

Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos.

Ramírez S Julián A., Parra V John A¹, Adalucy Alvarez-Aldana²

Resumen

El aislamiento y obtención de cultivos puros posiblemente hayan sido las bases más importantes en el desarrollo de la Microbiología. Los primeros trabajos en Microbiología se hicieron en unas condiciones experimentales que no permitían tener la certeza de que se hubieran obtenido cultivos puros. Más adelante, los microbiólogos observaron que, aparentemente, los microorganismos tenían una gran capacidad de variación en cuanto a su aspecto morfológico y características fisiológicas. Un cultivo puro es aquel que contiene una sola clase de microorganismo. En la práctica los cultivos puros son útiles por diferentes razones: mantienen los organismos viables, permiten hacer subcultivos para someterlos a diferentes análisis. Para obtener lo anterior es necesario recurrir a las técnicas de recuento. Existen métodos que permiten establecer el número de microorganismos en una muestra dada. Hay métodos que cuantifican el número de células, y existen otros que cuantifican la masa total de la población. El objetivo de este estudio es conocer las diversas técnicas utilizadas para el recuento de células de microorganismos, al igual que evaluar la efectividad de cada uno de estos métodos de conteo de células.

Palabras Clave: *cámara de Neubauer, patrón de McFarland, recuento en placa, crecimiento microbiano.*

Abstract

The isolation and obtaining of pure cultures have possibly been the most important bases in the development of Microbiology. The first works in Microbiology were made under experimental conditions that did not allow being certain that pure cultures had been obtained. Later, microbiologists observed that, apparently, the microorganisms had a great capacity for variation in terms of their morphological appearance and physiological characteristics. A pure culture is one that contains a single class of microorganism. In practice, pure cultures are useful for different reasons: they keep viable organisms, allow subcultures to be subjected to different analyzes. To obtain the above, it is necessary to resort to counting techniques. There are methods that allow establishing the number of microorganisms in a given sample. There are methods that quantify the number of cells, and there are others that quantify the total mass of the population. The objective of this study is to know the different techniques used for the counting of microorganism cells, as well as to evaluate the effectiveness of each of these methods of cell counting.

Keywords: *Neubauer chamber, McFarland pattern, plate count, microbial growth*

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Pereira.

INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos(1). La diversidad metabólica de los microorganismos es muy amplia; por ello, la variedad de medios de cultivo es también muy grande, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos(2).

Los microorganismos son seres ubicuos que han colonizado todos los tipos de ecosistemas: el agua, el suelo, el aire, el resto de organismos. Por ello todas las manipulaciones para conseguir cultivos puros se deben realizar en un ambiente estéril que impida el acceso al medio de otros microorganismos diferentes a los que deseamos aislar(3). Se deben crecer dentro de recipientes y medios de cultivo previamente esterilizados. Los recipientes más utilizados en el crecimiento de microorganismos son los tubos de ensayo, los matraces (ambos para los medios líquidos) y las placas de Petri (para los cultivos sólidos)(4).

El crecimiento de una población bacteriana puede ser entendido desde diferentes perspectivas y de acuerdo a éstas se puede llegar a determinar la medida del crecimiento mediante diversas metodologías(3). Para algunos, el crecimiento es la capacidad para multiplicarse que tienen las células individuales, esto es iniciar y completar una división celular. De esta forma, se considera a los microorganismos como

partículas discretas y el crecimiento es entendido como un aumento en el número total de partículas bacterianas. Para otros, el crecimiento implica el aumento de los microorganismos capaces de formar colonias debido a que sólo se tiene en cuenta el número de microorganismos viables, esto es capaces de crecer indefinidamente. Para los fisiólogos bacterianos, bioquímicos y biólogos moleculares una medida del crecimiento es el incremento de biomasa. Para ellos, la síntesis macromolecular y un incremento en la capacidad para la síntesis de los componentes celulares es una medida del crecimiento. Para este grupo la división celular es un proceso esencial pero menor que rara vez limita el crecimiento, ya que lo que limita el crecimiento es la capacidad del sistema enzimático para utilizar los recursos del medio y formar biomasa(5).

El recuento en placa es uno de los métodos más utilizados para determinar cuál es el número de microorganismos viables en un medio líquido. Cuando la concentración es baja se procede a filtrar la muestra a través de una membrana que será pasada al medio de cultivo, en una placa de Petri. Los microorganismos retenidos en la membrana se desarrollarán formando colonias, permitiendo su cuantificación. Cuando la concentración es alta, se procede a la preparación de diluciones seriadas en una secuencia de 1:10, alcanzándose diluciones de 10^{-7} o mayores. Pequeñas alícuotas de esas diluciones son sembradas en medio nutritivo en placa, donde las bacterias se desarrollan formando colonias. En las placas donde la

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Pereira.

concentración de la alícuota sembrada es muy alta, las bacterias formarán crecimiento másivo, pero si la concentración es muy baja, el número de UFC podrá ser muy bajo. Entre los dos extremos de las diluciones, alguna de las placas contendrá un número de colonias entre 30 y 300, permitiendo la cuantificación(6,7).

Del método de recuento en placa se dividen dos variables muy utilizadas que son:

- El recuento en placa por siembra en profundidad: que consiste en añadir medio de cultivo fundido y enfriado a 50°C sobre placa de Petri que contiene una cantidad determinada de la muestra diluida. Se tapa la placa y se rota para mezclar la muestra en el agar. Cuando el agar solidifica se incuban las placas. Las colonias se desarrollan tanto dentro del agar como en la superficie. Es un método generalmente utilizado para el recuento de microorganismos anaerobios facultativos o microaerofilos.
- El recuento en placa por siembra en superficie que consiste en la siembra de un volumen conocido de la dilución de la muestra sobre la superficie de un medio de cultivo en placa Petri. En este método todas las colonias crecen sobre la superficie del medio. Generalmente se utiliza esta técnica para el recuento de bacterias aerobias(8).

El recuento microscópico es una técnica común, rápida y poco costosa que utiliza un equipamiento fácilmente disponible en un laboratorio de microbiología. Para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuentos, aunque también pueden realizarse a partir de muestras filtradas en membranas y transparentadas o teñidas con colorantes fluorescentes(9). La mayor dificultad del recuento en cámara es obtener reproducibilidad en el llenado de la cámara con líquido. Otra dificultad es la adsorción de las células en las superficies del vidrio, incluyendo pipetas. Esta adsorción es crítica en el proceso de dilución de la muestra y se minimiza al realizar las diluciones en medios de alta fuerza iónica (solución fisiológica o medios mínimos sin fuente de carbono(10)).

Los recuentos microscópicos directos permiten determinar el número de células microbianas, por observación directa en el microscopio. Presentan una gran ventaja ya que la muestra puede utilizarse tal cual, o puede prepararse una dilución tal como se realiza para otros métodos de recuento(9,11).

El objetivo de este estudio es conocer técnicas variadas de recuento de células de microorganismos, al igual que medir la efectividad de estos métodos de conteo de microorganismos.

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

METODOLOGÍA

Preparación de medios de cultivo.

Se prepararon dos medios de cultivo sólidos (Agar PDA, Agar TSA) para permitir el crecimiento microbiano. De igual manera se preparó la cantidad suficiente de caldo nutritivo de acuerdo con las indicaciones del fabricante para realizar las diluciones de cada microorganismo (de 10^{-1} a 10^{-10}).

Procesamiento de las muestras.

Tanto los agares como el caldo nutritivo se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos.

Inoculación del medio de cultivo.

En la cámara de Neubauer se utilizaron las diluciones 10^{-2} de ambos microorganismos (12).

Los microorganismos utilizados en esta práctica fueron *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*. Se formaron 2 baterías de tubos (correspondiente a las 2 especies evaluadas) con un tubo correspondiente de cada dilución.

Los medios de cultivo inoculados con la cepa *B. subtilis* se incubaron a 37°C por 24 horas. Los de *S. cerevisiae* se incubaron a temperatura ambiente (TA) por el mismo tiempo.

Recuento de células

Se contaron el número de UFC de cada placa tanto de profundidad como de superficie. Para la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Tras la realización de cada uno de los pasos descritos en la metodología, se obtuvieron los siguientes resultados

Tabla 1. Conteo de UFC en medios sembrados por método de superficie

Dilución siembra en superficie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (número de UFC)	<i>Bacillus subtilis</i> (número de UFC)
10^{-1}	Incontable	Incontable
10^{-2}	Incontable	Incontable
10^{-3}	Incontable	Incontable
10^{-4}	Incontable	Incontable
10^{-5}	Incontable	Incontable
10^{-6}	Incontable	Incontable
10^{-7}	Incontable	Incontable
10^{-8}	Incontable	Incontable
10^{-9}	Incontable	Incontable
10^{-10}	Incontable	Incontable

Tabla 2 Conteo de UFC en medios sembrados por método de profundidad

Dilución siembra en profundidad	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (número de UFC)	<i>Bacillus subtilis</i> (número de UFC)
10^{-1}	Incontable	Incontable
10^{-2}	Incontable	Incontable
10^{-3}	Incontable	Incontable
10^{-4}	Incontable	Incontable

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

10^{-5}	Incontable	Incontable
10^{-6}	Incontable	Incontable
10^{-7}	Incontable	Incontable
10^{-8}	Incontable	Incontable
10^{-9}	Incontable	Incontable
10^{-10}	Incontable	Incontable

Tabla 3 Promedio de células/mL del recuento de las diluciones 10^{-2} de ambos microorganismo en cámara de Neubauer

Dilución	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cells/mL)	<i>Bacillus subtilis</i> (cells/mL)
10^{-2}	$1,0 \cdot 10^8$	$4,6 \cdot 10^7$

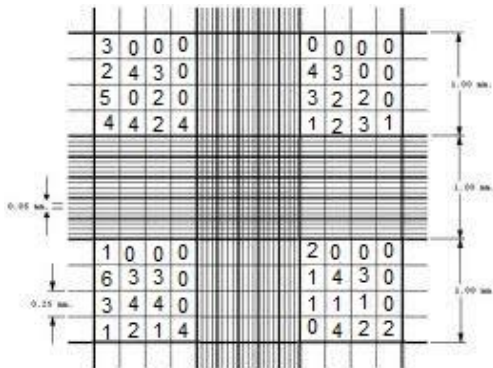


Fig. 1 Recuento de células de *Saccharomyces cerevisiae* en cámara de Neubauer

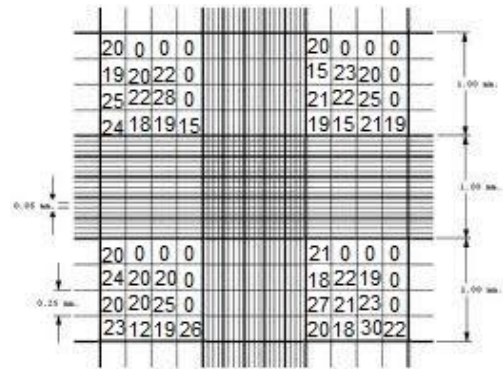


Fig. 2 Recuento de células de *Bacillus subtilis* en cámara de Neubauer

Recuento siembra en superficie *Saccharomyces cerevisiae* (tabla 1)

Los resultados obtenidos en la siembra por superficie no fueron los esperados puesto que hubo contaminación de otros microorganismos que dificultaron el recuento de colonias en diversas diluciones realizadas. También se presentó el inconveniente de que hubo un crecimiento masivo, por lo que no se formaron UFC en algunas diluciones impidiendo el recuento de estas (13).

Recuento siembra en profundidad *Saccharomyces cerevisiae* (tabla 2)

Como en el recuento en placa anterior, los resultados aquí también no fueron ideales. Por condiciones similares de contaminación de otros microorganismos no fue posible el conteo de las UFC en las diversas diluciones. En el fondo de la placa el crecimiento de la levadura fue bueno, en la mayoría fue un crecimiento masivo. En todas las diluciones fue posible apreciar la

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

migración de algunas UFC a través del medio hacia la superficie (14).

Recuento siembra en superficie *Bacillus subtilis* (tabla 2)

Los resultados obtenidos en la siembra por vertido superficial con este microorganismo tampoco fueron las ideales. Crecimientos masivos probablemente por humedad del medio, presencia de microorganismos contaminantes. No fue posible realizar un conteo de las colonias puesto que en la mayoría fueron formaciones de más de 300 unidades formadoras de colonia (13–15).

Recuento siembra en profundidad *Bacillus subtilis* (tabla 2)

Como en el recuento anterior, no fue posible contar el número de UFC en la placa debido a la opacidad del medio, además de factores como los que afectaron las placas anteriormente nombradas no permitieron que se llevase a cabo el recuento (13).

Recuento en cámara de Neubauer *Saccharomyces cerevisiae* (tabla 3)

Los resultados del número de células por este método fueron de 100 cells/mm³ (fig. 1) que al ser convertidas a la unidad utilizada para el patrón de McFarland fue de 1,0*10⁵ cells/mL. La muestra para este recuento fue tomada de la dilución 10⁻². En comparación con el número de células dadas por el patrón de turbidez de McFarland, la diferencia es mucha, por lo que no es un resultado ideal. Esto puede significar una inhibición del crecimiento de

esta levadura o una mala inoculación del medio líquido para la realización de una turbidez similar a la del patrón de McFarland 2(12).

Recuento en cámara de Neubauer *Bacillus subtilis* (tabla 3)

Con respecto a la constante del número de células respectiva al patrón de McFarland utilizado para la inoculación del medio del cual fue tomada la muestra para esta práctica, este fue el resultado más preciso. El conteo de células dio por resultado 46100 cells/mm³ (fig. 2) que en unidades de mL equivale a 4,6*10⁷ cells/mL, dato que es de cierta forma cercano al valor de la constante de McFarland 6,0*10⁸ cells/mL(16).

CONCLUSIONES

Se evaluaron algunos de los métodos más utilizados para el recuento de microorganismos determinando así las ventajas y desventajas de cada uno. Aunque existan muchos tipos de recuento de células, algunos mejores que otros, la gran mayoría siempre tendrá desventajas. Unas de las desventajas del recuento por el método de siembra en profundidad y en superficie son: el tiempo prolongado que se necesita para la preparación de los medios y el riesgo de contaminación por otros microorganismos que pueden afectar el medio de cultivo.

Una de las ventajas del recuento de células viables es precisamente que forman UFC. Mientras que en recuentos microscópicos no se tiene la certeza de si se trata de una

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

célula viva o muerta, a menos de que esta tenga movilidad o tinciones vitales.

Sin duda una de las ventajas del método microscópico es que por medio de este se puede brindar información adicional sobre el tamaño y la morfología de los objetos contados.

En el método microscópico por cámara de Neubauer el margen de error incrementa a medida que la muestra tiene una concentración celular alta, además de que si el tamaño de la célula del microorganismo es muy pequeña esta será difícil de ver.

En un balance general se puede decir que dependiendo del tipo de microorganismo que se vaya a cultivar, se debe investigar acerca de cuál método presenta mejores características para un recuento sin tanto margen de error, que sea de manera fácil y económica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monod J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1949 Oct 28 [cited 2017 Sep 9];3(1):371–94. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
2. Varela G, Grotiuz G. Fisiología y metabolismo bacteriano. Uruguay, Editor Cefa [Internet]. 2002;43–58. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>
3. Basu S, Bose C, Ojha N, Das N, Das J, Pal M, et al. Evolution of bacterial and fungal growth media.

4. Brugger SD, Baumberger C, Jost M, Jenni W, Brugger U, Mühlemann K. Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates. Bereswill S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 20 [cited 2017 Sep 9];7(3):e33695. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033695>
5. Schaechter M. A brief history of bacterial growth physiology. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 [cited 2017 Nov 20];6:289. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25954250>
6. Scheffers D-J. Bacterial Reproduction and Growth. In: *eLS* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cited 2017 Nov 20]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0001419.pub2>
7. Basu S, Bose C, Ojha N, Das N, Das J, Pal M, et al. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformatics* [Internet]. 2015 [cited 2017 Nov 19];11(4):182–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124557>
8. LeChevallier MW, Seidler RJ, Evans TM. Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1980 Nov 1 [cited 2017 Nov 20];40(5):922–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7447444>

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

9. Kirchman D, Sigda J, Kapuscinski R, Mitchell R. Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1982 Aug [cited 2017 Nov 20];44(2):376–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6751231>
10. Knaysi G, Ford M. A Method of Counting Viable Bacteria in Milk by Means of the Microscope. *J Dairy Sci* [Internet]. 1938 Mar 1 [cited 2017 Nov 20];21(3):129–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030238956279>
11. Jennison MW. The Relations Between Plate Counts and Direct Microscopic Counts of *Escherichia coli* During the Logarithmic Growth Period. *J Bacteriol* [Internet]. 1937 May [cited 2017 Nov 20];33(5):461–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16560015>
12. Matlock BC, Beringer RW, Ash DL, Allen MW, Page AF. Analyzing Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers. [cited 2017 Sep 9]; Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/posters/nanodroptropyPOS TER.pdf>
13. Bertha Olivia Arredondo Vega, Domenico Voltolina. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento [internet]. Ular y tasa de crecimiento Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. México D.F.: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 2002 [cited 2017 Nov 20]. p. 9. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Domenico_Voltolina/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUE NTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRE CIMIENTO/links/00b4953c92711ed8fb000000/CONCENTRACION-RECUE NTO-CELULAR-Y-TASA-DE-CRECIMIENTO.pdf
14. Tevez López L. Estudio cuantitativo de bacterias [Internet]. Buenos Aires: Universidad Nacional del Nordeste; 2006 [cited 2017 Nov 20]. p. 3. Available from: <http://www.biologia.edu.ar/microgener al/tp5.pdf>
15. Santambrosio E. Siembra y recuento de microorganismos [Internet]. Buenos Aires: Universidad Tecnológica Nacional; 2009 [cited 2017 Nov 20]. p. 8. Available from: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio /catedras/quimica/5_anio/biotecnologi a/practicoll.pdf
16. Bastidas O. Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. [cited 2017 Nov 20]; Available from: www.celeromics.com

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.