

Primer acercamiento del estudiante de Microbiología a las técnicas de recuento en superficie, profundidad y cámara De Neubauer.

Sánchez M María C, Vergara U Valentina, Polo N Laura D*, Alvarez A Adalucy**

RESUMEN

El recuento de microorganismos puede abordarse desde la siembra en superficie, en profundidad o cámara de Neubauer y se realiza tanto para microorganismos aerobios, anaerobios facultativos, o microaerófilos. El objetivo de este laboratorio consistió en identificar y realizar las diferentes técnicas de recuento en superficie, en profundidad y recuento en cámara de Neubauer con los microorganismos *Bacillus subtilis* y *Sacharomyces cerevisiae*.

Palabras claves: *Bacillus subtilis*, recuento, células viables, Cámara de Neubauer, *Sacharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

The microorganisms count can be approached from the planting in surface, in depth or in Neubauer Chamber and it is done for aerobic microorganisms, facultative anaerobes, or microaerophiles. The objective of this laboratory was to identify and perform the different techniques of surface counting, depth and count in Neubauer chamber with the microorganisms *Bacillus subtilis* and *Sacharomyces cerevisiae*.

Key words: *Sporulated bacillus*, count, viable cells, recovery, McFarland pattern

*¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. **Docente. Programa de Microbiología. Adalucy.alvareza@unilibre.edu.co. Universidad Libre Pereira.

INTRODUCCIÓN

El conteo bacteriano es indispensable para determinar cuantitativamente la carga presente en una muestra a estudiar. Existen múltiples métodos que permiten realizar el análisis y recuento de bacterias, estos se diferenciarán entre sí por el nivel de confiabilidad arrojado. Los métodos que posibilitan realizar solo el conteo de células viables serán los cuales proveerán información verídica. Las células viables serán entonces aquellas con la capacidad de dividirse generando unidades formadoras de colonias (UFC) que permitirán realizar el conteo y análisis correspondiente, requiriendo al menos 24 horas para el cultivo y la interpretación de resultados.^[1]

Para este procedimiento se emplean diferentes medios de cultivo ya sean basales, enriquecidos, selectivos y diferenciales, dependiendo de los microorganismos a cuantificar. Los métodos más usados en el ámbito microbiológico para el recuento de células viables son el recuento en superficie y el recuento en profundidad.

Superficie: Consiste en la siembra de un volumen conocido de la dilución de la muestra sobre la superficie de un medio de cultivo en caja de Petri. Cuando hay demasiadas UFC no permite un recuento adecuado. (En este método todas las UFC crecen sobre la superficie del medio). Generalmente se utiliza esta técnica para el recuento de bacterias aerobias. Se cuentan las diluciones en

la caja de petri en donde haya una proporción de UFC entre 30 y 300. ^[2]

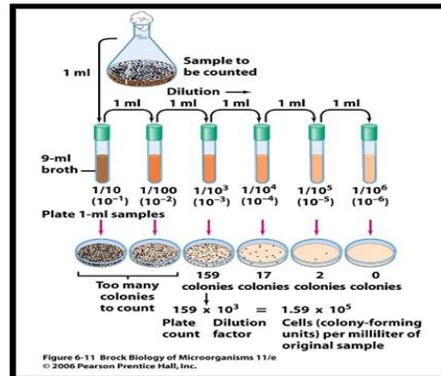
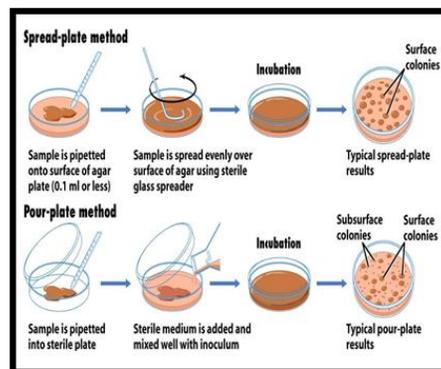


Fig. 1: Técnica de diluciones seriadas y recuento en placa (Tomado de Brock. Biología de los microorganismos).

Profundidad: Consiste en añadir medio de cultivo fundido y enfriado a 50°C sobre las cajas 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 UFC se desarrollan tanto dentro del agar como en la superficie). Es un método generalmente utilizado para el recuento de microorganismos anaerobios facultativos o microaerófilos. ^[2]



*¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. **Docente. Programa de Microbiología. Adalucy.alvareza@unilivre.edu.co. Universidad Libre Pereira.

Fig. 2: Técnica de recuento en superficie (arriba) y técnica de recuento en profundidad (abajo).

Bacillus subtilis:

Microorganismo cuyo hábitat natural es el suelo, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Entre sus principales características se encuentra su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55°C), presentar motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl), producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares.^[3]

Sacharomyces cerevisiae:

Microorganismo cuyo hábitat natural es el suelo, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Entre sus principales características se encuentra su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55°C), presentar motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl), producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares.^[4]

La cámara de recuento es un aparato de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Las cámaras de recuento se utilizan principalmente para contar bacterias, células como

espermatozoides o leucocitos y esporas de hongo.^[5]

MÉTODOLÓGÍA:

MATERIALES

Medios de cultivo: Caldo nutritivo, agar nutritivo y PDA (Potato Dextrosa Agar)

Equipos:

Autoclave
Balanza analítica
Cabina de bioseguridad
Mechero
Plancha de calentamiento
Cámara de Neubauer
Microscopio

Instrumentación y materiales:

Agua destilada
Asa bacteriológica redonda
Cajas de Petri desechables
Erlenmeyer
Probeta
Sharpie o marcador
Varilla agitadora

MICROORGANISMOS: *Bacillus subtilis* (Colección del laboratorio) y *Sacharomyces cerevisiae* (Cepa activada de levadura seca).

El objetivo de este proyecto de aula en la práctica de laboratorio consistió en identificar las diferentes técnicas de recuento para bacterias y levaduras.

Diluciones seriadas:

*¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. **Docente. Programa de Microbiología. Adalucy.alvarez@unilivre.edu.co. Universidad Libre Pereira.

Se tomaron 11 tubos de ensayo, cada uno tenía 9ml de Caldo nutritivo estos se marcaron del 1 al 11, posteriormente en el tubo 1 se colocó 1 ml de *Bacillus subtilis* y de *Saccharomyces cerevisiae*, luego en el tubo 2 se agregó 1ml del tubo 1; en el tubo 3 se añadió 1ml del tubo 2; este proceso se realizó hasta llegar al tubo 10. El tubo numero 11 fue tomado como control de viabilidad del aislamiento.

Siembra en superficie:

Se tomaron 11 cajas Petri cada una con 25 ml de agar nutritivo o PDA según el caso del microorganismo, estas se marcaron del 1 al 11. Luego de cada tubo se tomó 1 ml y se agregó a la caja Petri por duplicado, luego se distribuyo por medio de una asa de drigalski para extender la muestra (*Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*). La caja Petri numero 11 fue tomada como control de viabilidad.

Siembra en profundidad:

Se tomaron 11 cajas Petri, se marcaron del 1 al 11. De cada tubo se tomó 1 ml y se agregó a la caja Petri y despues se adicionaron 24 mL de agar nutritivo o PDA fundido según el caso. Se homogenizo por rotaiones en 8 durante 20 segundos. La caja Petri numero 11 fue tomada como control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La supervivencia y crecimiento continuo de microorganismos depende de un suministro adecuado

de nutrientes y un ambiente favorable para su crecimiento. Un medio de cultivo es una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de los microorganismos en condiciones favorables de pH y temperatura.

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de promover intencionalmente el desarrollo de éste, en medios de cultivo y condiciones favorables de laboratorio controladas.^[6]

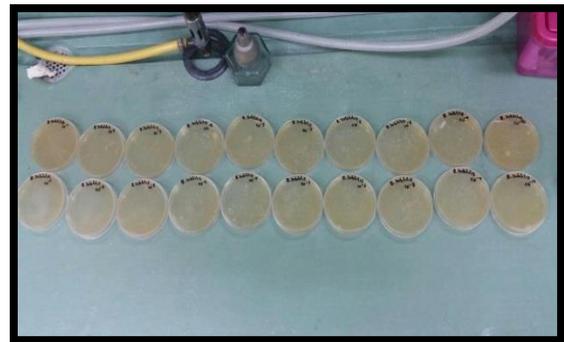


Fig. 1: Recuento en superficie de *Bacillus subtilis* con diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-10} .

Tabla 1: Resultados obtenidos en el recuento en superficie de *Bacillus subtilis*.

*¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. **Docente. Programa de Microbiología. Adalucy.alvareza@unilibre.edu.co. Universidad Libre Pereira.

Dilución	Cuantificación	UFC
10 ⁻¹	Incontable	-
10 ⁻²	Incontable	-
10 ⁻³	Incontable	-
10 ⁻⁴	Contable	30 - 300
10 ⁻⁵	Contable	30 - 300
10 ⁻⁶	Incontable	-
10 ⁻⁷	Incontable	-
10 ⁻⁸	Incontable	-
10 ⁻⁹	Contable	30 - 300
10 ⁻¹⁰	Contable	30 - 300

El recuento en superficie nos permitió conseguir placas con la carga bacteriana suficiente (Entre 30 y 300 UFC) para realizar el conteo y obtener un valor cercano o similar al real. En este proceso se presentó el error al momento de homogenizar la muestra en la caja Petri, por lo tanto las UFC quedaron muy agrupadas y por tal motivo no se pudieron obtener los resultados esperados. Ya que hubo más de una caja con 30 a 300 UFC. Lo que significa que se presentaron contaminaciones durante la siembra o realización de las diluciones.



Fig. 2: Recuento en profundidad de *Bacillus subtilis* con diluciones seriadas de 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰.

En los resultados en siembra por profundidad también se evidenciaron

errores, ya que no se encontraron las cajas con las diluciones desde 10⁻⁶ hasta 10⁻¹⁰. Lo que permite reconocer que el trabajo en el laboratorio debe ser ordenado para evitar estas circunstancias. A pesar de estos sucesos se pudo evidenciar que hubo una buena homogenización, además no se presentó contaminación gracias a que este fue servido en la cabina de bioseguridad.



Fig. 3: Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, en la parte superior siembra en profundidad y en la parte inferior siembra en superficie.

Tabla 3: Resultados obtenidos en el recuento en superficie de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dilución	Cuantificación	UFC
10 ⁻¹	Incontable	-
10 ⁻²	Incontable	-
10 ⁻³	Incontable	-
10 ⁻⁴	Incontable	-
10 ⁻⁵	Incontable	-
10 ⁻⁶	Contable	30 - 300
10 ⁻⁷	Incontable	-
10 ⁻⁸	Incontable	-
10 ⁻⁹	Contable	30 - 300
10 ⁻¹⁰	Contable	30 - 300

*¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. **Docente. Programa de Microbiología. Adalucy.alvarez@unilivre.edu.co. Universidad Libre Pereira.

En el caso del crecimiento de *S. cerevisiae* también se presentó contaminación. A menor dilución en la muestra mayor era el tamaño de las UFC, lo que significa que hay menor competencia por nutrientes. Por el contrario a mayor dilución en la muestra menor es el tamaño de las UFC, por lo tanto mayor competencia por nutrientes y espacio.

Tabla 4: Resultados obtenidos en el recuento en profundidad de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dilución	Cuantificación	UFC
10^{-1}	Incontable	-
10^{-2}	Incontable	-
10^{-3}	Incontable	-
10^{-4}	Incontable	-
10^{-5}	Incontable	-
10^{-6}	Incontable	-
10^{-7}	Incontable	-
10^{-8}	Incontable	-
10^{-9}	Incontable	-
10^{-10}	Incontable	-

Con los resultados de la Tabla 4 también se evidencia que la siembra en profundidad de *S. cerevisiae* también presentó contaminación.

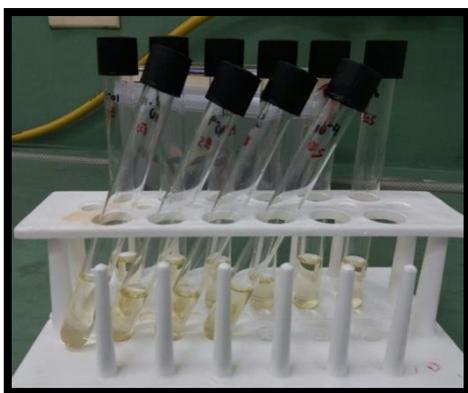


Fig. 4: Diluciones seriadas de *Bacillus subtilis*.

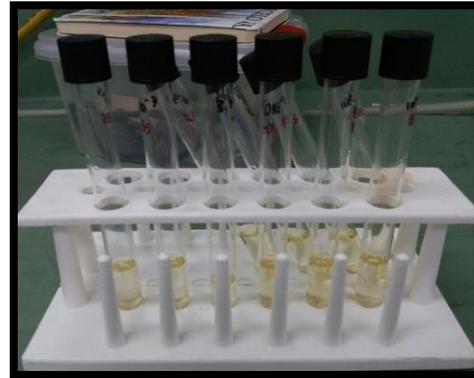


Fig. 5: Diluciones seriadas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En las figuras 4 y 5 podemos observar las diluciones seriadas de *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. La dilución 10^{-5} se utilizó para realizar el conteo en cámara de Neubauer.

0				
0	1	9		
0	1	7		
1	0	3	8	

2				
1	0	1		
6	5	1		
2	3	1	1	

2				
5	7	2		
3	5	1		
3	2	2	0	

0				
0	1	0		
0	0	1		
0	0	0	3	

Fig. 6: Recuento de *Saccharomyces cerevisiae* en Cámara de Neubauer.

*¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. **Docente. Programa de Microbiología. Adalucy.alvarez@unilibre.edu.co. Universidad Libre Pereira.

3				
2	4	3		
5	0	2		
4	4	2	4	

0				
4	3	0		
3	3	2		
1	2	3	1	

1				
6	3	3		
3	4	4		
1	2	1	4	

2				
1	4	3		
1	1	1		
0	4	2	2	

Fig. 7: Recuento del duplicado de *Saccharomyces cerevisiae* en Cámara de Neubauer.

En la figura 6 y 7 se puede evidenciar un rango entre 0-9 por lo cual comparando el original con el duplicado hubo variación muy pequeña.

20				
19	20	22		
25	22	28		
24	18	19	15	

20				
15	23	20		
21	22	25		
19	15	21	19	

20				
24	20	20		
20	20	25		
23	12	19	26	

21				
18	22	19		
27	21	23		
20	18	30	22	

Fig. 8: Recuento de *Bacillus subtilis* en Cámara de Neubauer.

19				
20	21	18		
20	20	20		
19	15	20	18	

19				
16	20	22		
20	25	19		
15	14	26	20	

19				
20	18	19		
20	18	28		
15	16	22	23	

22				
20	14	17		
20	25	19		
26	20	29	22	

Fig. 9: Recuento del duplicado de *Bacillus subtilis* en Cámara de Neubauer.

En la figura 8 y 9 se puede evidenciar que hubo un rango entre 12-30 por lo cual comparando el original con el duplicado hubo variación muy pequeña.

CONCLUSIONES

- Los procedimientos de recuento en superficie o profundida requieren gran inversión de tiempo y materiales y pueden verse afectados por las destrezas del laboratorista. En este primer acercamiento a las técnicas de recuento evidenciamos las dificultades para mantener la zona libre de contaminantes externos.
- La siembra en superficie y profundidad permiten evaluar los microorganismos viables no así las técnicas de recuento en

*¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. **Docente. Programa de Microbiología. Adalucy.alvareza@unilibre.edu.co. Universidad Libre Pereira.

camara de Neubauer en donde no se distinguen las células vivas de las muertas y da margen para sobrestimar la población microbiana.

BIBLIOGRAFÍA

[1]González, José Esteban Padilla. 2007.

<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis15.pdf> (último acceso: 17 de Noviembre de 2017).

[2]Mendez, Diana. *Scribd.* s.f.

<https://es.scribd.com>. (último acceso: 17 de Noviembre de 2017).

[3]Espinosa, José Joel. *Instituto de Biotecnología.* Febrero de 2005.

<http://www.ibt.unam.mx/alfredo/JoelEspinosa.pdf> (último acceso: 17 de Noviembre de 2017).

[4]Bethany J. Antos, Mercè Álvarez, M^a Soledad Alonso. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).* s.f.

<http://seresmodelicos.csic.es/ll evat.html> (último acceso: 17 de Noviembre de 2017).

[5] Anónimo. *Laboratory Glassware.* s.f.

<file:///C:/Users/Hogar/Downloads/2010-Marienfeld-info-camaras-de-recuento.pdf> (último acceso: 17 de Noviembre de 2017).

[6] Hidalgo, Erika Beatriz Álvarez. *Slideshare.* 11 de Septiembre de 2013. <https://es.slideshare.net/rebecaoloarte/tecnicas-de-siembra-de-microorganismos> (último acceso: 17 de Noviembre de 2017).

*¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Adalucy.alvareza@unilibre.edu.co. Universidad Libre Pereira. **Docente. Programa de Microbiología.