

Capítulo 5

Recuento de microorganismos

Objetivo

Determinar la cantidad de microorganismos por unidad de volumen presentes en una muestra dada a través de técnicas básicas.

Introducción

Cuando a los microorganismos se les provee con nutrientes y los factores ambientales requeridos, se activan metabólicamente y crecen. El crecimiento se da en dos niveles. En un primer nivel, las bacterias sintetizan nuevos componentes celulares y aumenta su tamaño, en el otro nivel el número de células incrementa. Esta capacidad para multiplicarse amplía el tamaño de la población por división celular.

Métodos de crecimiento microbiano

El crecimiento de una población microbiana se mide siguiendo los cambios en el número de células o el peso de la masa celular.

Existen diversos métodos para contar el número de células o para estimar la masa celular dependiendo de los microorganismos de que se trate (Jensen, 1968; Jennings, 1995; Madigan et al., 2004).

1. Métodos directos:

- Recuento microscópico directo.

- Recuento en placa: diluciones y siembra.
- Método del número más probable (NMP).
- Filtración.

Otros métodos directos:

- *Determinación del peso húmedo:* se toma un tubo de centrífuga, se centrifuga el cultivo y se elimina el sobrenadante. Se determina el peso del sedimento.
- *Determinación del peso seco:* el procedimiento inicial es igual al anterior, pero el sedimento se seca antes de ser pesado (105 °C, durante toda la noche), hasta peso constante. Esta medida suele representar el 10-15 % de los valores de peso húmedo.
- *Determinación del nitrógeno total:* técnica de micro-Kjeldahl.
- *Determinación de un componente característico:* peptidoglucano, ADN, AR, proteínas, ATP, clorofilas en microorganismos fotosintéticos, etc.

2. Métodos indirectos:

- Turbidimetría (ópticos).
- Actividad metabólica.
- Medida de consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito por unidad de tiempo. Ejemplos: consumo de oxígeno (QO_2) y consumo de carbónico (QCO_2), determinados por el respirómetro de Warburg. Producción de ácidos.

5.1 Recuento microscópico directo

Objetivo

Realizar conteo directo de microorganismos en cámara de conteo.

Introducción

Este método permite determinar el número de células microbianas, por observación a través del microscopio. La muestra puede utilizarse tal cual, (leche, o cultivos puros en medio líquido), o puede prepararse una dilución tal como se realiza para otros métodos de recuento.

Se basa en contar microorganismos en una cantidad conocida de muestra utilizando frotis coloreados, cámaras del tipo de las de contar glóbulos, o las especialmente diseñadas para contar hongos en alimentos como la cámara de Howard.

Se determina el número TOTAL de células presentes (VIALES Y NO VIALES) Ocasionalmente se pueden utilizar colorantes que indiquen diferentes estados metabólicos de las células. Por ejemplo en un recuento en cámara de un cultivo de levaduras con azul de metileno, se pueden distinguir las células VIALES (no absorben el colorante, se verán transparentes) de las NOVIALES (absorben el colorante y se verán azules).

Para el conteo directo de células bacterianas se utilizan cámaras (cámara de Petroff-Hausser o cámara de Neubauer). Se trata de portaobjetos gruesos con dos cuadrículas separadas por surcos.

Cámara de Neubauer

En la Figura 24 se muestra una de las cuadrículas, que tiene 9 cuadrados de 1 mm^2 de área y una profundidad de 0.1 mm. Los cuadros esquineros están subdivididos en 16 cuadrados secundarios (señalizados con X) y el cuadro central (señalizado con Z) está subdividido en 25 cuadrados secundarios y cada uno de ellos subdividido en 16 cuadrados terciarios.

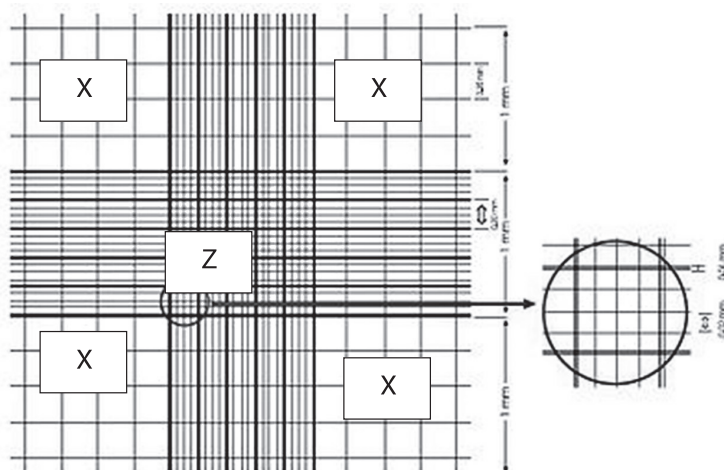


Figura 24. Esquema de la cuadrícula de la cámara de Neubauer.

Fuente: cámara de Neubauer en Wikipedia

Para el recuento de células pequeñas, por ejemplo, para bacterias se tiene en cuenta el cuadrado central de 25 cuadrados secundarios.

Para el recuento de células mayores a 15 μm , tipo esporas de hongos, algas, protozoarios, se realizan en los cuadrados esquineros

Materiales

Cultivo de bacterias en medio líquido de 12 a 24 horas de crecimiento

Cámara de Neubauer

Laminillas de cuarzo

Pipetas Pasteur estériles

Pipeta de 1 ml estéril

Micropipeta

Etanol al 70 %

Tubos con 9 ml de formaldehído al 37 % en NaCl al 0.85 %

Procedimientos

Recuento microscópico directo

1. Homogenice el cultivo.
2. Realice diluciones 1/10 (tome 1.0 ml de la suspensión bacteriana y viértala sobre los 9 ml de formaldehído al 37 % en NaCl al 0.85 %).
3. Agite el tubo y tome con una pipeta Pasteur o con una micropipeta (40-50 μl) la muestra de la dilución.
4. Coloque la laminilla de cuarzo y cargue por capilaridad el volumen requerido, depositando suavemente la muestra en el borde de la laminilla o ranura.
5. Se debe depositar muestra en las dos cuadrículas de la cámara.
6. Enfoque en menor aumento para ubicar la cuadrícula y pase al objetivo de 40x.
7. Cuente 5 cuadrados del cuadrado central, que contiene 25 cuadrados secundarios, tal como se muestra en la Figura 25.

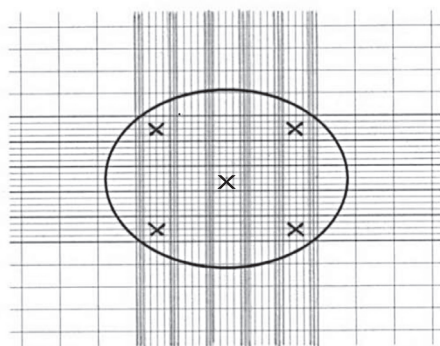


Figura 25. Esquema de la cuadrícula central de la cámara de Neubauer.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

8. Para obtener el número de microorganismos contados en los 5 cuadrados, tenga en cuenta la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{ml}} = \frac{\text{promedio del número de células x 5 cuadrados}}{\text{Factor de dilución x } 10^{-4} \text{ cm}^3}$$

El valor 10^{-4} cm^3 corresponde al volumen que contiene los 5 cuadrados contados.

5.2 Método de recuento en placa

Objetivos

- Determinar el número de bacterias viables en muestras de aguas, suelos o alimentos.
- Adquirir destrezas en el método de recuento en placa.

Introducción

El enfoque más corriente para aislar y ponderar microorganismos en diferentes hábitats consiste en la técnica de recuento en placa. Este método lo introdujo Robert Koch y posteriormente ha sido evaluado por numerosos investigadores (Brierley, Jewson & Brierley, 1928; Warcup, 1955a, 1955b; Taylor, 1962; Jensen, 1968; Grigorova & Norris, 1990; Parkinson & Coleman, 1991; APHA, 2004).

Fundamento

El método de recuento en placa es un procedimiento cuyo objeto consiste en calcular el número de bacterias vivas que existe en una muestra.

Las colonias pueden surgir en pares, cadenas, grupos o células únicas, todas ellas englobadas bajo el término de unidades formadoras de colonias (UFC).

Para conteos generales de bacterias y hongos se usan los medios de cultivos: agar placa de conteo (agar Plate Count), agar extracto de malta (hongos).

Preparación de la muestra

Se requiere preparar diluciones de la muestra y para la cuantificación se utiliza la siembra en un medio sólido.

1. Preparación de las diluciones seriadas:

Solución diluyente: las primeras técnicas recomendaban agua, solución salina, solución de Ringer, etc. Finalmente se recomendó la utilización de agua peptonada (ICMSF, 1978), solución salina peptonada o el tampón de fosfatos (APHA, 2004, APHA, AWWA, WEF 2005).

2. Siembra de la muestra:

Para la siembra de las diluciones se utilizan dos métodos:

- *Método de extensión o superficie* (Olsen & Bakken, 1987): consiste en la dispersión uniforme de la alícuota de la dilución sobre el medio sólido (Figura 26).
- *Siembra por vertido en placa o en profundidad*: o incorporación del medio de cultivo sobre la alícuota de la dilución que se ha servido previamente en la caja de Petri vacía (Figura 27).

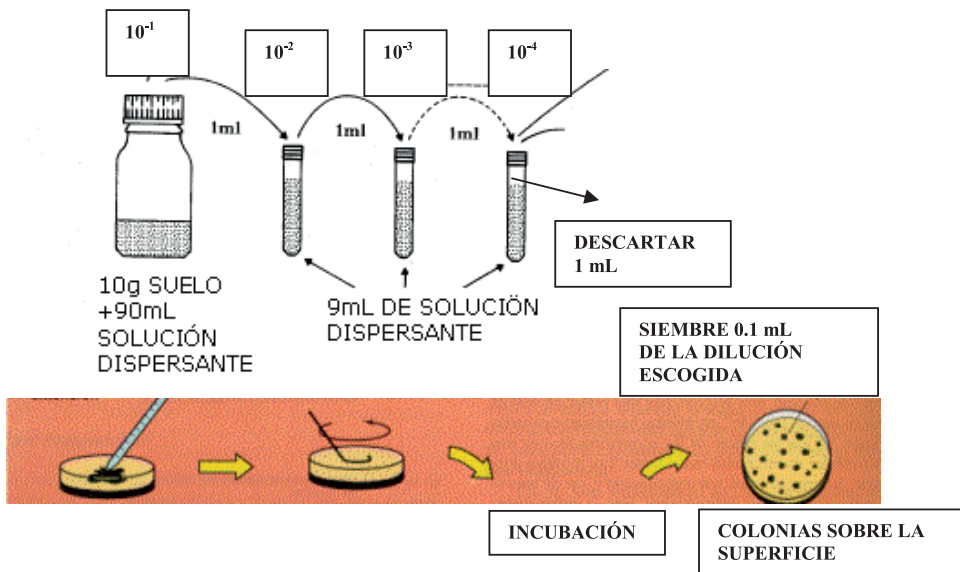


Figura 26. Método de extensión o superficie.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

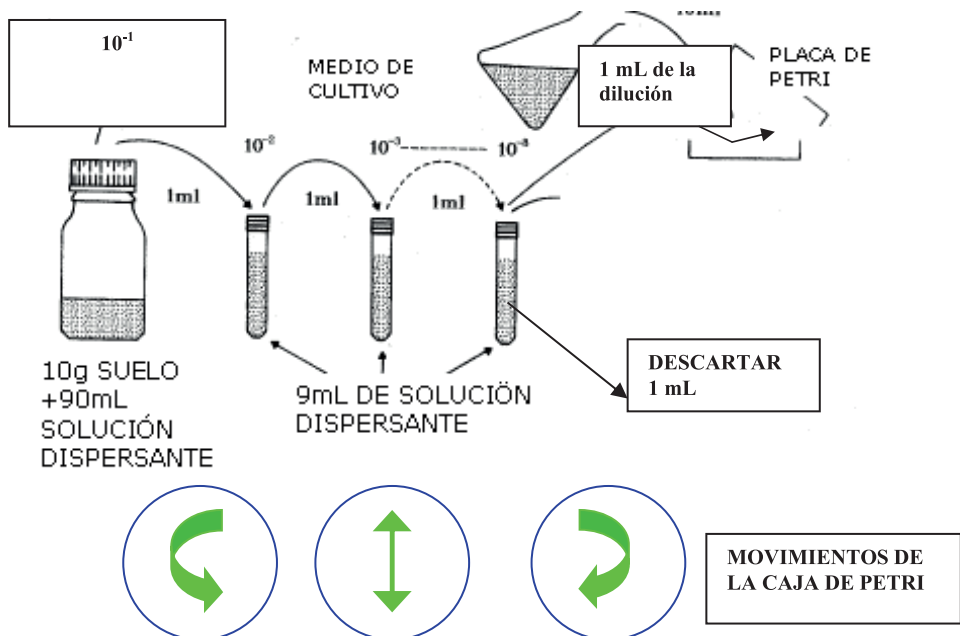


Figura 27. Siembra por vertido en placa o en profundidad.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

Materiales

Frascos con 90 ml de solución salina al 0.85 %

Tubos de ensayo con 9 ml de solución salina al 0.85 %

Cajas de Petri con medio de cultivo agar Plate Count Merck®) (composición del medio PCA:(g/l): peptona de caseína 5.0, extracto de levadura 2.5, D-glucosa 1.0, agar-agar 14.0, agua destilada 1000 ml. PH 7.0± 0.1)

Asas de Drigalsky o rastrillos estériles

Pipetas estériles de 1, 5 y 10 ml

Pesasustancias

Gradillas

Balanzas

Espátulas

Pipeteadores

Mecheros

Muestras de aguas, suelo, compost.

Procedimiento

Diluciones y siembra en superficie

(Véase Figura 26).

Preparación de las diluciones:

1. Marque los tubos y las placas de Petri.
2. Pese 10 gramos de la muestra sólida o mida 10 ml de la muestra líquida.
3. Transfiera a un frasco con 90 ml de solución salina, y homogenizar (el tiempo de homogenizar dependerá del tipo de muestra por analizar). Este paso da lugar a la dilución 10^{-1} .
4. Pipetee 1 ml de la primera dilución (10^{-1}) y deposite en un tubo que contiene 9 ml de la solución diluyente (este paso da lugar a la dilución 10^{-2}).
5. Agite la dilución anterior (10^{-2}), tome 1 ml y deposítela en un tubo que contiene 9 ml de la solución diluyente (este paso da lugar a la dilución 10^{-3}).

6. Agite la dilución anterior (10^{-3}), tome 1 ml y deposítela en un tubo que contiene 9 ml de la solución diluyente (este paso da lugar a la dilución 10^{-4}).

Cada vez que se prepara una dilución es necesario homogeneizarla adecuadamente para lograr una distribución de los microorganismos en todo el volumen de dilución. Esto se logra por agitación (si es un frasco se agita haciendo un movimiento de inversión durante 25 veces, si es un tubo puede emplearse un vortex).

Siembra de la muestra

Una vez preparadas las diluciones, se siembra dentro de los 15 minutos siguientes.

Método de extensión o superficie (Olsen & Bakken, 1987):

1. Coloque 0.1 ml de cada dilución (empezando con la dilución más alta, que previamente se le ha extraído un ml, en este caso dilución 10^{-4}), en placas de Petri que contienen 15 ml del medio solidificado (utilizar dos a tres placas de Petri por dilución).
2. Para que la muestra quede lo más extendida posible y uniforme en la superficie del medio, se hace girar la placa de manera rotatoria, a la vez que se extiende la muestra con el rastrillo.
3. Incube las placas de Petri (la temperatura dependerá del tipo de muestra) por 48-72 horas. Sacar de la incubadora y realizar el recuento con la ayuda del cuentacolonias.

Siembra por vertido en placa o profundidad

1. De las diluciones preparadas previamente, se procede de la dilución mayor a la menor, y se deposita 1 mL de cada dilución en placas estériles, vacías, por duplicado.
2. Posteriormente, se agrega a cada placa 15 a 20 mL del medio de cultivo a emplear, previamente fundido y termostatizado a 45°C en baño o estufa cuidando de no volcar agar fuera de la placa o sobre la tapa de la misma.
3. Se agita suavemente moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimiento circular, horario y antihorario y hacia delante y atrás (Figura 27).

Lectura:

El recuento se realizará en las placas que tengan entre mayor a 30 y menor a 300 colonias.

Cálculo del número de unidades formadoras de colonias en la muestra procesada (UFC):

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml o g}} = \frac{\text{promedio número de colonias en las placas de Petri}}{\text{dilución que fue usada para la siembra}}$$

Ejemplo:

En las dos placas de Petri de la dilución 10^{-4} tuvimos un promedio de 50 colonias:

$$\frac{50}{10^{-4}} = 50 \times 10^4 = 500000 = 5 \times 10^5 \text{ U.F.C. / g o ml de muestra}$$

Una vez hecho el recuento y los cálculos, complete el siguiente cuadro:

Placa de Petri	Número de colonias	U.F.C./g o ml
Caja número 1		
Caja número 2		

5.3 Método del número más probable (NMP)

Objetivos

- Estimar el número de microorganismos, aplicando la técnica del número más probable.
- Adquirir destrezas en el método del número más probable.

Introducción

El fundamento del número más probable o el método de tubos múltiples o de extinción de muestras por diluciones, se basa en la presencia o ausencia de microorganismos en una serie de diluciones consecutivas de la muestra, con la interpretación de los resultados como un estimativo de la probabilidad del número de microorganismos en una tabla estadística.

Por consiguiente, solo es una estimación estadística de la concentración de microorganismos viables en una muestra. Es un concepto estadístico derivado de la teoría de probabilidades aplicada a la numeración de microorganismos bajo ciertas condiciones.

Hay varias modalidades de siembra (medio de cultivo líquido) APHA, 2004, 2005:

- Técnica con 10 tubos y cada tubo con 10 ml de muestra.
- Técnica con 5 tubos y cada tubo con 10 ml de muestra.
- Técnica con 15 tubos y en cada 5 tubos con 10 ml, 1.0 ml, 0.1 ml de muestra.
- Siembra de diluciones decimales de la muestra en (agua, solución salina o agua peptonada) en dos, tres o cinco tubos (Figura 28).

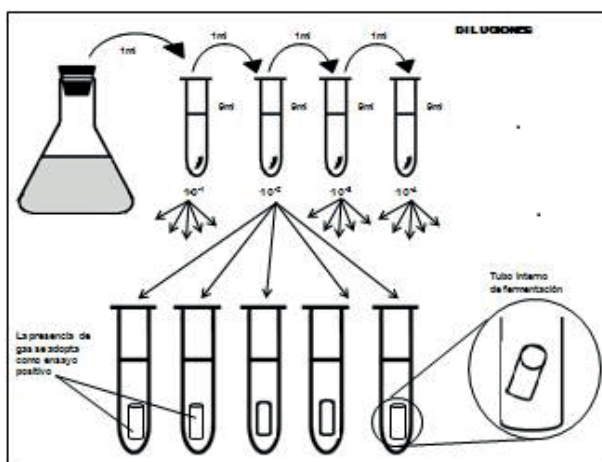


Figura 28. Método del número haciendo uso de 5 tubos por dilución.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

En el caso de una muestra de agua se debe tener en cuenta:

- *Cuando se analiza agua potable (aguas naturales y efluentes)* para determinar si su calidad cumple con las normas de los organismos gubernamentales, se utilizan 5 tubos de 10 ml de muestra en cada tubo o 10 tubos con 10 ml de muestra en cada tubo.
- *Cuando se analiza agua no potable*, se utilizan cinco tubos con diluciones decimales de la muestra de agua (10, 1, 0.1 ml).
- *Otras muestras*: esta técnica también se puede utilizar para el análisis de aguas saladas, lodos, sedimentos y fangos.

Criterios de lectura

La lectura del NMP depende del medio de cultivo utilizado y de los microorganismos investigados. Son parámetros frecuentes:

- Producción de gas en una reacción positiva, se observan las burbujas de gas en el tubo de Durham.
- Cambio de color, turbidez, formación de películas.
- Transformación del medio que sea detectable mediante prueba química.

Resultados

Una vez determinada la positividad de los tubos sembrados, los tubos con las replicaciones se colocan de izquierda a derecha de mayor a menor concentración (dilución más baja a la más alta).

La combinación de los resultados positivos configura un código que se busca en una tabla de probabilidad.

Los resultados se expresan como número más probable por 100ml (NMP/100 ml)

Número más probable para la identificación de coliformes

El grupo de coliformes está formado por todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, Gram negativas, no formadoras de esporas y con forma bacilar que fermentan la lactosa, produciendo gas y ácido en 48 horas a 35 °C. Constituyen solo una parte de la microbiota total del tracto gastrointestinal.

La prueba se realiza en tres etapas que se denominan prueba presuntiva, prueba confirmativa y prueba complementaria o completa.

Materiales

Frasco de dilución de 90 ml de agua peptonada al 0.1 %

Tubos de ensayo con 9 ml. de agua peptonada al 0.1 %

Pipetas estériles de 1 y 5 ml o micropipetas

9 tubos con 10 ml de caldo Brila con tubo de fermentación (campana Durham) para la prueba presuntiva y 9 tubos para la prueba confirmativa

Agua triptona

Cajas con agar eosina azul de metileno (EMB comercial)

Reactivo de Kovacs

Incubadora a 35 °C

Balanza

Gradillas

Espátulas

Asa de siembra

Mecheros

Muestra de agua

Procedimiento

Nota: observar si los tubos de caldo lactosado están con turbidez o burbujas en la campana de Durham antes de inocularlo.

a. *Prueba presuntiva*

1. Mezclar y medir 100 ml de la muestra en una probeta estéril.
2. Hacer diluciones de la muestra.
3. Transfiera 1.0 ml de cada dilución, iniciando desde la dilución 10^{-3} continuando con las diluciones 10^{-2} y 10^{-1} a 2 tubos de caldo lactosado.

4. Incubar los tubos a 35°C durante 24 – 48 horas.
5. Evalué los tubos positivos para turbidez y producción de gas y anote el resultado.
6. Registre el número de tubos positivos y halle el número más probable de coliformes totales según la tabla de NMP.

b. *Prueba confirmativa*

1. De cada tubo positivo (que presente gas) en caldo lactosado de la prueba de coliformes totales, inocular con asa un tubo con caldo lactosado y un tubo con agua de triptona.
2. Incubar a 44 °C durante 24 horas.
3. Observar la formación de gas en caldo lactosado.
4. Efectuar prueba de indol sobre el agua de triptona.
5. Los tubos con producción de gas y reacción de indol positiva, se tienen en cuenta como coliformes fecales.

c. *Prueba total*

1. Resembrar de los tubos que presentaron gas en la prueba confirmativa en cajas con agar EMB e incubar a 35 °C durante 24 horas.
2. Tomar una o más colonias típicas y hacer pruebas bioquímicas para la caracterización de *E coli*.

Tabla 4. Número más probable con dos tubos por dilución

Número significativo	NMP	Límites de confianza (95 %)
000	0.0	
001	0.5	0.076-3.3
010	0.5	0.076-3.3
011	0.9	0.14-6.0
020	0.9	0.14-6.0
100	0.6	0.091-4.0
101	1.2	0.18-7.9
110	1.3	0.20-8.6
111	2.0	0.20-13
120	2.0	0.30-13
121	3.0	0.45-20
200	2.5	0.38-16
201	5.0	0.76-33
210	6.0	0.91-40
211	13.0	7.0-86
212	20.0	3.0-130
220	25.0	3.8-160
221	70.0	11-460
222	110.0	17-730

Medios de cultivoCaldo- Lauril triptosa: (Merck®)

Triptosa	20 g
Lauril sulfato de sodio	0.1 g
Lactosa	5 g
Fosfato de hidrógeno dipotasico (K_2HPO_4)	2.75 g
Fosfato de dihidrógeno potasico (KH_2PO_4)	2.75 g

NaCL	5 g
Agua destilada	1000 ml
PH 6.8± 0.1	
<u>Caldo lactosa-peptona: (Merck®)</u>	
Peptona de caseina	5 g
Peptona de harina de soja	3 g
Lactosa	10 g
NaCL	5 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Agua destilada	1000 ml
PH 7.2± 0.1	

Caldo Brila (caldo de bilis verde brillante lactosa) Merck®

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Verde brillante	0.0133 g
Bilis de buey desecada	20 g
Agua destilada	1000 ml
PH 7.2± 0.1	

5.4 Filtración por membrana

Objetivo

Adquirir conocimientos sobre el manejo del sistema de filtración por membrana.

Introducción

La técnica de filtración por membrana (**véanse** figuras 29 y 30) consiste en hacer pasar un volumen conocido de muestra líquida a través de un filtro de

membrana que tiene un tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$. Los microorganismos son retenidos sobre el filtro, ya que son de mayor tamaño que los poros del filtro de membrana. El filtro de membrana que contiene los microorganismos se pone entonces en contacto con el medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Después de la incubación, las colonias son contadas y se calcula la concentración de estas en la muestra original del agua.

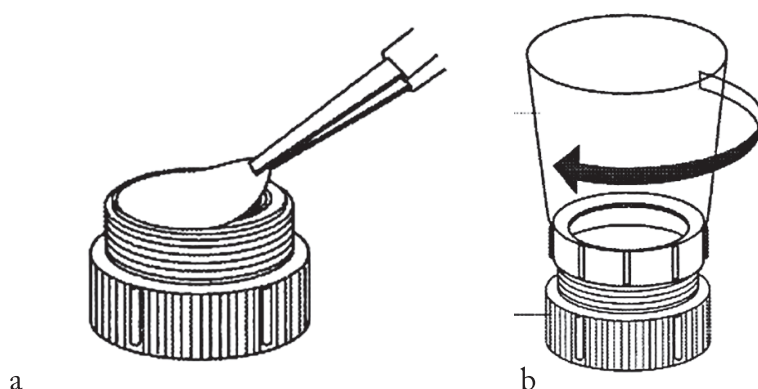


Figura 29. Filtración por membrana (a) Forma de colocar la membrana (b) colocación del embudo sobre la base.

Fuente: manual del equipo MarcaBarnant[®] del Laboratorio Grupo Biología Ambiental

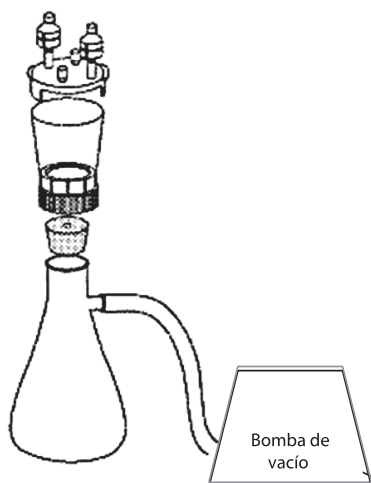


Figura 30. Sistema de filtración completo.

Fuente: manual del equipo Marca Barnant[®] del Laboratorio Grupo Biología Ambiental

Materiales

Cajas de Petri con agar EMB o Cromocult

Membranas de 0,45 μm

Pinzas

Probeta de 100 ml estéril

Alcohol al 70 %

Equipo de filtración estéril con bomba de vacío

Muestra de agua

Procedimientos

1. Desenrosque el embudo de la base y coloque la membrana con el retículo hacia arriba haciendo uso de la pinza previamente desinfectada en alcohol (Figura 29a).
2. Enrosque nuevamente el embudo en la base.
3. Homogenice la muestra de agua y mida 100 ml en una probeta estéril.
4. Coloque los 100 ml de muestra en el embudo.
5. Aplique vacío hasta que la muestra se haya filtrado.
6. Cierre el vacío y desenrosque el embudo y retire con la pinza estéril la membrana con mucho cuidado.
7. Coloque la membrana con el retículo hacia arriba en el medio de cultivo.
8. Incube el medio de cultivo invertido a 35 °C por 22-24 horas
9. Cuente el número de colonias sobre la membrana e informe como UFC/100 ml de muestra

5.5 Turbidimetría (curva de crecimiento)

Objetivos

- Adquirir conocimientos para distinguir las diferentes fases de la curva de crecimiento.

- A partir de los datos obtenidos en el laboratorio, realizar las gráficas correspondientes en papel milimetrado y semilogarítmica.

Introducción

El crecimiento se ha definido como un aumento en la masa en una población. La duplicación de un cultivo bacteriano sigue los principios básicos de una reacción de primer orden con relación al número de células existentes. Las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua (efecto Tyndall). La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo.

Con el fin de evaluar el comportamiento de un cultivo bacteriano en el tiempo, se construyen las curvas de crecimiento, que son la representación gráfica de algún parámetro que mida el crecimiento equilibrado en función del tiempo. Además sirve para evaluar la cantidad de cualquier componente del sistema como ADN, ARN o proteínas.

A menudo, el crecimiento bacteriano se describe mediante otros parámetros entre los cuales el más frecuente es el tiempo de duplicación o tiempo de generación, que es el tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos células.

La relación que existe entre el número de células y las generaciones de un cultivo creciendo en forma exponencial, puede deducirse matemáticamente de la manera siguiente:

x = número de bacterias al tiempo 0

y = número de bacterias al tiempo t

t = tiempo en crecimiento exponencial

Al tiempo 0 $y = x$

Después de:

1 generación $y = x \cdot 2$

2 generaciones $y = (x \cdot 2) \cdot 2 = 2^2 \cdot x$

3 generaciones $y = (2^2 \cdot x) \cdot 2 = 2^3 \cdot x$

n generaciones $y = 2^n x$ (Ecuación 1)

Para calcular n = (número de generaciones). Resolviendo la ecuación (1) para n se tiene:

$$\log y = \log x + n \log 2$$

Si se sustituye en la ecuación anterior $\log 2$ por su valor 0.3010, se tiene que $1/0.3010 = 3.3$

$$n = 3.3 \log y/x$$

El tiempo de generación G es igual a t (tiempo transcurrido en fase exponencial para llegar de x a y) dividido por el número de generaciones n, o sea:

$$G = t/n$$

Espectrofotómetro

Este aparato es de uso habitual en cualquier laboratorio de microbiología o bioquímica. Mide la densidad óptica (DO), es decir, la absorbancia (una medida de la luz transmitida a través de la suspensión).

Nefelómetro

Es un aparato similar al anterior, pero el dispositivo sensor está situado en ángulo recto respecto de la dirección de la luz incidente, y lo que se mide es la luz dispersada directamente por la preparación. Posee mayor sensibilidad que el espectrofotómetro.

Espectrofotometría

La luz es de doble naturaleza, corpuscular y ondulatoria. Con base en su carácter ondulatorio la luz se comporta como una onda y cumple las leyes que rigen los movimientos ondulatorios: es reflejada, difractada, transmitida etc., está formada por un componente eléctrico y otro magnético, es decir, es electromagnética. Estos componentes son vectores perpendiculares entre sí. Con base en la naturaleza corpuscular, se considera que esta está formada por pequeños “corpúsculos” energéticos que se mueven en el espacio generando las ondas.

Espectro electromagnético

Se denomina espectro de un rayo luminoso al conjunto de radiaciones monocromáticas que forman ese rayo cuando ya han sido separadas.

Rango visible

Es el rango de radiaciones con longitudes de onda entre 400 y 700 nm, conforma el denominado rango visible humano.

Leyes que rigen la absorción de radiaciones electromagnéticas

La absorción de luz por una solución depende de la potencia de la radiación incidente (P_o). A mayor potencia incidente, mayor será la potencia transmitida (P_t). La relación entre la potencia transmitida y el incidente se denomina transmitancia (T). La transmitancia se expresa con relación a 1 o a 100.

$$T = \frac{P_t}{P_o} \quad \text{o} \quad \%T = \frac{P_t}{P_o} \times 100$$

Se ha definido otra variable que es de mucha utilidad, que se denomina absorbancia. Cuando un rayo luminoso monocromático incide sobre un medio, este es absorbido siempre y cuando corresponda a su longitud de máxima absorción.

$$A = 2 - \log \%T$$

A medida que se explica el espectrofotómetro, escriba las diferentes partes del equipo en la Figura 31.

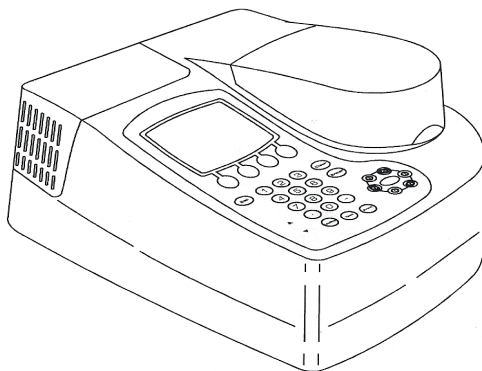


Figura 31. Espectrofotómetro.

Fuente: manual del equipo marca Genesys® del Laboratorio del Grupo de Investigación Biología Ambiental UPTC

Materiales

- Cultivo en BHI de *E. coli* cepa de referencia de 24 horas de crecimiento
- Caldo BHI comercial
- Pipetas de 5 ml estériles
- Espectrofotómetro
- Parafilm®
- Cubetas
- Incubadora

Procedimiento

Nota: el equipo debe ajustarse a **600 nm**

Preparación de las diluciones seriadas a partir de la suspensión bacteriana en BHI de *E. coli* de 24 horas de crecimiento:

1. Adicione 4 ml de caldo BHI estéril en 4 tubos marcados (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16).
2. Coloque 4 ml de Cultivo en BHI de *E. coli* de 24 horas de crecimiento en el tubo marcado como 1/2, mezcle y tome 4 ml de este tubo y deposítelo en el tubo marcado 1/4, y a continuación realice las dos siguientes diluciones.
3. La lectura en el espectrofotómetro se realiza llevando el equipo a cero de absorbancia y 100 % de transmitancia con la cubeta blanca (BHI estéril).
4. Realice la lectura de las 4 diluciones y anote el valor obtenido en la siguiente tabla:

Diluciones	Absorbancia	Transmitancia
1:2		
1:4		

Diluciones	Absorbancia	Transmitancia
1:8		
1:16		

5. Una vez realizadas las lecturas de los diferentes tiempos de crecimiento, realice la curva.

Curva de crecimiento a partir de 50 ml de BHI con preinóculo al 1% de E.coli

1. A 50 ml de caldo BHI estéril adicione el preinóculo de la *E. coli* al 1%. Mezcle
2. Tome de los 50 ml del BHI y rellene una cubeta y realice la lectura en el espectrofotómetro
3. Lleve el caldo de BHI a la incubadora a 37°C.
4. Realice lecturas mezclando previamente el BHI antes de servir la cubeta a los 20, 40 minutos, 1h, 1 h 20 minutos, 1 h 40 minutos, 2h, 2 h 20 minutos, 2 h 40 minutos, 3 h.

Nota: en los intervalos de tiempo en que no se estén realizando lecturas, el BHI debe mantenerse en la incubadora a 37°C.

5. La lectura en el espectrofotómetro se realiza llevando el equipo a cero de absorbancia y 100 % de transmitancia con la cubeta blanca (BHI estéril).
6. La lectura se anotan en la siguiente tabla:

Tiempo	Absorbancia	Transmitancia
0		
20 min		
40 min		

Tiempo	Absorbancia	Transmitancia
1 hora		
1 hora 20 min		
1 hora 40 min		
2 horas		
2 horas 20 min		
2 horas 40 min		
3 horas		

7. Una vez realizadas las lecturas de los diferentes tiempos de crecimiento, realice la curva.

