿Cómo llevaría a cabo el control de calidad?. ¿Cómo comprobaría que el medio está estéril y en buenas condiciones?.

**Propuesta:** Seleccionar unas 20 placas del lote e incubarlas a 28-30°C durante unos 4 días. Además, sembrar una bacteria Gram positiva (p.e. *Micrococcus luteus*) como control de crecimiento negativo y otra Gram negativa (p.e. *E. coli*, control de crecimiento positivo). Podemos utilizar dos *E. coli* diferentes para verificar la utilización fermentativa de la lactosa, p.e. *E. coli* fermentadora o lactosa positiva y otra no fermentadora o lactosa negativa). Incubar a temperatura adecuada y verificar los resultados.

## Proyecto general III

Al acercarse la apertura de la Temporada de Baños, nuestro Jefe de Laboratorio nos pide que elaboremos una Plan de Muestreo y Análisis de Piscinas del Gran Bilbao.

Le presentamos el siguiente Plan de Trabajo Semanal:

### Día 1

- Recoger varias muestras de agua (a distintas profundidades, a distintas horas, etc) pero únicamente de la piscina más grande del Gran Bilbao. Volumen de muestra a recoger: 300 ml de muestra. **Error: debe recogerse en todas las piscinas. Zona central si es posible, o un par de puntos en función del tamaño. No tiene sentido muestrear a profundidades diferentes. Añadir neutralizante del cloro.**

- Material para la recogida de muestras: botellas de vidrio de boca ancha y cierre hermético previamente esterilizadas.

- Para facilitar el transporte al laboratorio, transferir las muestras recogidas a bolsas de plástico con cierre hermético previamente esterilizadas. **Error: la botella de muestreo es el recipiente más adecuado para el transporte.**

- Rotular cada muestra con un rotulador de vidrio adjudicándole una referencia que se anota en el informe del muestreo. En este informe, para cada referencia anotaremos localización, hora, y otros detalles de interés.

- Transporte refrigerado (4°C en nevera).

- Al llegar al laboratorio, visto el número de muestras recogidas, se decide la cantidad de medio de cultivo a elaborar. **Error: el medio de cultivo debe estar ya preparado en cantidad suficiente para realizar el estudio. Todo el material necesario debe estar disponible.**

- Las muestras se guardan refrigeradas a 4°C

### Día 2

- Elaboración de los medios de cultivo. **Error.**

### Día 3

- Esterilización de los medios de cultivo. **Error: esterilizar inmediatamente tras elaboración en aquellos medios que lo precisen, la mayoría.**

- Realización de los análisis (siembra e incubación). **Error.**

#### **Día 4**

.....

Visto el Plan de Muestreo y Análisis de Piscinas del Gran Bilbao que le presentamos, nuestro Jefe decide no seguir leyendo y despedirnos. ¿Cuáles pueden ser los motivos? Indique en cada punto si es o no erróneo y la razón.

## Proyecto general IV

¿Qué procedimiento, método o técnica utilizaría para eliminar/controlar, en la medida de lo posible, los microorganismos presentes en los siguientes materiales sin que éstos resulten dañados? Razone su respuesta.

Material	Método	Razón
Matraz que contiene medio de cultivo. El extracto de levadura forma parte de la receta del medio	Autoclave: 1,1 atm 15 min.	Medio de cultivo para el que no se indica presencia de compuesto termolábil.
Pipetas de vidrio	Estufa de esterilización	Deben empaquetarse convenientemente. El vidrio es resistente.
Tubos de centrifuga de plástico vacíos	Autoclave	Los plásticos actuales son resistentes
Solución de penicilina (concentración: 128 mg/l).	Filtración	Termolábil
Aire que circula en una cámara de siembra.	Filtración	Aire (material gaseoso)
Tubos de vidrio en los que se han realizado diluciones de muestras.	Autoclave: 1,1 atm 15 min.	Material de desecho en recipiente resistente
Superficie de la mesa de trabajo.	Desinfectante (lejía, etanol)	Superficie inanimada de gran tamaño
Zumo	Pasteurización	Componentes sensibles al calor (gran cantidad de azúcares)
Asa de siembra metálica	Incineración	Material orgánico a eliminar
Agua de bebida	Desinfectante (hipoclorito sódico)	Inanimado