

COMO ABORDAR Y RESOLVER ASPECTOS PRÁCTICOS DE MICROBIOLOGÍA

2. ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS



Inés Arana, Maite Orruño e Isabel Barcina

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

2. ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS

Existen diversos métodos para enumerar microorganismos en muestras de muy diferente origen. Cada método tiene sus peculiaridades a la hora de transformar los datos obtenidos en una densidad microbiana de la muestra estudiada, bien sea Unidades Formadoras de Colonias, Microorganismos Totales, etc.

Un método sencillo para la enumeración de bacterias y hongos se basa en la **cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml o g de muestra**. En el capítulo anterior ya se han resuelto problemas basados en el empleo de este método. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el número de placas sembradas por dilución suele ser 3 ó 5.

Cuando realizamos diferentes diluciones decimales y sembramos más de una placa por dilución, a la hora de interpretar los resultados tenemos diferentes posibilidades. En nuestro caso utilizaremos el método más sencillo: seleccionaremos una única dilución, aquella que produce entre 30 y 300 colonias por placa y calcularemos la media de colonias obtenidas para la dilución seleccionada.

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

Con las nociones adquiridas en el capítulo anterior, se deben **proponer soluciones** para los problemas siguientes:

2.1. Calcular la densidad bacteriana expresada como UFC/ml de las tres diferentes muestras cuyos resultados y diluciones realizadas se presentan en la tabla. El volumen sembrado es 100 µl/placa.

| Muestra | Dilución sembrada | Placa 1 | Placa 2 | Placa 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. Sabiendo que se siembran 100 μl por placa y 3 placas por muestra, ¿cuál sería, en este caso, el límite de detección de la técnica de enumeración de bacterias cultivables (UFC)? Y, ¿si se siembran 5 placas por muestra?

2.3. Un cultivo bacteriano dado tiene una densidad de $5 \cdot 10^8$ UFC/ml. Sabiendo que se sembraron 0,1 ml en la placa y tras la incubación se enumeraron 50 colonias, ¿cuál es la dilución que se sembró?

2.4. Se ha determinado la densidad bacteriana de una suspensión bacteriana mediante el método de siembra en microgota (volumen sembrado entre 10 y 20 μl y sin extensión de la gota). Los resultados y diluciones realizadas se presentan en la tabla. El volumen sembrado es 10 μl .

| Dilución sembrada | Recuento 1 | Recuento 2 | Recuento 3 |
|-------------------|------------|------------|------------|
| 10^{-3} | 180 | 159 | 186 |
| 10^{-4} | 16 | 19 | 10 |

¿Cuál es la densidad bacteriana de la muestra?

2.5. En el caso del método de la microgota, sembrando 10 μl y 3 réplicas por muestra, ¿cuál es el límite de detección de esta técnica de enumeración?

Otra técnica de enumeración habitual es el método del **Número Más Probable (NMP)**. Se trata de un método de enumeración basado en la estadística. Debe determinarse un número característico que permite obtener el NMP. Resuelva los siguientes problemas utilizando la Tabla de MacGrady que se adjunta.

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

| Número característico | NMP | Número característico | NMP | Número característico | 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 | | |

2.6. A partir de una muestra de agua se elaboran las diluciones 1/10 y 1/100. Paralelamente, se preparan 3 series de 3 tubos que contienen cada uno de ellos 10 ml de Caldo Nutritivo. La primera serie de tubos se inocula directamente con la muestra de agua. La segunda serie se inocula con la dilución 1/10 y la tercera, con la dilución 1/100. El volumen inoculado es en todos los casos de 1 ml de muestra o dilución correspondiente por tubo de medio de cultivo. Las series inoculadas se incuban durante 48 h a 20°C y al finalizar el periodo de incubación se comprueba la presencia de turbidez, indicativa de crecimiento, en cada uno de los tubos. A partir de los resultados expresados en la tabla, ¿Cuál es la densidad bacteriana de esa muestra de agua?:

| Procesamiento | Resultado Tubos* | | |
|----------------|------------------|---|----|
| Muestra | C | C | C |
| Dilución 1/10 | C | C | C |
| Dilución 1/100 | NC | C | NC |

*C = crecimiento = medio turbio; NC = no crecimiento = medio transparente.

2.7. Utilizando el ejemplo anterior, si no se hubiera detectado crecimiento en ninguno de los tubos inoculados, ¿qué densidad bacteriana daría como resultado del estudio?

2.8. Para facilitar la enumeración de microorganismos presentes en una tarta, se realiza el siguiente procedimiento: a 62,5 g de tarta se añaden 187,5 ml de agua de peptona tamponada. A partir de esta suspensión se preparan tres diluciones decimales seriadas. Paralelamente, se preparan, 4 series de 3 tubos con caldo MacConkey a razón de 10 ml de medio por tubo. Tras incubar a 44,5°C, los resultados obtenidos son los siguientes:

| Procesamiento | Resultado Tubos* | | |
|---|------------------|---|---|
| 62,5 g de tarta + 187,5 ml de agua de peptona | A | A | A |
| Dilución decimal 10 ⁻¹ | A | A | M |
| Dilución decimal 10 ⁻² | A | M | M |
| Dilución decimal 10 ⁻³ | M | M | M |

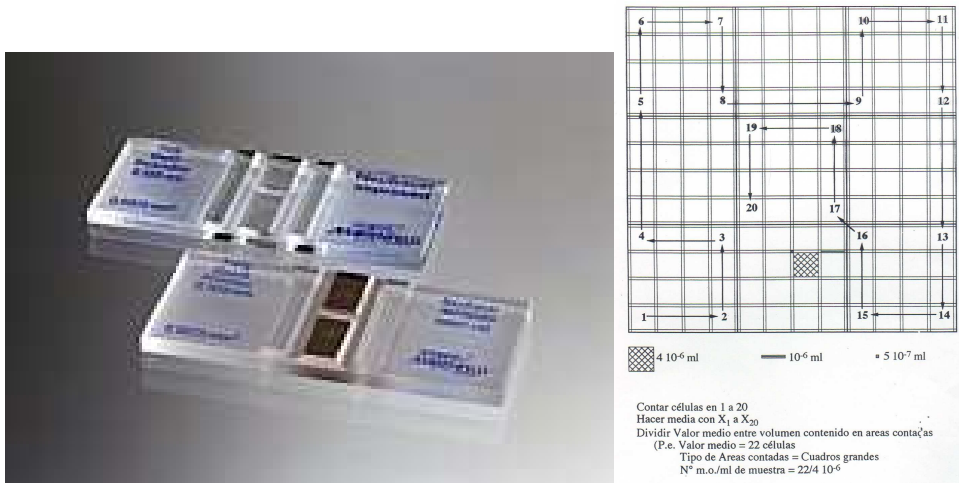
*Cada tubo se ha inoculado con 1 ml de suspensión o dilución correspondiente. A = amarillo, M = morado.

¿Cuál es la densidad de microorganismos presente en la tarta expresada en bacterias/g?

Sabiendo que la composición del caldo MacConkey es: peptona, 20 g; bilis de buey desecada, 5 g; lactosa, 10 g; púrpura de bromocresol, 0,03 g en 1 litro de agua destilada, ¿podría aportar más información acerca del tipo de bacterias y dar una característica metabólica de las mismas?

También podemos utilizar métodos de enumeración basados en la **microscopia** (fotónica, epifluorescencia, ...) para determinar el número total de microorganismos.

Los microorganismos relativamente grandes tales como levaduras o protistas pueden enumerarse utilizando cámaras de recuento.



Las ecuaciones que deben utilizarse, dependiendo de si la muestra se ha diluido o concentrado son las siguientes:

$$\text{Microorganismo/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ medio de microorganismos/cuadrícula}}{\text{N}^\circ \text{ ml/cuadrícula}^*} \times \text{Factor de dilución}$$

$$\text{Microorganismos/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ medio de microorganismos/cuadrícula}}{\text{N}^\circ \text{ ml/cuadrícula}^*} \times \frac{1}{\text{Factor de concentración}}$$

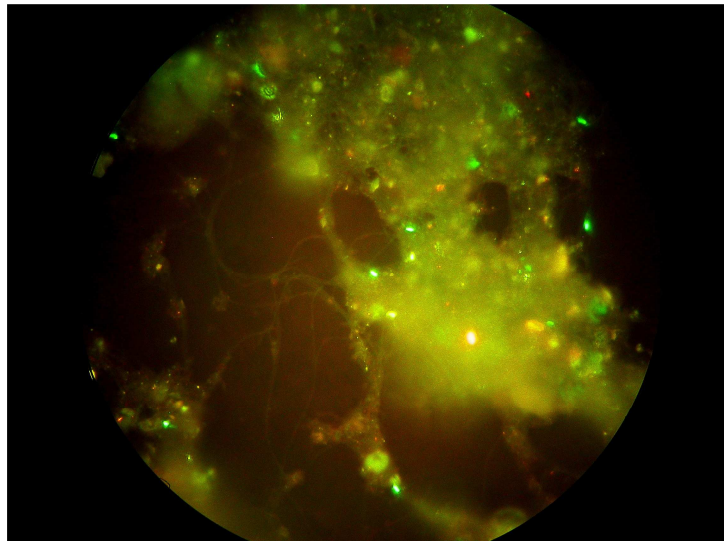
Debe prestarse atención a las unidades de cada uno de los factores de la ecuación. El resultado final se expresa como N° de microorganismos por volumen de muestra. *Este factor, propio de cada cámara de recuento, puede venir expresado como cuadrícula/ml o ml⁻¹, en este caso el factor aparecerá en el numerador de la ecuación.

2.9. Se enumeran los microorganismos presentes en una suspensión densa de levaduras. Esta suspensión se diluye 1.000 veces antes de preparar la cámara de recuento. El factor de la cámara dado por el fabricante es $0,25 \cdot 10^{-6}$ ml/cuadrícula. Si los resultados obtenidos son los presentados en la tabla, ¿cuál es el número de levaduras por ml de dicha suspensión?

| Cuadrícula | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| N° | 12 | 14 | 12 | 11 | 12 | 14 | 15 | 12 | 9 | 11 | 12 | 14 | 15 | 10 | 11 | 9 | 10 | 11 | 12 | 14 |

2.10. ¿Cuál sería el límite de detección del método de recuento de levaduras totales empleando cámara de recuento (hemocitómetro), si contamos un máximo de 20 campos en la cámara y el factor de la misma es $1,5 \cdot 10^5$ /ml?

Desde hace varias décadas la **microscopia de epifluorescencia** permite la enumeración de microorganismos previamente teñidos con fluorocromos. Esta técnica es muy válida para la cuantificación de bacterias.



La ecuación empleada para transformar los datos obtenidos en una densidad microbiana es:

$$\text{Microorganismo/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ microorganismos/campo}}{\text{N}^\circ \text{ ml/filtro}} \times \text{X Factor microscopio} \times \text{X Factor de dilución}$$

El factor del microscopio se expresa como N° de campos por filtro.

2.11. Se desea estimar la densidad bacteriana de una muestra de agua. Para ello, 100 µl de la muestra se tiñen con naranja de acridina y se filtran a través de un filtro de membrana de 0,2 µm de diámetro de poro. El filtro se monta sobre un portaobjetos y se observa utilizando un microscopio de epifluorescencia. Se cuentan 20 campos obteniéndose los siguientes recuentos bacterianos por campo:

| Campo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|-------|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| N° | 15 | 12 | 11 | 9 | 21 | 16 | 13 | 13 | 15 | 20 | 22 | 13 | 14 | 12 | 18 | 17 | 9 | 22 | 18 | 18 |

Sabiendo que el factor de conversión del microscopio es de 30.954 campos/filtro, ¿cuál es la densidad bacteriana de la muestra? Si se hubiera filtrado 1 ml de la dilución 10⁻², utilizando los mismos recuentos, ¿cuál es la densidad bacteriana de la muestra?

2.12. Calcule la densidad de las suspensiones bacterianas que se indican en la tabla teniendo en cuenta que las cuantificaciones se han realizado empleando microscopia de epifluorescencia. Los volúmenes filtrados y las diluciones empleadas, así como, el número de bacterias por campo se

detallan en la tabla. El factor del microscopio de epifluorescencia utilizado es 64.761,9 (N° de campos/filtro).

| Muestra | Volumen filtrado | Dilución | N° bacterias/campo |
|---------|------------------|------------------|-------------------------------|
| 1 | 1 ml | Muestra | 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. ¿Cuál sería el límite de detección del método de recuento de bacterias totales mediante microscopia de epifluorescencia, si el volumen máximo que podemos filtrar es 5 ml, F es 34.520 campos/filtro y contamos un máximo de 30 campos por filtro?

2.14. En el río Butrón a su paso por Munguía, se recogieron muestras de agua. Ya en el laboratorio, se preparó un matraz de 1.000 ml con 500 ml de muestra no tratada. El matraz se inoculó con *E. coli* (densidad final, aproximadamente 10⁶ UFC/ml) y se incubó durante 6 días a 20°C (120 r.p.m.). Periódicamente, se tomaron alícuotas encaminadas a la enumeración de *E. coli* y de protozoos flagelados. La enumeración de UFC de *E. coli* se realizó en Agar EMB (Medio selectivo y diferencial en el que *E. coli* produce colonias verdes metálicas características). La enumeración de protozoos flagelados se realizó mediante microscopia de epifluorescencia en alícuotas filtradas a través de filtros de 0,8 µm de diámetro de poro y teñidas con DAPI (factor del microscopio de epifluorescencia utilizado, 64761,9 campos/filtro).

Se obtuvieron los resultados expresados en la tabla:

| Tiempo (d) | Dil. | Vol. Sembrado (µl) | Colonias/placa | Dil. | Vol. Filtrado (ml) | N° flagelados/campo |
|------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|--------------------|--|
| 0 | 10 ⁻³ | 100 | 96/96/108 | M | 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 | M* | 100 | 315/296/298 | | | |
| 4 | M | 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 | M | 1000 | 265/267/281 | | | |
| 6 | M | 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 |

* M = muestra.

¿Cuál es el efecto de la población de protozoos flagelados sobre la supervivencia de *E. coli*?

2.15. Sospechamos que la densidad de un cultivo bacteriano cuando alcanza la fase estacionaria de crecimiento es de 4 10⁸ células/ml. Para confirmar la densidad del cultivo utilizaremos el método de enumeración basado en el empleo de microscopia de epifluorescencia. Sabiendo que

se recomienda enumerar unas 20-30 bacterias por campo y que el factor del microscopio utilizado es 20.000 campos/filtro, para una correcta enumeración ¿qué dilución de la muestra y que volumen de dilución recomendaría filtrar?

2.16. Debemos preparar 20 ml de la dilución 10^{-3} de un cultivo microbiano. Indique como la realizaría.

A continuación:

- 5 ml de esta dilución se filtran para cuantificar las bacterias cultivables presentes. Este filtro se coloca sobre un medio de cultivo adecuado. Tras la incubación se cuentan 125 colonias. ¿Qué número de UFC/ml tiene la muestra?
- Otros 10 ml se filtran por un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro y se tiñen con naranja de acridina. Los recuentos obtenidos mediante microscopia de epifluorescencia son: 15/14/13/20/12/10/15/17/16/17. ¿Cuál es la densidad bacteriana total si el factor del microscopio es 1.920 campos/filtro?

2.17. ¿Cuál es el porcentaje de células cultivables Gram negativas en un cultivo mixto? Razone la respuesta.

Sabemos que:

- Siendo el volumen filtrado es 2 ml de la dilución 10^{-2} y el factor del microscopio, 15.000 campos/filtro, los recuentos obtenidos mediante microscopia de epifluorescencia son: 22/21/20/23/22/22/23/24/25/25..
- Tras sembrar 3 placas de Agar MacConkey con 0,1 ml de la dilución 10^{-3} , los resultados obtenidos fueron: Lactosas positivas = 170/165/182 y Lactosa negativas = 80/70/76.

Un método clásico, y muy sencillo, de cuantificación de microorganismos se basa en la **medición de la Absorbancia** (a una determinada longitud de onda) de una suspensión microbiana y la transformación de este valor en un número de células (o UFC) por ml. Obviamente, este método requiere de un estudio previo en el que se preparan diferentes diluciones de la suspensión microbiana y para cada dilución se determina el valor de Absorbancia y el N° de microorganismos/ml. Con esta información se obtiene una ecuación que relaciona ambos parámetros y, en estudios posteriores, nos permitirá conociendo la Absorbancia determinar la densidad microbiana.

2.18. Un cultivo de *Klebsiella pneumoniae* en fase exponencial tiene una absorbancia = 0,2 medida a 600 nm. Al realizar un recuento en placa se contaron 40 colonias tras sembrar 0,2 ml de la dilución 10^{-4} del cultivo.

- a) Calcula la densidad del cultivo.
- b) Calcula las UFC totales si el volumen del cultivo es de 3 ml.

c) ¿Qué diluciones deberías realizar a partir del mismo cultivo de *K. pneumoniae* cuando alcanza una absorbancia = 0,5 para contar en una placa 100 colonias después de sembrar 0,2 ml?

2.19. A partir de una suspensión densa de *Escherichia coli* se han preparado suspensiones diferentes en las que se han determinado Absorbancia y UFC/ml. Los resultados obtenidos se expresan en la siguiente tabla:

| Suspensión | Absorbancia (550 nm) | Bacterias/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 | $6,90 \cdot 10^8$ |

¿Cuál sería la densidad de una suspensión con Absorbancia = 0,18?

2.20. Se ha obtenido la siguiente ecuación que relaciona Absorbancia (600 nm) y *Klebsiella pneumoniae*/ml: $N^{\circ} \text{ bacterias/ml} = 1,032 \cdot 10^7 \text{ Abs} - 2,19 \cdot 10^5$.

Se toma una alícuota de un cultivo de *K. pneumoniae*, se diluye 10 veces y se determina la Absorbancia (600 nm) de la dilución. El valor obtenido es 0,49. ¿Cuál es la densidad del cultivo.


PROPUESTAS DE RESOLUCIÓN

2.1. ¿UFC/ml? Volumen sembrado = 100 µl/placa.

| Muestra | Dilución sembrada | Placa 1 | Placa 2 | Placa 3 | UFC/ml |
|---------|-------------------|---------|---------|---------|----------------------|
| 1 | 10 ⁻³ | 1816 | 1698 | 1885 | |
| | 10 ⁻⁴ | 180 | 159 | 186 | 1,75 10 ⁷ |
| | 10 ⁻⁵ | 16 | 19 | 10 | |
| 2 | 10 ⁻² | 475 | 477 | 480 | |
| | 10 ⁻³ | 45 | 48 | 51 | 4,8 10 ⁵ |
| | 10 ⁻⁴ | 5 | 10 | 4 | |
| 3 | 10 ⁰ | 335 | 328 | 324 | |
| | 10 ⁻¹ | 32 | 28 | 29 | 2,97 10 ³ |
| | 10 ⁻² | 5 | 3 | 2 | |

2.2. Límite de detección del método de enumeración de UFC. Supuesto: 100 µl sembrados/placa, 3 placas/muestra.

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



Caso real (colonias enumeradas): 0 0 0

Caso límite para enumeración: 0 0 1

↓

0,33 colonias
————— = 3,3 UFC/ml
0,1 ml inoculados

Caso límite para enumeración: 1 colonia/3 placas = 3,3 UFC/ml

Caso real: 0 colonias/3 placas = Límite de detección: <3,3 UFC/ml

Límite de detección del método de enumeración de UFC. Supuesto: 100 µl sembrados/placa, 5 placas/muestra.

Límite de detección: <2 UFC/ml

2.3. Densidad = 5 10⁸ UFC/ml. 0,1 ml/placa. 50 colonias, ¿Dilución sembrada?

$$\frac{50 \text{ colonias} \times D}{0,1 \text{ ml inoculados}} = 5 \cdot 10^8 \text{ UFC/ml} \quad \Rightarrow \quad D = 10^6$$

2.4. Microgota (10 µl/gota). ¿UFC/ml?

| Dilución sembrada | Recuento 1 | Recuento 2 | Recuento 3 | UFC/ml |
|-------------------|------------|------------|------------|---------------------|
| 10 ⁻³ | 180 | 159 | 186 | |
| 10 ⁻⁴ | 16 | 19 | 10 | 1,5 10 ³ |

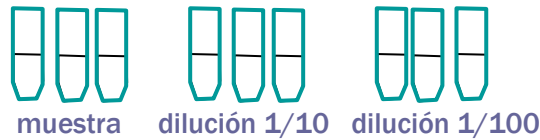
2.5. Límite de detección del método de microgota: 10 µl/gota, 3 réplicas/muestra (dilución).

$$\frac{0,33 \text{ colonias}}{0,01 \text{ ml inoculados}} = 33,3 \text{ UFC/ml}$$

Caso límite para enumeración: 1 colonia/3 gotas = 33,3 UFC/ml

Caso real: 0 colonias/3 gotas = Límite de detección: <33,3 UFC/ml

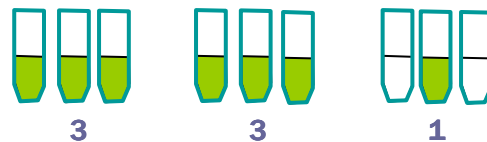
2.6. NMP. ¿Densidad bacteriana?



Volumen inoculado = 1 ml muestra o dilución

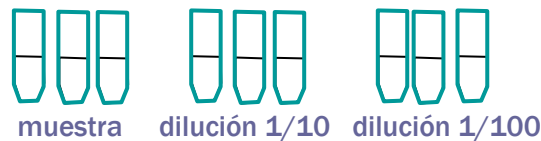
Se incuban 48 h a 20°C

Se comprueba crecimiento (turbidez)



45 bacterias/ml

2.7. NMP. ¿Límite de detección?



Caso real (tubos positivos):

0 0 0

Caso límite para enumeración:

1 0 0

0,3 bacterias/ml

Límite de detección <0,3 bacterias/ml

2.8. NMP. ¿Microorganismos presentes?

| Procesamiento | Resultado Tubos* | | |
|---|------------------|---|---|
| 62,5 g de tarta + 187,5 ml de agua de peptona | A | A | A |
| Dilución decimal 10 ⁻¹ | A | A | M |
| Dilución decimal 10 ⁻² | A | M | M |
| Dilución decimal 10 ⁻³ | M | M | M |

*M = Morado = Ausencia de crecimiento. A = Amarillo = Fermentación de lactosa

Nº característico = 321 = 15 microorganismos

Dilución = 62,5 / 250 = 1 / 4

NMP = 15 x 4 = 60 bacterias Gram - Lac+/g

2.9. Suspensión de levaduras. Diluir 1.000 veces. Factor de la cámara = $0,25 \cdot 10^{-6}$ ml/cuadrícula.
 ¿Nº Levaduras/ml de suspensión?

| Cuadrícula | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Nº | 12 | 14 | 12 | 11 | 12 | 14 | 15 | 12 | 9 | 11 | 12 | 14 | 15 | 10 | 11 | 9 | 10 | 11 | 12 | 14 |

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

2.10. Cámara de recuento. Cuadrículas contadas = 20. Factor = $1,5 \cdot 10^6$ cuadrícula/ml.
 ¿Limite de detección?

Caso real (células/cuadrícula): 0

Caso límite para enumeración: 1 célula en 1 cuadrícula de las 20 enumeradas

$$1 \text{ célula}/20 \text{ cuadrículas} \times 1,5 \cdot 10^6 \text{ cuadrículas/ml} = 7,5 \cdot 10^4 \text{ levaduras/ml}$$

Límite de detección $< 7,5 \cdot 10^4$ levaduras/ml

2.11. Microscopia de epifluorescencia. Volumen filtrado = 100 µl. Factor = 30.954 campos/filtro.
 ¿Densidad bacteriana?

| Campo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|-------|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Nº | 15 | 12 | 11 | 9 | 21 | 16 | 13 | 13 | 15 | 20 | 22 | 13 | 14 | 12 | 18 | 17 | 9 | 22 | 18 | 18 |

$$\frac{15,4 \text{ bacterias/campo} \times 30.954 \text{ campos/filtro}}{0,1 \text{ ml/filtro}} = 4,77 \cdot 10^6 \text{ bacterias/ml}$$

Volumen filtrado = 1 ml. Dilución 10^{-2} . Factor = 30.954 campos/filtro. ¿Densidad bacteriana?

$$\frac{15,4 \text{ bacterias/campo} \times 30.954 \text{ campos/filtro} \times 100}{1 \text{ ml/filtro}} = 4,77 \cdot 10^7 \text{ bacterias/ml}$$

2.12. Microscopia de epifluorescencia. Factor = 64.761,9 campos/filtro.

| Muestra | Volumen filtrado | Dilución | Nº bacterias/campo | Nº bacterias/ml |
|---------|------------------|-----------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 1 ml | Muestra | 25/32/31/30/35/21/14/21/21/20 | $1,62 \cdot 10^6$ |
| 2 | 100 µl | 10^0 | 22/22/21/22/23/23/21/17/21/21 | $1,38 \cdot 10^7$ |
| 3 | 50 µl | 10^{-1} | 23/23/22/21/23/24/15/31/24/24 | $2,98 \cdot 10^8$ |
| 4 | 100 µl | 10^{-2} | 6/8/11/9/13/7/7/8/9/11 | $5,76 \cdot 10^8$ |

2.13. Microscopia de epifluorescencia. Volumen máximo filtrado = 5 ml. Factor = 34.520 campos/filtro. 30 campos/filtro

Caso real (células/campo): 0

Caso límite para enumeración: 1 célula en 1 campo de los 30 enumerados

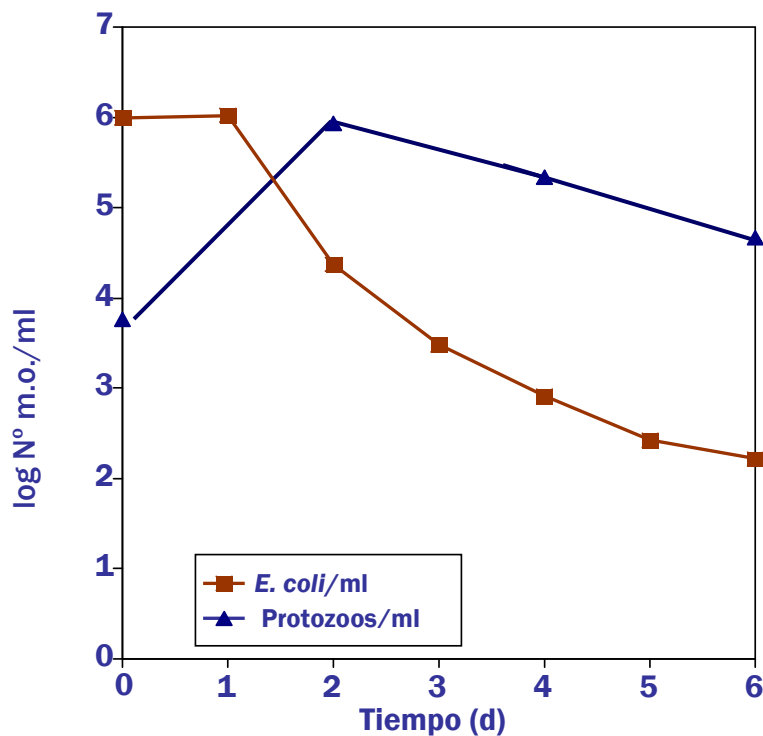
$$\frac{1 \text{ bacteria/30 campos} \times 34.520 \text{ campos/filtro}}{5 \text{ ml/filtro}} = 230 \text{ bacterias/ml}$$

Límite de detección <230 bacterias/ml

2.14. Efecto de la población de protozoos flagelados sobre la población de *E. coli*. (Factor = 64761,9)

| Tiempo (d) | DL | Vol. Sembrado (μl) | Colonias/placa | UFC/ml | DL | Vol. Filtrado (ml) | flagelados/campo | Flagelados/ml |
|------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|------------------|--------------------|--|-----------------------|
| 0 | 10 ⁻³ | 100 | 96/96/108 | 10 ⁶ | M | 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 | 14,70 10 ⁴ |

M = muestra.



2.15. Microscopia de epifluorescencia. ¿Volumen filtrado? ¿Dilución?

$$\frac{25 \text{ bacterias/campo} \times 20.000 \text{ campos/filtro}}{V \text{ ml/filtro}} = 4 \cdot 10^8 \text{ bacterias/ml}$$

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

2.16. 20 ml dilución 10^{-3} .

- Dilución 10^{-1} = 1 ml Muestra + 9 ml Diluyente
- Dilución 10^{-2} = 1 ml Muestra + 9 ml Dilución 10^{-1}
- Dilución 10^{-3} = 2 ml Muestra + 18 ml Dilución 10^{-2}

¿UFC/ml?

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

¿Nº total de bacterias/ml? Nº medio bacterias/campo = 14,9.

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

2.17. ¿Porcentaje de células Gram negativas cultivables?

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

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

$$\boxed{14,59 \%}$$

2.18. ¿Densidad del cultivo de *K. pneumoniae*?

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

¿UFC totales en 3 ml? $2 \cdot 10^6 \text{ UFC/ml} \times 3 \text{ ml} = 6 \cdot 10^6 \text{ UFC totales}$

¿Dilución?

$$0,2 \text{ Abs} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 2 \cdot 10^6 \text{ UFC/ml}$$

$$0,5 \text{ Abs} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 5 \cdot 10^6 \text{ UFC/ml}$$

$$\frac{100 \text{ colonias} \times D}{0,2 \text{ ml}} = 5 \cdot 10^6 \text{ UFC/ml}$$

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

2.19. ¿Densidad de una suspensión de *E. coli* con Absorbancia (550) = 0,18?

| Suspensión | Absorbancia (550 nm) | Bacterias/ml | Log bacterias/ml |
|------------|----------------------|-------------------|------------------|
| 1 | 0,020 | $3,55 \cdot 10^6$ | 6,55 |
| 2 | 0,052 | $2,04 \cdot 10^7$ | 7,31 |
| 3 | 0,102 | $5,65 \cdot 10^7$ | 7,75 |
| 4 | 0,164 | $1,95 \cdot 10^8$ | 8,29 |
| 5 | 0,213 | $4,75 \cdot 10^8$ | 8,68 |
| 6 | 0,264 | $6,90 \cdot 10^8$ | 8,84 |

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

1,994 10^8 bacterias/ml

2.20. ¿ *Klebsiella pneumoniae*. N° bacterias/ml= $1,032 \cdot 10^7 \text{ Abs} - 2,19 \cdot 10^5$.

¿Densidad de un cultivo co Absorbância = 0,49.

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

4,84 10^6 bacterias/ml