



PROCOLOS

**ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO
EN EL CONSUMO
DE AGUA**

¿Qué importancia tiene el análisis microbiológico en el agua de consumo?

Desde un punto de vista de gestión de los riesgos sanitarios, el agua la podemos dividir en dos grandes grupos:

AGUAS DE CONSUMO: aquellas aguas de distribución pública (grifo), aguas de captación individual como fuentes, pozos y ríos así como aguas envasadas.

AGUAS NO DESTINADAS AL CONSUMO: agua para preparación del hielo de uso industrial, aguas para lavado, aguas recicladas y aguas para acuicultura.

Se supone por tanto primordial que el agua de consumo humano sea potable, de manera que para determinarlo, se deben de analizar tanto sus parámetros físico-químicos (pH, oxígeno disuelto, potencial redox, etc.) como los microbiológicos.

El **análisis microbiológico** no consiste en determinar las especies de todos los microorganismos presentes en la muestra, sino en buscar los patógenos o aquellos microorganismos que los acompañan. Estos microorganismos indicadores están presentes en gran número en el intestino de mamíferos, por lo que son indicadores de contaminación fecal y por lo tanto nos indicarían que le agua no es apta para consumo humano.

Así, tal y como se especifica en el **RD 140/2003**, un agua para que se considere potable ha de presentar los siguientes parámetros microbiológicos:

1. No exceder de 100 UFC/ml de **microorganismos cultivables**
2. Ausencia de **Coliformes totales** en 100 ml de muestra
3. Ausencia de **Escherichia coli** en 100 ml de muestra
4. Ausencia de **Enterococos intestinales** en 100 ml de muestra
5. Ausencia de **Clostridium perfringens** en 100 ml de muestra

Desde **Condalab** queremos ayudar a los distintos laboratorios de control de calidad poniendo a su disposición toda la gama de medios de cultivo bajo **formulaciones ISO** así como sus distintos **procedimientos de análisis**.



Índice

RECUENTO DE LEGIONELLA _____	04
Procedimiento según ISO 11731:2017	
ENUMERACIÓN DE ESCHERICHIA COLI Y COLIFORMES _____	06
Procedimiento según ISO 9308-1:2014	
DETECCIÓN DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS POR FILTRACIÓN EN MEMBRANA _____	07
Procedimiento según ISO 14189:2013	
DETECCIÓN Y RECUENTO DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA _____	08
Procedimiento según ISO 16266:2006	
DETECCIÓN Y RECUENTO DE ENTEROCOCOS INTESTINALES _____	09
Procedimiento según ISO 7899-2:2000	
ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES _____	10
Procedimiento según ISO 6222:1999	



Recuento de *Legionella*

Procedimiento según ISO 11731:2017

Introducción

Legionella es una bacteria con forma generalmente de bacilo que oscila entre 0,3 y 0,9 μm de ancho, y de 1,5 a 5 μm de longitud. Se tiñen tenuemente con la coloración de Gram (Gram negativo) y son móviles por la presencia de uno o más flagelos polares o subpolares. Es un microorganismo aeróbico estricto, necesita oxígeno para su supervivencia y en general es poco activo.

Se trata de una bacteria ambiental cuyo nicho natural son las aguas superficiales como lagos, ríos y estanques, dónde forman parte de su flora bacteriana. Desde estos reservorios naturales la bacteria puede colonizar los sistemas de abastecimiento de las ciudades, y a través de la red de distribución, incorporarse a los sistemas de agua sanitaria.

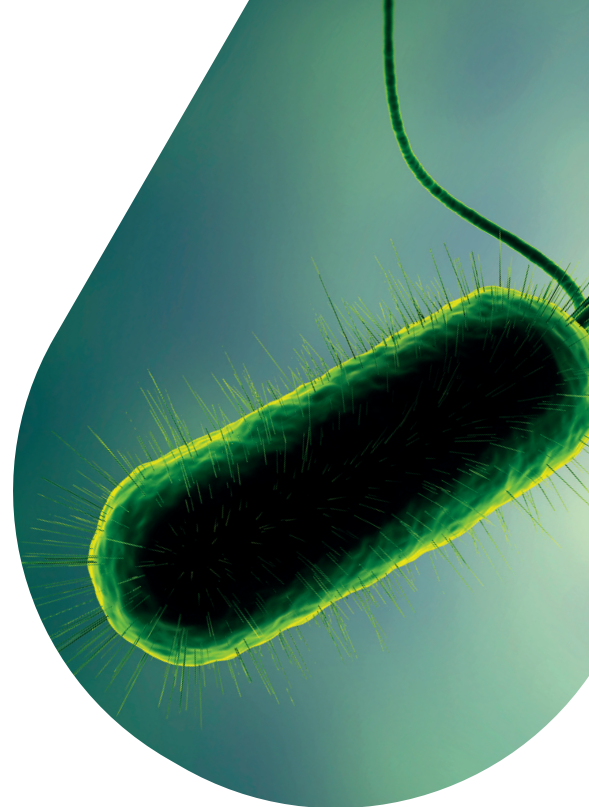
Actualmente está legislada por el RD 865/2003 que regula los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. En la práctica, la prevención se consigue mediante un mantenimiento rutinario del sistema de tuberías, un seguimiento del estado microbiano y unas acciones de desinfección apropiadas. El análisis de *Legionella* es la única vía para la evaluación de riesgos, permitiéndonos determinar si las medidas preventivas y correctivas son suficientes.

Bibliografía

BOPP C.A et al. *Isolation of Legionella spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of selective medium.* J. Clin. Microbiol. April 1981, 13 (4) pp. 714-719

DENNIS P.J et al. *Comparison of isolation methods for Legionella spp, Legionella. Proceedings of the 2nd International Symposium.* America Society for Microbiology, 1984 pp 294-296

UNE-ENISO 11731:2017. *Water quality. Enumeration of Legionella.*



1 - MUESTRA CON UNA ALTA CONCENTRACIÓN DE *LEGIONELLA* Y UNA BAJA CARGA DE MICROORGANISMOS ACOMPAÑANTES

AISLAMIENTO SELECTIVO

0,1 – 0,5 ml de muestra se siembran directamente en Agar para Legionella BCYE (CAT. 1311 + CAT. 6025) y Agar para Legionella BCYE + AB

2 - MUESTRA CON UNA BAJA CONCENTRACIÓN DE *LEGIONELLA* Y UNA BAJA CARGA DE MICROORGANISMOS ACOMPAÑANTES

2.1 FILTRACIÓN EN MEMBRANA

MUESTRA SIN TRATAMIENTO

AISLAMIENTO SELECTIVO
Se coloca el filtro en placas de Agar para Legionella BCYE (CAT. 1311 + CAT. 6025)

PRE-TRATAMIENTO ÁCIDO DE LA MUESTRA

AISLAMIENTO SELECTIVO
Se coloca el filtro en placas de Agar para Legionella BCYE (CAT. 1311 + CAT. 6025) o Agar para Legionella GVPC (CAT. 1311 + CAT. 6022) o Agar para Legionella MWY (CAT. 1311 + CAT. 6067)

2.2 FILTRACIÓN EN MEMBRANA + ELUCIÓN

PRE-TRATAMIENTO

Se divide la muestra en 3 porciones a las que respectivamente se les realiza un tratamiento ÁCIDO, otro TÉRMICO y otra se deja SIN TRATAR

AISLAMIENTO SELECTIVO

0.1 – 0.5 ml de muestra se siembran en Agar para Legionella BCYE (CAT. 1311 + CAT. 6025) y otro medio de cultivo a elegir entre Agar para Legionella BCYE + AB, Agar para Legionella GVPC (CAT. 1311 + CAT. 6022) o Agar para Legionella MWY (CAT. 1311 + CAT. 6067)

3 - MUESTRA CON UNA ALTA CARGA DE MICROORGANISMOS ACOMPAÑANTES

CONCENTRACIÓN / DILUCIÓN

Se realizan 3 submuestras de la muestra original: sin concentrar, concentrada y diluida

PRE-TRATAMIENTO

Se divide la muestra en 3 porciones a las que respectivamente se les realiza un tratamiento ÁCIDO, otro TÉRMICO y otra se deja SIN TRATAR

AISLAMIENTO SELECTIVO

0.1 – 0.5 ml de muestra se siembran en Agar para Legionella GVPC (CAT. 1311 + CAT. 6022) o Agar para Legionella MWY (CAT. 1311 + CAT. 6067)

4 - MUESTRA CON UNA CARGA EXTREMADAMENTE ALTA DE MICROORGANISMOS ACOMPAÑANTES

PRE-TRATAMIENTO

Se realiza a la muestra primeramente un tratamiento TÉRMICO seguido de un tratamiento ÁCIDO

DILUCIÓN

Se realizan 3 submuestras de la muestra pre-tratada: sin concentrar, diluida y diluida

AISLAMIENTO SELECTIVO

0.1 – 0.5 ml de muestra se siembran en Agar para Legionella GVPC (CAT. 1311 + CAT. 6022) o Agar para Legionella MWY (CAT. 1311 + CAT. 6067)

PROCEDIMIENTO COMÚN INDEPENDIEMENTE DEL TIPO DE MUESTRA

INCUBACIÓN

Las placas se incuban a 36 ± 2 °C durante 7/10 días

*Se examina crecimiento en los días 2, 3, 4, 5 y al final de la incubación

CONFIRMACIÓN

Se realizan subcultivos en Agar para Legionella BCYE (CAT. 1311 + CAT. 6022) y Agar para Legionella BCYE sin cisteína (CAT. 1311)

Resultados: Crecimiento positivo en BCYE y Crecimiento negativo en Agar para Legionella BCYE sin cisteína

Enumeración de *Escherichia Coli* y Coliformes

Procedimiento según ISO 9308-1:2014

Introducción

En el pasado, las pruebas de calidad del agua y la presentación de datos se basaban en grupos de bacterias llamados coliformes totales y fecales. Las bacterias coliformes se encuentran en el medio ambiente acuático, en el suelo, y en la vegetación. También están presentes en grandes cantidades en las heces de los animales de sangre caliente. Debido a que los coliformes normalmente no causan enfermedades graves y son fáciles de cultivar, su presencia se utiliza como indicador para otros organismos patógenos de origen fecal pueden estar presentes.

Hoy en día, las pruebas también contemplan la concentración de *Escherichia coli*. Esta es una bacterias que se encuentra dentro del grupo de coliformes fecales y es, por tanto, un indicador de la contaminación fecal. Además, como su supervivencia en medios no entéricos es limitada, indica un origen de la contaminación reciente.

El agua consumida como agua potable se analiza para determinar, entre otros parámetros, la concentración de *E. coli*. Del mismo modo, las aguas residuales que han sido tratadas y luego recicladas para fines de riego y/o descargadas en aguas superficiales también debe cumplir con ciertos niveles para que se consideran seguras.

Bibliografía

ISO 7218:2007. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations.*

ISO 9308-1:2014. *Water quality. Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria. Part 1: membrane filtration method for water with low bacterial background flora.*



Método

FILTRACIÓN

Se realiza una filtración de 100 ml de muestra (250 ml para aguas embotelladas)

Para filtraciones de muestras y diluciones, filtrar un volumen mínimo de 10 ml

ASLAMIENTO PRESUNTIVO

Colocar la membrana tras la filtración en Agar Cromogénico Coliformes (CCA) (CAT. 2080) / Incubación a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $21 \pm 3\text{ h}$

RECuento COLIFORMES PRESUNTIVOS

Las colonias presuntas de coliformes se presentan de color rosa/rojo

RECuento DE *E. COLI* β -GALACTOSIDASA + Y β -GLUCURONIDASA +

Las colonias se presentan de color azul oscuro/violeta

CONFIRMACIÓN

Realizar prueba de la oxidasa (-) a las colonias presuntas y hacer un subcultivo en Agar Soja Triptona (CAT. 1138) sobre las que realizar la misma prueba de confirmación (-)

Enumeración de *Clostridium Perfringens* por filtración en membrana

Procedimiento según ISO 14189:2013

Introducción

Clostridium perfringens es una bacteria formadora de esporas, que está presente en las heces de humanos y animales, aunque también puede provenir de otras fuentes ambientales. Crece con preferencia en condiciones con muy poco o sin oxígeno y, en condiciones ideales, puede multiplicarse muy rápidamente.

Sus esporas pueden resistir los procesos de desinfección y sobrevivir en el agua mucho más tiempo que los coliformes, lo que hace que esta especie bacteriana sea utilizada para detectar contaminaciones de origen fecal más antiguas, ya que como sabemos, *Escherichia coli* es representativo de una contaminación reciente del agua.

Por estas razones, *Clostridium perfringens* se presenta como un bioindicador imprescindible de contaminación de las aguas y un marcador muy útil para los gestores del agua sobre la presencia de otros patógenos resistentes a las condiciones ambientales, como los virus y los quistes de protozoos.

Por ejemplo, en aguas de consumo, su presencia es muy significativa y exige por tanto un tratamiento inmediato del agua.

Bibliografía

BURGER J.S, NUPEN E.M, and GRABOW W.O.K, *Evaluation of four growth media for membrane filtration counting of Clostridium perfringens*. Water S.A. 1984, 10 pp. 521-526

ARAUJO M., SUEIRO R.A, GOMEZ M.J, & GARRIDO M.L. *Enumeration of Clostridium perfringens spores in ground water samples: comparison of six culture media*. J. Microbiol. Methods. 2001, 57 pp. 175-180.

ISO 14189:2017. *Water Quality. Enumeration of Clostridium perfringens. Method using membrane filtration*.



Método

PRE-TRATAMIENTO Y FILTRACIÓN



Se realiza una filtración de 100 ml de muestra a través de la membrana

Para análisis de esporas, ha de realizarse un calentamiento de la muestra a 60 ± 2 °C durante 15 min

AISLAMIENTO PRESUNTIVO



Colocar la membrana tras la filtración en Agar T.S.C. (Triptosa Sulfito Cicloserina) (CAT. 1029 + CAT. 6020) Incubación en anaerobiosis a 44 ± 1 °C durante 21 ± 3 h

AISLAMIENTO DE COLONIAS SOSPECHAS



Se aíslan colonias sospechas en Agar Columbia (CAT. 1104) con sangre / Incubación en anaerobiosis a 36 ± 2 °C durante 21 ± 3 h

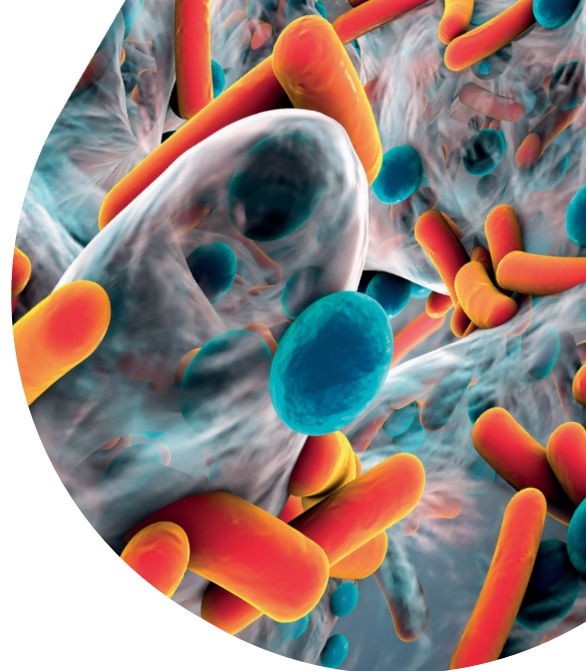
CONFIRMACIÓN



Realizar la prueba de la fosfatasa ácida sobre papel de filtro

Detección y recuento de *Pseudomonas aeruginosa*

Procedimiento según ISO 16266:2006



Introducción

Pseudomonas aeruginosa es una especie ubicua en el ambiente. Su presencia es común tanto en suelos y en agua naturales como en lagos y ríos. Sin embargo, no es frecuente encontrarlos en agua potable y se detecta en ella a bajas concentraciones.

Aunque la presencia de *P. aeruginosa* puede ser significativa en algunos entornos como en centros sanitarios, no hay evidencia de que los usos normales del agua de consumo sean una fuente de infección para la población general. Esta bacteria es sensible a la desinfección, por lo que una desinfección adecuada puede minimizar su entrada en los sistemas de distribución.

Por tanto las medidas de control diseñadas para limitar la formación de biopelículas, como el tratamiento para optimizar la eliminación del carbono orgánico, deberían reducir la proliferación de estos microorganismos.

Bibliografía

Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Official Journy of the European Communities*. L330, 1998, pp. 32-53.

ISO 16266:2006. *Water quality. Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa. Method by membrane filtration.*

Método

FILTRACIÓN



Se realiza una filtración de la muestra según ISO 8199

AISLAMIENTO PRESUNTIVO



Colocar la membrana tras la filtración en Agar CN *Pseudomonas* (CAT. 1153) / Incubación a 36 °C ± 2 °C durante 44 ± 4 h

Examinar el crecimiento tras 22 h y al final de la incubación

LECTURA BAJO LUZ NATURAL



a) Colonias de color azul/verde se contarán como *Pseudomonas aeruginosa*
b) Colonias de color rojo/marrón serán consideradas como presuntivas y se les realizará las pruebas de confirmación

LECTURA BAJO LUZ UV



Colonias fluorescentes no productoras de piocianina como presuntivas *Pseudomonas aeruginosa*

CONFIRMACIÓN



Tras subcultivo en Agar Nutritivo (CAT. 1156), realizar:
• Reacción de la oxidasa (+)
• Siembra en Caldo Acetamida (+) (CAT. 1155)
• Medio King B (+) (CAT. 1154)

CONFIRMACIÓN



Tras subcultivo en Agar Nutritivo (CAT. 1156), realizar siembra en:
• Caldo Acetamida (+) (CAT. 1155)

Para consultar tiempos y temperaturas de incubación, consultar la ficha técnica de las distintas referencias

Detección y recuento de *Enterococos Intestinales*

Procedimiento según ISO 7899-2:2000

Introducción

Los enterococos son cocos Gram positivos. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas no formadores de endosporas y no móviles. Son microorganismos anaerobios facultativos, quimi-organotrofos, con metabolismo fermentativo. Su crecimiento óptimo es a 37 °C. Pueden crecer en presencia de 6,5 % de NaCl, a 10 y 45 °C y pH 9,6.

Los enterococos forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal humano y del tracto genital de la mujer. Las especies más frecuentes en los aislamientos clínicos son *E. faecalis* y *E. faecium*.

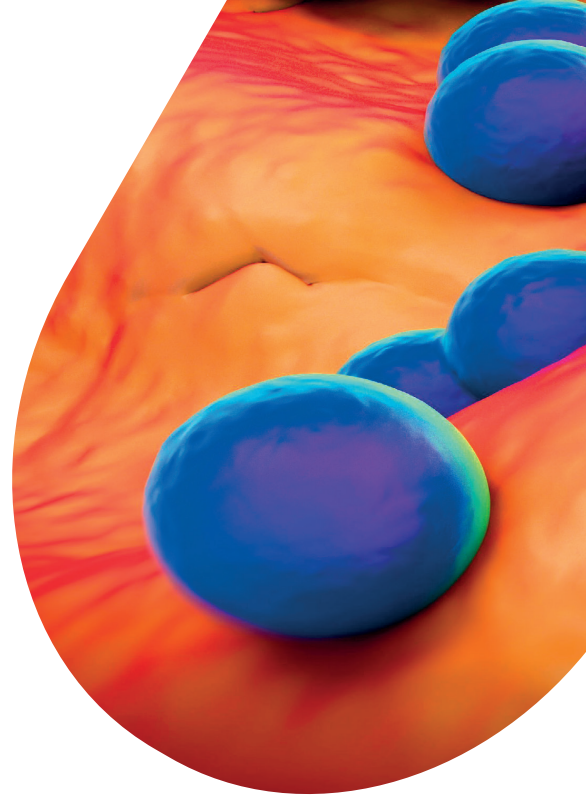
Por otra parte, los enterococos también pueden estar presentes en suelo, alimentos, agua, plantas, animales e insectos y suelen considerarse buenos indicadores de contaminación fecal debido a que son muy resistentes a condiciones adversas como la congelación y la desecación.

Ciertos autores consideran al género *Enterococcus* como el indicador microbiano más eficiente para evaluar la calidad de agua de mar para uso recreativo, debido a que es muy resistente a las condiciones salinas de este medio y además, está relacionado directamente con gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis y dermatitis.

Bibliografía

ISO 7704:1985. *Calidad del agua. Evaluación de las membranas filtrantes utilizadas en los análisis microbiológicos.*

ISO 7899-2:2000. *Water quality. Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method.*



Método

FILTRACIÓN



Se realiza una filtración un volumen de agua apropiado según ISO 8199

AISLAMIENTO PRESUNTIVO



Colocar la membrana tras la filtración en Medio Slanetz-Bartley (CAT. 1109) / Incubación a 36 °C ± 2 °C durante 44 ± 4 h

CONFIRMACIÓN Y ENUMERACIÓN



Las colonias sospecha se presentan de color rojo, marrón o rosa y con forma convexa. Sembrar estas colonias en placas de Agar Bilis Esculina Azida (CAT. 1005) pre-calentadas a 44 °C / Incubación a 44 ± 0.5 °C durante 2 h

La enumeración de las colonias debe hacerse inmediatamente tras la incubación. Los Enterococos intestinales se presentan de color marrón con un halo alrededor

Enumeración de *Microorganismos Cultivables*

Procedimiento según ISO 6222:1999

Introducción

Los indicadores microbiológicos de calidad del agua son organismos que tienen un comportamiento similar a microorganismos patógenos cuya procedencia, concentración, hábitat y reacción a factores externos es la de la mayoría.

Su presencia determina la existencia de patógenos y permite comparar sus reacciones a cambios de pH y temperatura.

Requieren la identificación y cuantificación de microorganismos por índices de diversidad ajustados a intervalos que califican la calidad del agua y, aunque la información microbiológica obtenida a partir de su análisis no reemplaza los análisis fisicoquímicos, reduce costos y aporta información en el monitoreo de la calidad del agua.

La identificación y enumeración de microorganismos aerobios y mesófilos en aguas permite:

- Evaluar el estado de los recursos de agua en su origen
- Ver la eficacia del proceso de tratamiento de las aguas destinadas al consumo humano
- Conocer la limpieza y el estado de los sistemas de distribución
- Detectar cambios anómalos en el número de microorganismos en la red de distribución.

Bibliografía

ISO 6222:1999. *Water quality. Enumeration of culturable microorganism. Colony-count by inoculation in a nutrient agar culture medium.*



Método

PREPARACIÓN DE MUESTRA



Se realiza según indicaciones de la norma ISO 8199

SIEMBRA EN PROFUNDIDAD



Añadir 2 ml de la muestra preparada junto con 15/20 ml de Agar Extracto de Levadura (YEA) (CAT. 1049)

INCUBACIÓN SERIE 1



Se incuban las placas a 36 ± 2 °C durante 44 ± 4 h

INCUBACIÓN SERIE 2



Se incuban las placas a 22 ± 2 °C durante 68 ± 4 h

Se realiza el recuento en cada una de la series de placas incubadas para enumeración, expresada en UFC/ml



Condalab

Inspired by knowledge

export@condalab.com | www.condalab.com