

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

## **PROPUESTA DE EJERCICIOS**



Inés Arana, Maite Orruño e Isabel Barcina

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

## PROPUESTA DE EJERCICIOS

Proponemos a los alumnos una serie de ejercicios basados en los conceptos desarrollados en los temas 1 a 5 para su resolución siguiendo las pautas que ya hemos comentado.

1. Se estudió el efecto de dos sustancias antimicrobianas agregándolas a un cultivo bacteriano tras una hora de incubación, obteniéndose los siguientes resultados en el recuento por epifluorescencia: (factor del microscopio = 20000 campos/filtro)

**CURVA CONTROL**

T. incubación (min)	Dilución	Volumen filtrado (µl)	Nº bacterias/campo
30	$10^0$	200	35/35/32/33/35/36/36/39/38/36
60	$10^{-1}$	150	14/13/15/14/16/16/17/15/15/18
90	$10^{-2}$	1000	29/30/31/31/33/28/29/30/32/35
120	$10^{-2}$	200	19/19/19/23/22/17/27/18/16/18
150	$10^{-2}$	100	21/24/21/24/27/26/18/31/22/22
180	$10^{-3}$	500	14/25/17/22/14/20/16/14/15/16

**CURVA CON EL ANTIMICROBIANO A**

T. incubación (min)	Dilución	Volumen filtrado (µl)	Nº bacterias/campo
30	$10^0$	200	35/35/32/33/35/36/36/39/38/36
60	$10^{-1}$	150	14/13/15/14/16/16/17/15/15/18
90	$10^{-2}$	900	31/28/28/25/21/26/28/27/22/25
120	$10^{-2}$	900	26/25/27/27/23/21/30/27/25/26
150	$10^{-2}$	900	26/25/27/30/21/23/27/27/25/26
180	$10^{-2}$	900	25/22/25/23/26/21/25/25/28/25

**CURVA CON EL ANTIMICROBIANO B**

T. incubación (min)	Dilución	Volumen filtrado (µl)	Nº bacterias/campo
30	$10^0$	200	35/35/32/33/35/36/36/39/38/36
60	$10^{-1}$	150	14/13/15/14/16/16/17/15/15/18
90	$10^{-2}$	750	20/25/19/28/17/13/23/15/22/20
120	$10^{-2}$	1000	20/22/15/23/13/17/28/19/25/20
150	$10^{-1}$	200	18/15/15/17/16/16/14/15/13/14
180	$10^0$	200	29/30/31/31/33/28/29/30/32/35

¿Qué puedes decir sobre el efecto de cada una de las sustancias?

2. Se recogieron muestras de agua de una playa a 5, 10, 20, 40 y 50 m de profundidad y en el laboratorio se hicieron las siguientes medidas:

- a) Mediante recuento directo con tinción con naranja de acridina, filtramos para cada profundidad 0,5 ml de muestra y contamos al microscopio las bacterias que hay en cada campo de los filtros obteniendo los valores medios indicados en la Tabla. Para hacer los recuentos se utiliza un microscopio con un factor de conversión de 30.954 campos/filtro.
- b) Además y mediante análisis de imagen se miden los volúmenes de las bacterias a las diferentes profundidades obteniendo los biovolúmenes medios indicados en la Tabla.
- c) Por último, y mediante la determinación del peso seco, obtenemos un valor medio de  $2,2 \times 10^{-7}$   $\mu\text{gC}/\mu\text{m}^3$  bacteriano.

Profundidad (m)	Bacterias/campo	Biovolumen ( $\mu\text{m}^3/\text{bact}$ )
5	105	0,52
10	54	0,24
20	30	0,14
40	14	0,071
50	9	0,05

¿Cuál es la densidad de bacterias a las diferentes profundidades analizadas (5, 10, 20, 40 y 50 m)?  
 ¿Qué tipo de relación existe entre la profundidad y el biovolumen y la biomasa bacteriana en el agua de la playa?

3. Se lleva a cabo un estudio en tres ríos. Se cuantifica la densidad de bacterias cultivables, unidades formadoras de colonia (UFC) y la biomasa bacteriana.

Para el recuento de UFC se sembraron, en agar nutritivo, 3 réplicas de 100  $\mu\text{l}$  de diferentes diluciones de las muestras. Los resultados tras la incubación se presentan en la siguiente tabla:

DILUCIÓN	RIO		
	A	B	C
$10^{-2}$	Incontables	500/617/593	363/303/395
$10^{-3}$	357/452/403	53/67/60	35/30/40
$10^{-4}$	35/45/40	5/7/6	4/2/5

Para la determinación de la biomasa se llevaron a cabo recuentos directos mediante microscopia de epifluorescencia previa tinción con naranja de acridina. Así mismo, en estas preparaciones y empleando análisis de imagen, se midió el biovolumen bacteriano. Los resultados se presentan en la siguiente tabla en la cual se indican las diluciones filtradas y el volumen filtrado. El número de campos observados fueron 10 por muestra:

Río	Dilución	Volumen filtrado ( $\mu\text{l}$ )	Recuentos (Bacterias/campo)	Biovolumen ( $\mu\text{m}^3/\text{bacteria}$ )
A	$10^{-1}$	100	30/35/40/25/30/25/33/25/27/30	0,15
B	$10^{-1}$	200	31/25/40/37/20/15/32/26/25/31	0,45
C	100	100	31/33/37/43/23/34/21/19/26/30	0,47

El factor de conversión del microscopio utilizado fue: 30954 campos/filtro, y el factor de conversión del volumen en biomasa fue:  $2,2 \times 10^{-7} \mu\text{gC}/\mu\text{m}^3$ .

¿Qué río presenta la mayor densidad de bacterias cultivables? ¿Cuál es la densidad obtenida en ese caso?

¿Qué río presenta la mayor biomasa bacteriana? ¿Cuáles son los valores máximos de biomasa bacteriana?

4. Realizamos en el laboratorio una curva de crecimiento para el microorganismo X. El método de enumeración de microorganismos/ml a lo largo del tiempo es el método del NMP. Para ello se prepararon series de tres tubos de medio de cultivo por dilución, conteniendo 10 ml de medio cada uno de los tubos y que se sembraron a razón de 1ml de dilución por tubo.

Tras la incubación, el número de tubos positivos (crecimiento) obtenidos para cada tiempo y dilución se indican en la tabla que debe completar haciendo uso de la Tabla de Mac Grady adjunta. ¿Cuál es la densidad del cultivo en fase estacionaria?

Tiempo	Diluciones						N° microorganismos/ml
	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$	
1	3	3	2	1	0	0	
2	3	3	2	2	2	0	
3	3	3	3	1	0	0	
4	3	3	3	2	1	0	
5	3	3	3	2	2	1	
6	3	3	3	3	0	2	
7	3	3	3	3	2	1	
8	3	3	3	3	2	2	
9	3	3	3	3	1	3	

Tabla de MacGrady (1 ml/tubo, 3 tubos/dilución, 3 diluciones consecutivas). Resultado = bacterias/ml

Número	NMP	Número	NMP	Número	NMP
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		

5. El matraz A1 contiene un cultivo de *Escherichia coli* ( $L = 1,5 \mu\text{m}$ ,  $A = 0,5 \mu\text{m}$ ) y el matraz A2, un cultivo de *Staphylococcus aureus* ( $D = 0,5 \mu\text{m}$ ).

Se recogen 0,1 ml del matraz A1 y se transfieren a un matraz B1 que contiene 500 ml de medio de cultivo.

A partir del matraz A2 se transfieren también 0,1 ml a un matraz B2 que contiene 100 ml de caldo de cultivo.

La biomasa obtenida en los matraces B1 y B2 es, en ambos casos, de 0,632 mgC/L

¿Cuál debe ser la densidad celular de los matraces A1 y A2 para que se cumpla esta premisa?

$$F = 126 \cdot 10^{-10} \text{ mgC}/\mu\text{m}^3 \text{ y } B_v = (L - A/3) \pi A^2/4 \text{ ó } B_v = D^3 \pi/6$$

6. Se hace crecer *Kloeckera apiculata* en un medio mínimo (YNB) suplementado con concentraciones crecientes de glucosa. Previamente se determinó la Absorbancia de 10 de suspensiones del microorganismo y su densidad celular y la Absorbancia de 5 suspensiones diferentes y su peso seco. Además, se cuantificó la concentración de glucosa añadida y final para cada una de las curvas de crecimiento realizadas. Los resultados obtenidos fueron los expresados en las tablas. Con estos datos determine la constante específica de velocidad de crecimiento máxima,  $K_s$  y el rendimiento para la glucosa. Represente la curva de crecimiento en base a densidad y a peso seco.

Muestra	Absorbancia	Densidad (Nº células/ml)	Peso seco (mg/ml)
1	0,2306	$1,41 \cdot 10^7$	
2	0,3261	$1,59 \cdot 10^7$	
3	0,3851	$5,17 \cdot 10^7$	
4	0,4146	$7,14 \cdot 10^7$	
5	0,4569	$9,04 \cdot 10^7$	
6	0,8780	$2,08 \cdot 10^8$	
7	0,9080	$5,70 \cdot 10^8$	
8	1,3500	$1,00 \cdot 10^9$	
9	1,5000	$2,15 \cdot 10^9$	
10	1,6220	$2,70 \cdot 10^9$	
11	0,2670		0,023
12	0,4295		0,051
13	0,6128		0,366
14	0,7620		0,543
15	0,8300		0,878

Tiempo (h)	ABSORBANCIA							
	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	0,133	0,137	0,015	0,014	0,018	0,008	0,005	0,013
1	0,133	0,164	0,149	0,016	0,036	0,017	0,012	0,017
2	0,124	0,193	0,027	0,039	0,044	0,041	0,033	0,024
3	0,123	0,197	0,041	0,030	0,052	0,025	0,031	0,027
4	0,114	0,1649	0,061	0,037	0,070	0,051	0,024	0,039
5	0,106	0,166	0,112	0,079	0,110	0,065	0,088	0,087
6	0,123	0,178	0,132	0,142	0,181	0,074	0,125	0,130
7	0,136	0,165	0,188	0,194	0,252	0,105	0,195	0,203
8	0,127	0,182	0,198	0,238	0,332	0,120	0,232	0,234
24	0,112	0,203	0,159	0,298	0,294	0,437	0,423	0,662
<b>S teórico (mg/ml)</b>	0,000	0,100	0,200	0,400	0,600	0,800	1,000	2,000
<b>S inicial (mg/ml)</b>	0,0017	0,1000	0,1890	0,590	0,619	0,814	1,033	2,2325
<b>S final (mg/ml)</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0080	0,0000	0,0000	0,0000

*\*Datos reales obtenidos en prácticas.*

7. Al inicio de una curva de crecimiento, la densidad celular del matraz de estudio es de  $2 \cdot 10^4$  células/ml. El volumen de medio de este matraz es 500 ml. La inoculación de este matraz se ha realizado transfiriendo 100  $\mu$ l de una suspensión celular que contiene  $10^{10}$  células/ml. ¿Qué diluciones hemos tenido que preparar para conseguir esa densidad celular inicial?
8. Tenemos un matraz (A) que contiene 250 ml de caldo nutritivo. Este matraz se inocula con una suspensión de *Escherichia coli* y se incuba en condiciones adecuadas. Periódicamente, se recogen muestras que se preparan para realizar recuentos mediante microscopia de epifluorescencia. En todos los casos el volumen de muestra filtrado fue 100  $\mu$ l y el factor del microscopio fue 20.000 campos/filtro. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tiempo (h)	Recuentos
0	Dilución = muestra Células/campo = 8/14/13/9/7/11/15/11/12/15
1	Dilución = muestra Células/campo = 26/31/28/25/27/21/25/19/22/19
2	Dilución = $10^{-1}$ Células/campo = 8/9/8/15/7/9/8/11/9/5
3	Dilución = $10^{-1}$ Células/campo = 23/21/28/25/27/21/25/22/22/26
4	Dilución = $10^{-2}$ Células /campo = 3/8/8/5/7/4/5/6/6/5
5	Dilución = $10^{-2}$ Células /campo = 33/31/28/35/27/41/25/31/32/35
6	Dilución = $10^{-2}$ Células /campo = 20/21/28/25/27/41/22/11/22/21
7	Dilución = $10^{-2}$ Células /campo = 32/30/29/30/37/21/25/37/35/35

Preparamos un segundo matraz B con 2 litros de caldo nutritivo que se inocula con células de la fase estacionaria de crecimiento del matraz A. Si deseamos que la densidad bacteriana en este matraz B sea de  $4,5 \cdot 10^4$  microorganismos/ml. ¿Qué volumen del cultivo A utilizaremos como inóculo?

9. Se hace crecer la levadura *Kloeckera apiculata* en un medio de cultivo adecuado. Tras 18 h de incubación, se recoge una alícuota de 1 ml, se diluye  $10^3$  veces. Utilizando una cámara de recuento (factor =  $4 \cdot 10^{-6}/\text{ml}$ ) se hace un contaje de las levaduras presentes en 20 cuadrículas, obteniéndose los siguientes números de células por cuadrícula: 9, 9, 5, 7, 5, 6, 7, 4, 5, 6, 8, 4, 9, 10, 8, 9, 8, 4, 8, 8.

A partir de dicho cultivo se inoculan 3 litros de medio fresco, de modo que tras 15 h de incubación se tenga un cultivo con una densidad de  $6 \cdot 10^8$  levaduras/ml. Si el tiempo de generación de las levaduras es de 1,2 h y la fase log dura 3 h ¿qué volumen de inóculo debemos utilizar?