

## Centro Universitario de Estudios Medioambientales:

Seminarios de la reunión semanal del CUEM.

Fecha: 13-03-23

Expositor: Melina Neira

Tema: Análisis Microbiológico del Agua.

### Introducción:

El Código Alimentario Argentino (CAA), define como agua potable aquellas aguas que son aptas para la alimentación y uso doméstico. Es de gran importancia controlar, además de la calidad química, las características microbiológicas del agua de consumo. Microorganismos patógenos que pueden estar presentes en aguas contaminadas están vinculados a enfermedades gastrointestinales, cólera, disentería, fiebre tifoidea, poliomielitis, entre otras.

El análisis microbiológico del agua consiste en realizar 4 determinaciones:

- Recuento de bacterias mesófilas viables.
- Recuento de bacterias coliformes totales.
- Presencia o ausencia de Escherichia coli.
- Presencia o ausencia de Pseudomona aeruginosa.

### Recolección de la muestra:

Se realiza en recipiente estéril de plástico o vidrio. Las muestras deben mantenerse refrigeradas hasta su procesamiento con un tiempo máximo de 72h desde su recolección.

### Materiales y equipamiento:

- Placas de Petri
- Tubos de ensayo
- Tapones para microbiología
- Campanas de Durham
- Asa bacteriológica
- Mechero
- Frascos de vidrio para microbiología
- Medios de cultivo
- Autoclave
- Estufa
- Material de uso común (micropipetas, balanzas, elementos de bioseguridad, etc.)

### Procedimiento:

#### 1- Preparación medios de cultivos, según indicaciones del fabricante:

- Medio de cultivo Agar Plate Count (APC).
- Medio de cultivo Agua peptonada 0,1%.
- Medio de cultivo Mac Conkey.
- Medio de cultivo Verde de Malaquita para Pseudomonas.

#### 2- Esterilización:

Colocar 4l de agua en el fondo del autoclave. Envolver en papel madera las tapas de tubos y frascos. Introducir en el autoclave los tubos de agua peptonada y caldo Mac Conkey, el frasco de APC y el de verde malaquita. Tapar y encender. Una vez que la temperatura llegue a 121°C controlar 15 min. Se corrobora la correcta esterilización cuando las campanas de Durhan se encuentran sin aire y en el fondo de los tubos.

#### 3- Determinaciones:

##### Recuento de bacterias mesófilas viables:

Este grupo incluye los microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno a una temperatura entre 20°C y 45°C. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, así como un recuento elevado no significa presencia de microbiota patógena.

- Preparación de las diluciones seriadas:

Dilución	Muestra (ml)	Agua Peptonada 0.1% (ml)	Vol. Final (ml)
$10^{-1}$	1ml	9	10
$10^{-2}$	1ml de $10^{-1}$	9	10
$10^{-3}$	1ml $10^{-2}$	9	10

- Siembra en profundidad, realizar en placas Petri según tabla (ejemplo para una muestra):

Solución	Volumen (ml)	Medio APC (ml)
10 <sup>-1</sup>	1	15-20
10 <sup>-2</sup>	1	15-20
10 <sup>-3</sup>	1	15-20
Agua Peptonada 0.1% (control diluyente)	1	15-20
Medio APC (control medio)	1	15-20

- Mezclar, dejar solidificar, invertir las placas e incubar a 37°C por 24 h.

- Realizar el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en aquellas placas de Petri que tengan entre 30-300 UFC.

#### Recuento de bacterias coliformes totales:

El grupo coliformes totales (CT) está integrado por 4 géneros principalmente: Enterobacter, Escherichia, Citrobacter y Klebsiella. Son bacilos Gram-negativos capaces de fermentar la lactosa con producción de gas dentro de las 48 h de incubación a 37 °C.

- Preparación para cada muestra a analizar (realizar por triplicado):

Vol. de Muestra (ml)	Vol. de Medio (ml)	Medio Mac Conkey
0.1	10	Simple
1	10	Simple
10	10	Doble

Tubos +: viraje a color amarillo y producción de gas en campana de Durham.

Tubos -: sin viraje de color y sin presencia de gas.

Los tubos negativos se reincuban a 37 °C por 24 hs más.

#### Presencia o ausencia de Coliformes Fecales:

Los coliformes fecales (CF) son un subgrupo dentro de los CT y son definidos como bacilos Gram-negativos, que fermentan lactosa con producción de ácido y gas a 44.5 °C dentro de las 24hs. La especie predominante es Escherichia coli. Están presentes en el intestino de animales, por lo que su presencia en agua indica contaminación fecal, indicando la posible presencia de microorganismos patógenos.

Si se observen tubos (+) en el ensayo de CT, analizar si la muestra también contiene CF.

- Preparar un tubo que contenga una campana de Durhan y 9ml de Medio de Escherichia Coli (EC) previamente esterilizado.

- Tomar 0.1ml de la solución de uno de los tubos (+) en el ensayo de CT, y trasvasar al tubo que contiene 9 ml de caldo EC.

- Incubar 24 h a 44°C.

- Evaluar la presencia de turbidez y producción de gas.

#### Presencia o ausencia de pseudomonas:

- Colocar 100 ml de la muestra en el frasco con el caldo verde malaquita.

- Agitar e incubar por 20 a 44 hs a 37°C

- Lectura positiva cuando se observa turbidez.

#### Lavado:

- Se esteriliza todo el material utilizado que haya dado resultados positivos.

- Luego se procede al lavado normal de laboratorio.

- Se esterilizan las placas Petri y luego se descartan.

#### Informe de resultados:

	Unidad	Límites permisibles en agua de consumo
Bacterias mesófilas viables	UFC/ml	Hasta 500 UFC/ml
Bacterias coliformes	NMP/100ml	Igual o menor a 3 en 100 ml
Escherichia coli	Ausencia o presencia	Ausencia en 100 ml
Pseudomona aeruginosa	Ausencia o presencia	Ausencia en 100 ml