

# **COMO ABORDAR Y RESOLVER ASPECTOS PRÁCTICOS DE MICROBIOLOGÍA**

## **1. DILUCIONES Y CONCENTRACIONES. MUESTRAS LÍQUIDAS Y SÓLIDAS**



Inés Arana, Maite Orruño e Isabel Barcina

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

# 1. DILUCIONES Y CONCENTRACIONES. MUESTRAS LÍQUIDAS Y SÓLIDAS

Es un hecho que en la mayoría de los ambientes, la densidad microbiana suele ser demasiado elevada o baja para poder realizar una siembra directa de la muestra que de buenos resultados en la enumeración de microorganismos. Esta situación hace necesaria la dilución o la concentración de la muestra previa a la realización de cualquier estudio. Además, las muestras sólidas requieren su dilución para facilitar la manipulación y permitir trabajar con ellas como si fueran muestras líquidas.

En la mayoría de los casos, se trabaja con diluciones decimales. El caso más sencillo es la preparación de 10 ml de la dilución 1/10 de la muestra. Para ello, se añade 1 ml de muestra a 9 ml de diluyente; es decir de cada 10 ml de esta dilución 1/10, 1 ml corresponde a la muestra. Expresándolo mediante una ecuación:

$$\text{Dilución } 1/10 = \frac{1 \text{ ml Muestra}}{1 \text{ ml Muestra} + 9 \text{ ml Diluyente}} \Rightarrow 10 \text{ ml de dilución } 1/10 \text{ ó } 10^{-1}$$

Se pueden preparar diluciones sucesivas. Por ejemplo, si se requiere la dilución 1/100, ó expresado de otro modo la dilución  $10^{-2}$ , a partir de esta dilución 1/10, se elaboraría de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{Dilución } 1/100 = \frac{1 \text{ ml Dilución } 10^{-1}}{1 \text{ ml Dilución } 10^{-1} + 9 \text{ ml Diluyente}} \Rightarrow 10 \text{ ml de dilución } 1/100 \text{ ó } 10^{-2}$$

O bien directamente,

$$\text{Dilución } 1/100 = \frac{1 \text{ ml Muestra}}{1 \text{ ml Muestra} + 99 \text{ ml Diluyente}} \Rightarrow 100 \text{ ml de dilución } 1/100 \text{ ó } 10^{-2}$$

$$\text{Dilución } 1/100 = \frac{0,1 \text{ ml Muestra}}{0,1 \text{ ml Muestra} + 9,9 \text{ ml Diluyente}} \Rightarrow 10 \text{ ml de dilución } 1/100 \text{ ó } 10^{-2}$$

Nota: El volumen final obtenido viene dado por el denominador de la ecuación.

Con estas nociones, se deben **proponer soluciones** para los problemas siguientes:

1.1. ¿Cómo se preparan 250 ml de la dilución  $10^{-1}$  a partir de una muestra de agua?

1.2. Queremos preparar 10 ml de la dilución  $10^{-5}$  en 3 únicos pasos, ¿cómo lo haría?

- 1.3. Se requiere la dilución  $10^{-6}$  de una muestra de agua, pero se dispone únicamente de 3 tubos vacíos estériles y de 30 ml de solución salina (diluyente) estériles ¿Cómo se prepararía esa dilución?  
¿Y si tuviéramos 6 tubos Eppendorff (volumen hasta 1 ml) pero únicamente 10 ml de solución salina?
- 1.4. Se necesitan preparar 150 ml de dilución  $10^{-1}$  de una muestra de agua. Realizar un esquema claro y detallado de los pasos que se deben llevar a cabo, volúmenes transferidos, etc.  
¿Y si se tuvieran que preparar 150 ml de dilución  $10^{-3}$ ?
- 1.5. A partir de una muestra de agua, ¿cómo se elaboran las diluciones: 1/10; 1/5; 1/4; 1/2?

En el caso de **muestras sólidas**, se debe sustituir ml de muestra por g de muestra:

$$\text{Dilución } 1/10 = \frac{1 \text{ g Muestra}}{1 \text{ g Muestra} + 9 \text{ ml Diluyente}} \Rightarrow 10 \text{ ml de dilución } 1/10 \text{ ó } 10^{-1}$$

- 1.6. Se pesan 1,5 g de alimento, se añaden 13,5 ml de Solución Ringer (diluyente) y se homogeniza, ¿cuál es la dilución de trabajo?
- 1.7. Con el fin de determinar la densidad microbiana en un yogur, se requiere la dilución  $10^{-2}$ . Indicar los pasos a seguir y detallar como se prepara esa dilución.
- 1.8. A partir de una muestra de agua ¿Cómo prepararía 500 ml de la dilución  $10^{-1}$ ? Expliqué la elaboración del mismo volumen de dicha dilución pero partiendo de una muestra sólida, por ejemplo, una muestra de suelo.

Como ya se ha indicado, en ocasiones, debido a la baja densidad de microorganismos, es preciso **concentrar** la muestra mediante filtración o centrifugación. Este hecho requiere que para su manipulación posterior, los filtros o los pellets obtenidos se resuspendan en un volumen determinado de diluyente. En este caso es preciso determinar el **factor de concentración** con el que se trabaja. Por ejemplo:

$$\text{Facto de concentración} = \frac{10 \text{ ml Muestra filtrados}}{1 \text{ ml Diluyente}} \Rightarrow 1 \text{ ml de concentrado } 10X$$

- 1.9. Se filtran 100 ml de una muestra de agua. El filtro se resuspende en 10 ml solución salina y se agita vigorosamente. ¿Cuál es el factor de concentración?

1.10. 100 ml de una suspensión microbiana densa se centrifugan a 5.000 r.p.m. Se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende tras la adición de 2,5 ml de diluyente. ¿Cuál es el factor de concentración?

No sólo es necesario saber diluir o concentrar una muestra, también se debe entender cómo **aplicar correctamente los factores de dilución o de concentración** para establecer la densidad microbiana de una muestra. A continuación se plantean algunos problemas basados en la enumeración de microorganismos mediante el método de conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{A colonias enumeradas}}{\text{B ml sembrados}} \times \text{Factor de dilución}$$

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{A colonias enumeradas}}{\text{B ml sembrados}} \times \frac{1}{\text{Factor de concentración}}$$

1.11. Tras preparar las siguientes diluciones: 1/10; 1/5; 1/4; 1/2 a partir de diferentes muestras, se siembra 1 placa por dilución, inoculando en cada caso 0,1 ml por placa. Tras la incubación, en todos los casos se obtienen 27 colonias por placa, ¿cuales son las densidades microbianas de las diferentes muestras?

1.12. A partir de una muestra de agua, se prepara la dilución  $10^{-3}$ . 2 ml de esta dilución se transfieren a un tubo que contiene 8 ml de diluyente, se agita y 0,5 ml se siembran en la superficie de una placa con medio nutritivo. Si, tras la incubación, se enumeran 50 colonias, ¿cuál es la densidad microbiana de la muestra?

1.13. A partir de una muestra de agua, se transfieren 4 ml a un tubo que contiene 4 ml de diluyente. Se siembran 0,5 ml en la superficie de una placa con medio nutritivo. Si, tras la incubación, se obtienen 82 colonias, ¿cual es la densidad microbiana de la muestra?

1.14. Se recoge una muestra de un alimento sólido y se sigue el siguiente protocolo de siembra:

- Pesar 15 g de alimento y añadir 135 ml de Solución Ringer. Homogeneizar.
- 2 ml del homogeneizado se pipetea a un vial que contiene 18 ml de diluyente. Homogeneizar.
- 0,2 ml de esta última suspensión se siembran en una placa de Agar Nutritivo. Incubar.
- Se cuentan 100 colonias.
- A partir de esta información, ¿cual es el número de microorganismos por gramo de alimento?

- 1.15. ¿Cómo se prepararía la dilución 1/5 a partir de una muestra de sedimento? ¿Y la dilución 1/8? Si tras sembrar 0,5 ml en una placa y, posterior, incubación, se obtienen 120 colonias. ¿Cual es la densidad microbiana expresada como N° de microorganismos cultivables/100 g de sedimento?
- 1.16. 20 g de sedimento se resuspenden en 40 ml de solución salina. Se agita vigorosamente y se sonica para separar las bacterias de las partículas de sedimento. 10 ml de la suspensión resultante se centrifugan a velocidad baja (sedimentación de partículas > 3 µm). Se recoge el sobrenadante y se diluye 1.000 veces. 0,2 ml de esta dilución se siembra en profundidad en Agar Nutritivo. Al finalizar el periodo de incubación se obtienen 126 colonias. ¿Número de bacterias cultivables por g de sedimento?
- 1.17. Tras filtrar 50 ml de una muestra de agua y resuspender el filtro en 10 ml de solución salina, se agita vigorosamente. 0,1 ml de esta suspensión se siembran en una placa de Agar Nutriente. Tras la incubación se cuentan 50 colonias. ¿Cuál es la densidad microbiana de la muestra?
- 1.18. Se filtran 50 ml de una muestra de agua. El filtro se resuspende en 15 ml solución salina y se agita vigorosamente. A partir de esta dilución se preparan 2 diluciones sucesivas: 1/10 y 1/2. 0,2 ml de la dilución final resultante se siembran en una placa de Agar Nutriente. Tras la incubación se cuentan 35 colonias. ¿Cuál es la densidad microbiana de la muestra?
- 1.19. Se va a realizar un estudio para valorar la calidad microbiológica de las aguas de la ría de Bilbao. Para ello se enumerarán las bacterias heterotrofas aerobias (BHA) presentes. Se decide realizar diluciones decimales y sembrar una placa de Agar Nutriente por dilución a razón de 100 µl por placa. Sabiendo, tras consultar la bibliografía relacionada, que la densidad de BHA oscila entre  $5 \cdot 10^7$  y  $7 \cdot 10^8$  bacterias/ml, ¿qué diluciones deberíamos sembrar?
- 1.20. Se va a realizar un estudio para determinar la presencia de bacterias reductoras de sulfato (BRS) en los sedimentos de la ría de Bilbao. El sedimento recogido se tratará añadiendo 10 ml de diluyente por cada 2 g de sedimento y se homogeneizará. Posteriormente, a partir de esta suspensión se realizarán diluciones decimales y se sembrará una placa de medio de cultivo adecuado por dilución a razón de 100 µl por placa. Sabiendo, tras consultar la bibliografía relacionada, que en ambientes similares, la densidad media de BRS es de  $5 \cdot 10^4$  BRS/ml, ¿qué diluciones deberíamos sembrar?

# PROPUESTAS DE RESOLUCIÓN

1.1. 250 ml de la dilución  $10^{-1}$

**25 ml**

**MUESTRA**

**225 ml**

**25 ml Muestra / (25 ml Muestra + 225 ml Diluyente)**

1.2. 10 ml de la dilución  $10^{-5}$  en 3 únicos pasos.

**1 ml**      **0,1 ml**      **0,1 ml**

**MUESTRA**

**9 ml**      **9,9 ml**      **9,9 ml**

**$10^{-1}$**   
**1/10**

**$10^{-3}$**   
**1/10 x 1/100**  
**1/1.000**

**$10^{-5}$**   
**1/1.000 x 1/100**  
**1/100.000**

Podemos proponer otras opciones, por ejemplo:

**0,1 ml**      **0,1 ml**      **1 ml**

**MUESTRA**

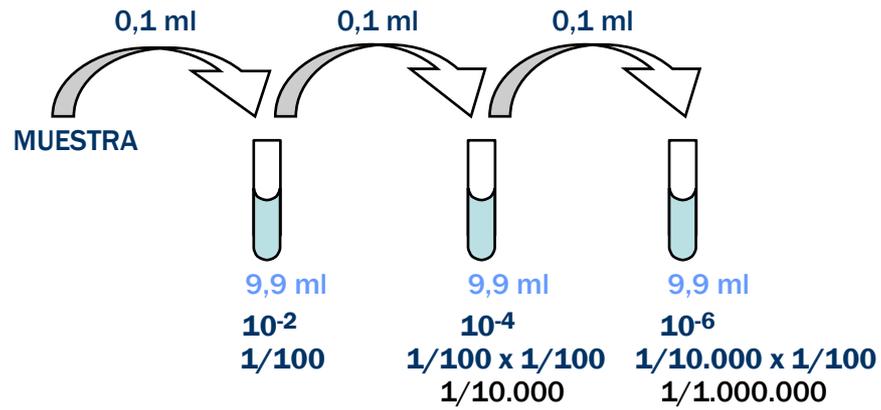
**9,9 ml**      **9,9 ml**      **9 ml**

**$10^{-2}$**   
**1/100**

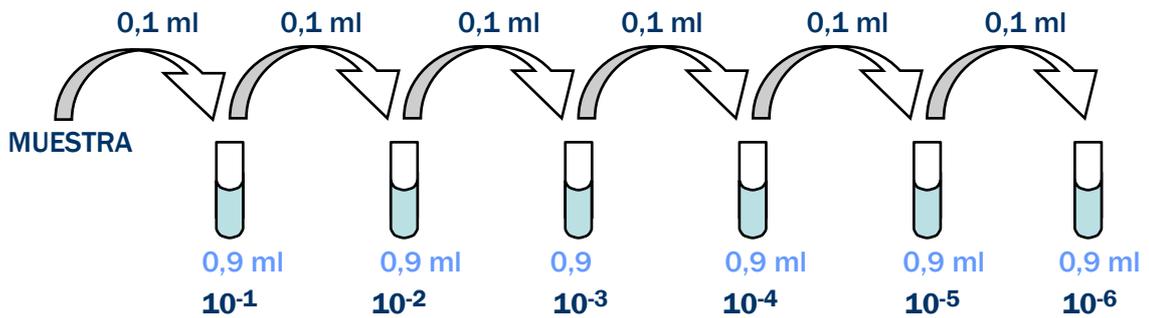
**$10^{-4}$**   
**1/100 x 1/100**  
**1/10.000**

**$10^{-5}$**   
**1/10.000 x 1/10**  
**1/100.000**

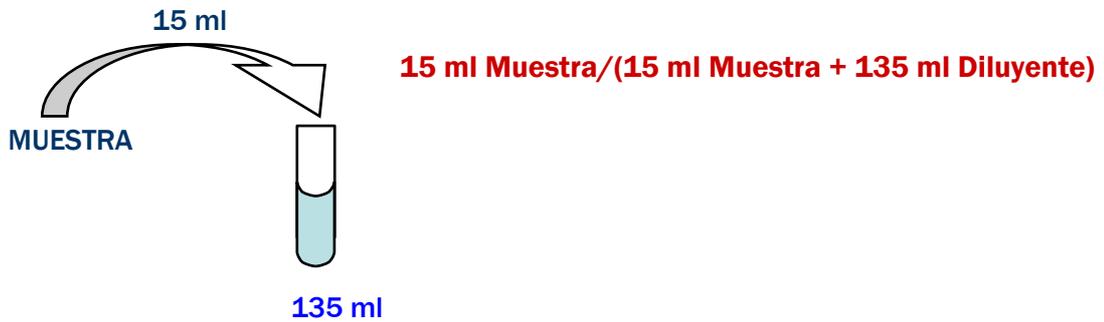
1.3. Dilución  $10^{-6}$ . Se dispone únicamente de 3 tubos vacíos estériles v de 30 ml de diluyente.



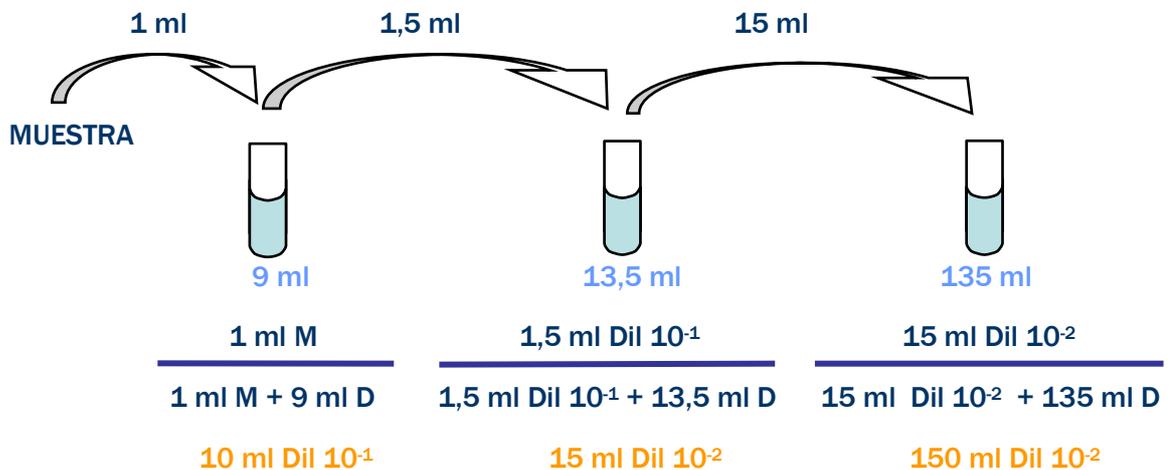
Dilución  $10^{-6}$ . Se dispone de 6 tubos Eppendorff (1 ml) y de 10 ml de solución salina.



1.4. 150 ml de la dilución  $10^{-1}$ .



150 ml de dilución  $10^{-3}$



1.5. ¿Cómo se elaboran las diluciones: 1/10; 1/5; ¼; ½?

$$\mathbf{1/10 = 1 \text{ ml Muestra}/(1 \text{ ml Muestra} + 9 \text{ ml Diluyente)}$$

$$\mathbf{1/5 = 1 \text{ ml Muestra}/(1 \text{ ml Muestra} + 4 \text{ ml Diluyente)}$$

$$\mathbf{1/4 = 1 \text{ ml Muestra}/(1 \text{ ml Muestra} + 3 \text{ ml Diluyente)}$$

$$\mathbf{1/2 = 1 \text{ ml Muestra}/(1 \text{ ml Muestra} + 2 \text{ ml Diluyente)}$$

1.6. 1,5 g de alimento + 13,5 ml de diluyente. ¿Dilución?

$$\mathbf{1,5 \text{ g Muestra}/(1,5 \text{ g Muestra} + 13,5 \text{ ml Diluyente}) = 1,5/15 = 1/10}$$

1.7. ¿Dilución 10<sup>-2</sup>? Sólido = yogur.

$$\mathbf{1/10 = 1 \text{ g Yogur}/(1 \text{ g Yogur} + 9 \text{ ml Diluyente)}$$

$$\mathbf{1/100 = 1 \text{ ml Dilución } 10^{-1}/(1 \text{ ml Dilución } 10^{-1} + 9 \text{ ml Diluyente)}$$

Podemos proponer otras opciones, por ejemplo:

$$\mathbf{1/100 = 1 \text{ g Yogur}/(1 \text{ g Yogur} + 99 \text{ ml Diluyente)}$$

1.8. ¿500 ml de dilución 10<sup>-1</sup>? Muestra líquida

$$\mathbf{1/10 = 50 \text{ ml Muestra}/(50 \text{ ml Muestra} + 450 \text{ ml Diluyente)}$$

¿500 ml de dilución 10<sup>-1</sup>? Muestra sólida

$$\mathbf{1/10 = 50 \text{ g Muestra}/(50 \text{ g Muestra} + 450 \text{ ml Diluyente)}$$

1.9. 100 ml filtrados y resuspendidos en 10 ml de diluyente. ¿Factor de concentración?

$$\mathbf{100 \text{ ml Muestra}/10 \text{ ml Diluyente} = 10}$$

1.10. 100 ml centrifugados y resuspendidos en 2,5 ml de diluyente. ¿Factor de concentración?

$$\mathbf{100 \text{ ml Muestra}/2,5 \text{ ml Diluyente} = 40}$$

1.11. Diluciones 1/10, 1/5, ¼ y ½. 1 placa/dilución. 0,1 ml inoculados/placa. 27 colonias/placa. ¿UFC/ml?

$$\text{Dilución } 1/10: \frac{27 \text{ colonias} \times 10^1}{0,1 \text{ ml inoculados}} = 2,7 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$$

$$\text{Dilución } 1/5: \frac{27 \text{ colonias} \times 5}{0,1 \text{ ml inoculados}} = 1,35 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$$

$$\text{Dilución } 1/4: \frac{27 \text{ colonias} \times 4}{0,1 \text{ ml inoculados}} = 1,08 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$$

$$\text{Dilución } 1/2: \frac{27 \text{ colonias} \times 2}{0,1 \text{ ml inoculados}} = 5,4 \cdot 10^2 \text{ UFC/ml}$$

1.12. Dilución =  $10^{-3}$

2 ml Muestra + 8 ml Diluyente = Dilución 2/10 = 1/5

Volumen sembrado = 0,5 ml. Colonias/placa = 50 colonias. ¿Microorganismos por ml de muestra?

$$\frac{50 \text{ colonias} \times 10^3 \times 5}{0,5 \text{ ml inoculados}} = 5 \cdot 10^5 \text{ UFC/ml}$$

1.13. 4 ml Muestra + 4 ml Diluyente = Dilución 4/8 = 1/2

Volumen sembrado = 0,5 ml. Colonias/placa = 82 colonias. ¿Microorganismos por ml de muestra?

$$\frac{82 \text{ colonias} \times 2}{0,5 \text{ ml inoculados}} = 328 \text{ UFC/ml}$$

1.14. 15 g Muestra sólida + 135 ml Diluyente = Dilución 15/150 = 1/10

2 ml Dilución 1/10 + 18 ml Diluyente = Dilución 2/20 = 1/10

Volumen sembrado = 0,2 ml. Colonias/placa = 100 colonias. ¿Microorganismos por g de alimento?

$$\frac{100 \text{ colonias} \times 10 \times 10}{0,2 \text{ ml inoculados}} = 5 \cdot 10^4 \text{ UFC/g}$$

1.15. ¿Dilución 1/5 de muestra de sedimento?

**Dilución 1/5 = 1 g sedimento / (1 g sedimento + 4 ml Diluyente)**

¿Dilución 1/8 de muestra de sedimento?

**Dilución 1/8 = 1 g sedimento / (1 g sedimento + 7 ml Diluyente)**

Dilución 1/5. 0,5 ml sembrados/placa. 120 colonias/placa. ¿UFC/g muestra?

$$\frac{120 \text{ colonias} \times 5}{0,5 \text{ ml inoculados}} = 1,2 \cdot 10^3 \text{ UFC/g}$$

Dilución 1/8. 0,5 ml sembrados/placa. 120 colonias/placa. ¿UFC/g muestra?

$$\frac{120 \text{ colonias} \times 8}{0,5 \text{ ml inoculados}} = 1,92 \cdot 10^3 \text{ UFC/g}$$

1.16. ¿20 g sedimento + 40 ml solución salina = 20/60 = Dilución 1/3.

Centrifugar 10 ml. Recoger sobrenadante (10 ml). Diluir 1000 veces.

Sembrar 0,2 ml/placa. 126 colonias/placa. ¿Microorganismos/g sedimento?

$$\frac{126 \text{ colonias} \times 3 \times 10^3}{0,2 \text{ ml inoculados}} = 1,89 \cdot 10^6 \text{ UFC/g}$$

1.17. Filtrar 50 ml. Resuspender en 10 ml. 50/10. Factor de concentración = 5.

0,1 ml/placa. 50 colonias/placa. ¿Microorganismos/ml?

$$\frac{50 \text{ colonias}}{0,1 \text{ ml inoculados} \times 5} = 100 \text{ UFC/ml}$$

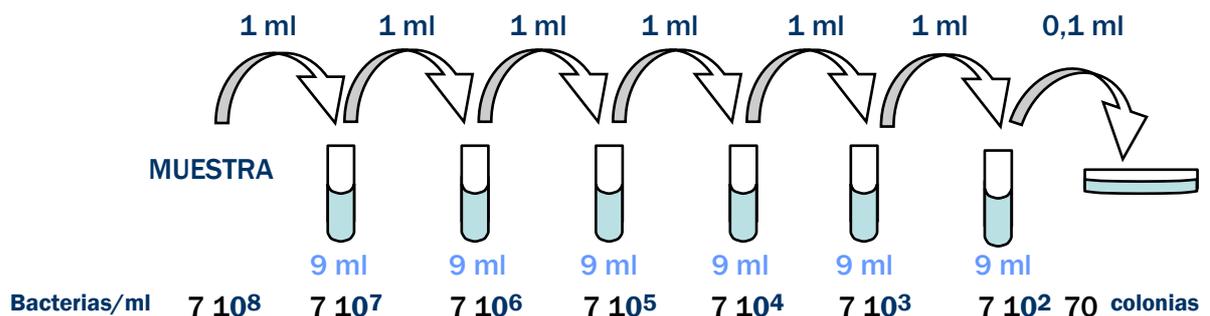
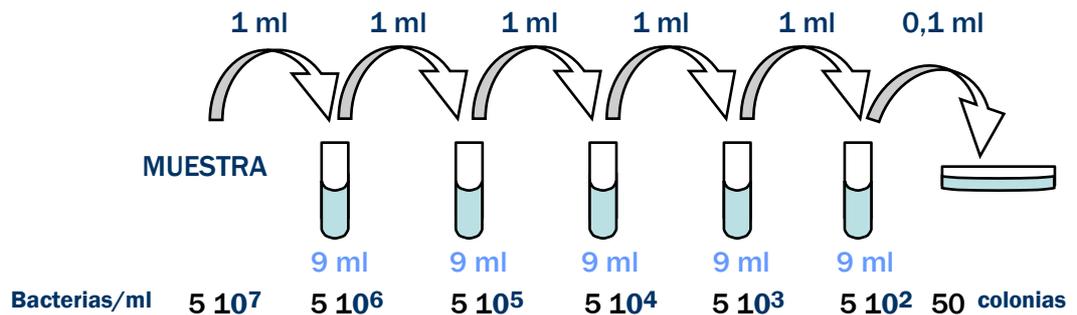
1.18. Filtrar 50 ml. Resuspender en 15 ml. 50/15. Factor de concentración = 3,33.

Preparar diluciones 1/10 y 1/2.

0,2 ml/placa. 35 colonias/placa. ¿Microorganismos/ml?

$$\frac{35 \text{ colonias} \times 10 \times 2}{0,2 \text{ ml inoculados} \times 3,33} = 1,05 \times 10^3 \text{ UFC/ml}$$

1.19.  $5 \times 10^7$  bacterias/ml < bacterias heterotrofas aerobias (BHA) de agua ría de Bilbao <  $7 \times 10^8$  bacterias/ml, Definir las diluciones que permitan enumerar BHA. Sabiendo que para enumerar colonias, los valores ideales se sitúan entre 30 y 300 colonias/placa, calculamos las diluciones.



Diluciones elegidas  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$

**1.20.**  $5 \cdot 10^4$  bacterias/ml = bacterias reductoras de sulfato (BRS) en sedimentos ría de Bilbao Definir las diluciones que permitan enumerar BRS. Sabiendo que para enumerar colonias, los valores ideales se sitúan entre 30 y 300 colonias/placa, calculamos las diluciones<sup>4</sup>

