

# Análisis Microbiológico de Aguas

# Parámetros según CAA

## Capítulo XII “Bebidas hídricas, Agua y Agua gasificada.”

- Bacterias coliformes: NMP (Número más probable) a 37 °C-48 hs. (Caldo Mc Conkey o Lauril Sulfato), en 100 ml: igual o menor de 3.
- *Escherichia coli*: ausencia en 100 ml.
- *Pseudomonas aeruginosa*: ausencia en 100 ml.
- En la evaluación de la potabilidad del agua ubicada en reservorios de almacenamiento domiciliario deberá incluirse entre los parámetros microbiológicos a controlar el recuento de mesófilos Totales en PCA (Plate count agar - 24 hs. a 37 °C): en el caso de que el recuento supere las 500 UFC/ml y se cumplan el resto de los parámetros indicados, sólo se deberá exigir la higienización del reservorio y un nuevo recuento. En las aguas ubicadas en los reservorios domiciliarios no es obligatoria la presencia de cloro activo

# Recuento de Mesófilos totales

- Siembra en profundidad de 1 ml. de muestra en PCA (Agar para Recuento en Placa)
- Se incuba 48 horas a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en estufa de cultivo.
- Se cuentan las Colonias desarrolladas y se Informan como UFC/ml.

# • Coliformes Totales:

- Según Técnica del NMP (Número mas Probable).

Prueba Presuntiva: Se preparan 3 tubos con Caldo Mc Conkey Doble concentración (10 ml por tubo) y 6 tubos con el mismo caldo simple concentración. (10 ml por tubo)

Se puede usar caldo lactosado o Lauril sulfato.

Se siembran:

- - 10 ml de agua en cada uno de los tubos de doble concentración.
- -1 ml de Muestra en cada uno de los tres primeros tubos de simple concentración
- -0,1 ml de muestra en cada uno de los tres tubos faltantes de simple concentración.

# El grupo incluye:

- Bacterias con Formas de Bacilos Gram negativos

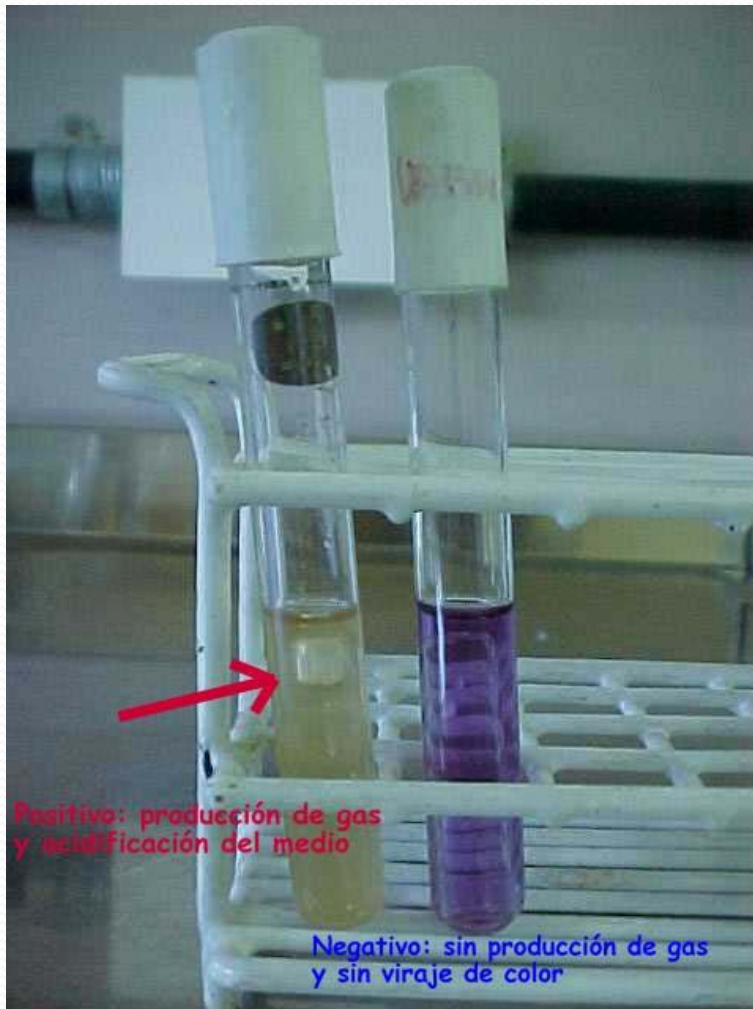
El grupo esta formado por los siguientes géneros:

*Escherichia*

*Klebsiella*

*Enterobacter*

*Citrobacter*



Los tubos positivos de la prueba presuntiva anterior deben presentar:

- Gas en la campana de Durham y viraje del medio a Color amarillo, por acidificación
- En el caso que solo vire a amarillo (no se forma burbuja en la campana) se lo tendrá en cuenta como un falso positivo)

# Lectura del ensayo de coliformes totales

- La lectura del ensayo debe realizarse a las 48 horas de la siembra.
- Se armará la siguiente tabla:

Muestra	10 ml	1 ml	0.1 ml	NMP
Número de muestra	Número de tubos positivos en la siembra de 10 ml	Número de tubos positivos en la siembra de 1 ml	Número de tubos positivos en la siembra de 0.1 ml.	Ver tabla a continuación

En un ensayo de agua se realizó la siguiente lectura:

Tubos de doble concentración: 3 tubos positivos

Tubos de simple concentración 1 ml: 1 tubo positivos

Tubos de simple concentración 0.1 ml: 0 tubos positivos

¿Cuál será el número más probable en 100 ml de la muestra de Agua?

# Tabla de Numero mas Probable

## Tabla de McCrady

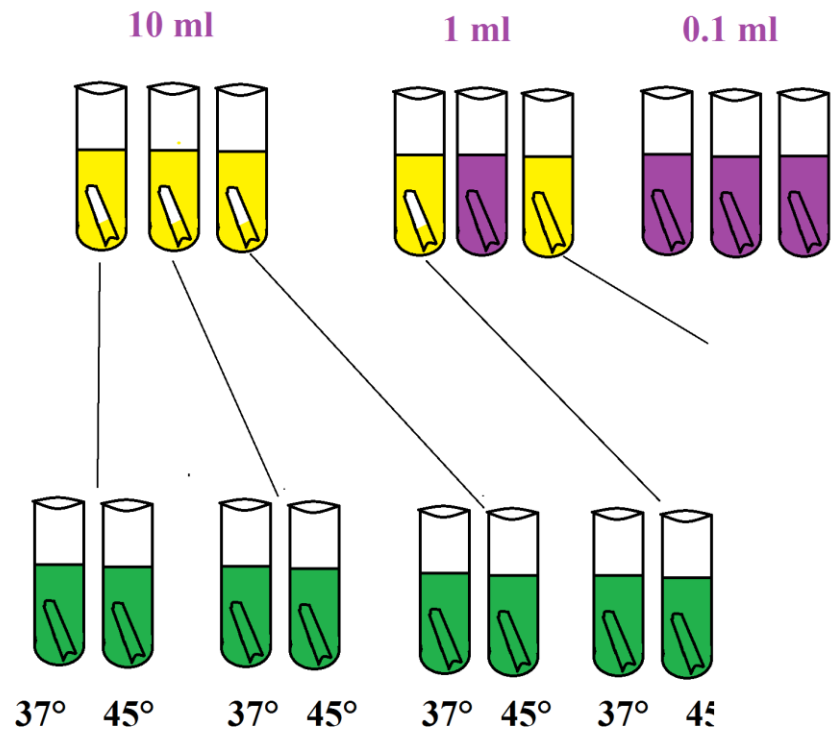
Tubos positivos por			NMP para 100 ml	Tubos positivos por			NMP para 100 ml
10 ml	1,0 ml	0,1 ml	3 tubos por grado de dilución	10 ml	1,0 ml	0,1 ml	3 tubos por grado de dilución
0	0	0	< 3	3	0	0	23
0	0	1	3	3	0	1	39
0	1	0	3	3	0	2	64
0	2	0	6	3	1	0	43
1	0	0	4	3	1	1	75
1	0	1	7	3	1	2	120
1	1	0	7	3	2	0	93
1	1	1	11	3	2	1	150
1	2	0	11	3	2	2	210
2	0	0	9	3	3	0	240
2	0	1	14	3	3	1	460
2	1	0	15	3	3	2	1100
2	1	1	20	3	3	3	≥ 2400
2	2	0	21				
2	2	1	28				
2	3	0	30				

# Prueba Confirmativa

De los tubos positivos desarrollados en la prueba anterior se tomaran dos Ansadas y se sembrarán a Caldo Brila o Caldo Mac Conkey simple concentración (en dos tubos distintos).

- Uno de los tubos se incubará 48 horas a 37°C para confirmación de Coliformes.
- el otro tubo se incubará a 45°C durante 24 horas para confirmación de Coliformes Fecales.

Esquema:



INCUBACION:

Los tubos positivos deben presentar turbidez y burbuja en la campana

Tres tubos positivos con gas en la campana y cambio de color

Resultado:

3 - 1 - 0

Según Tabla: 43 NMP en 100 ml

Se observa que el tercer tubo de la serie 1 ml no posee gas en la campana con lo cual será considerado como falso positivo

# Lectura de la prueba Confirmativa

- Se deberán leer como tubos positivos aquellos que presenten Turbidez y Gas en la campana. (MEDIO BRILA)
- Si la lectura es Positiva a 45°C se confirma la presencia de Coliformes Fecales. Y si es positiva a 37° C se confirman coliformes totales.

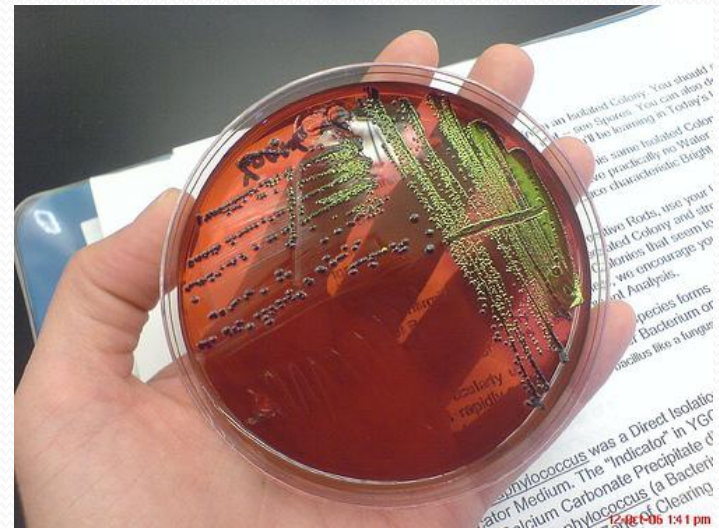
# E. Coli

- De los tubos positivos obtenidos en la prueba confirmativa anterior :
- Se repica a Agar Levine. Se incuba por 24 – 48 horas a 37°C en estufa de cultivo.
- (Medio Selectivo y Diferencial)

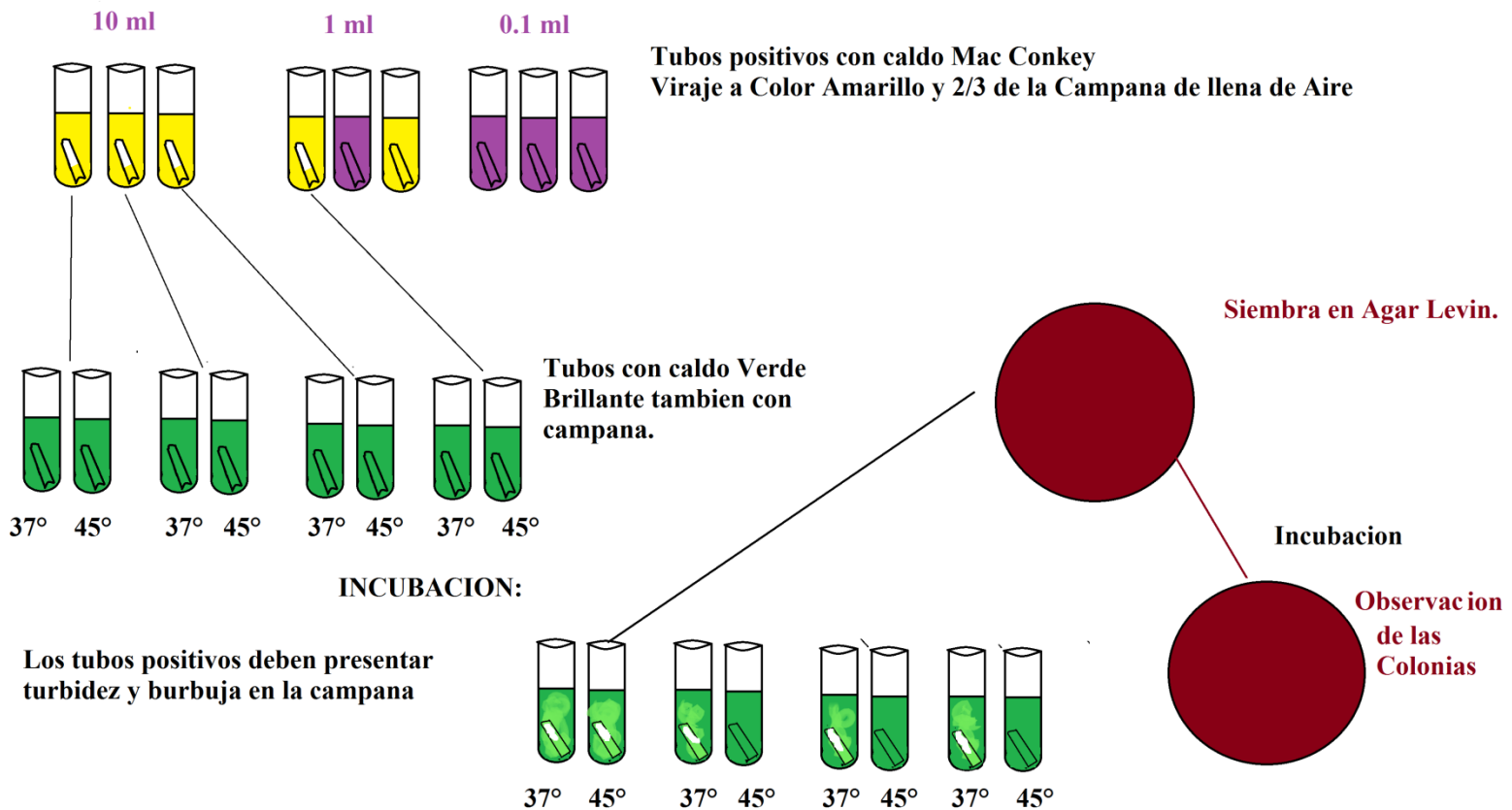
# Interpretación de la observación de las placas con agar Levine

- Si hay presencia de Colonias de E. Coli, se observarán colonias de centro oscuro pardo, rodeadas por un color verde metálico brillante.

A las colonias típicas se les deberán realizar distintas pruebas incluyendo tinción de gram y pruebas bioquímicas (IMVIC) para confirmar que sea E. Coli o Enterobacter aerògenes.



# Esquema:



# Técnica para determinación de ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

100 ml de muestra serán sembrados en Caldo doble concentración verde malaquita, se incubara por 48 horas a 37°C. (enriquecimiento)

Luego de la incubación, se tomará una ansada y se repicará a Agar Cetrimide para buscar colonias típicas las cuales desarrollan fluorescencia frente a la luz ultravioleta UV. Estas son generalmente pequeñas y de color verdoso.

De esta manera se determinar Presencia o Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml de agua.

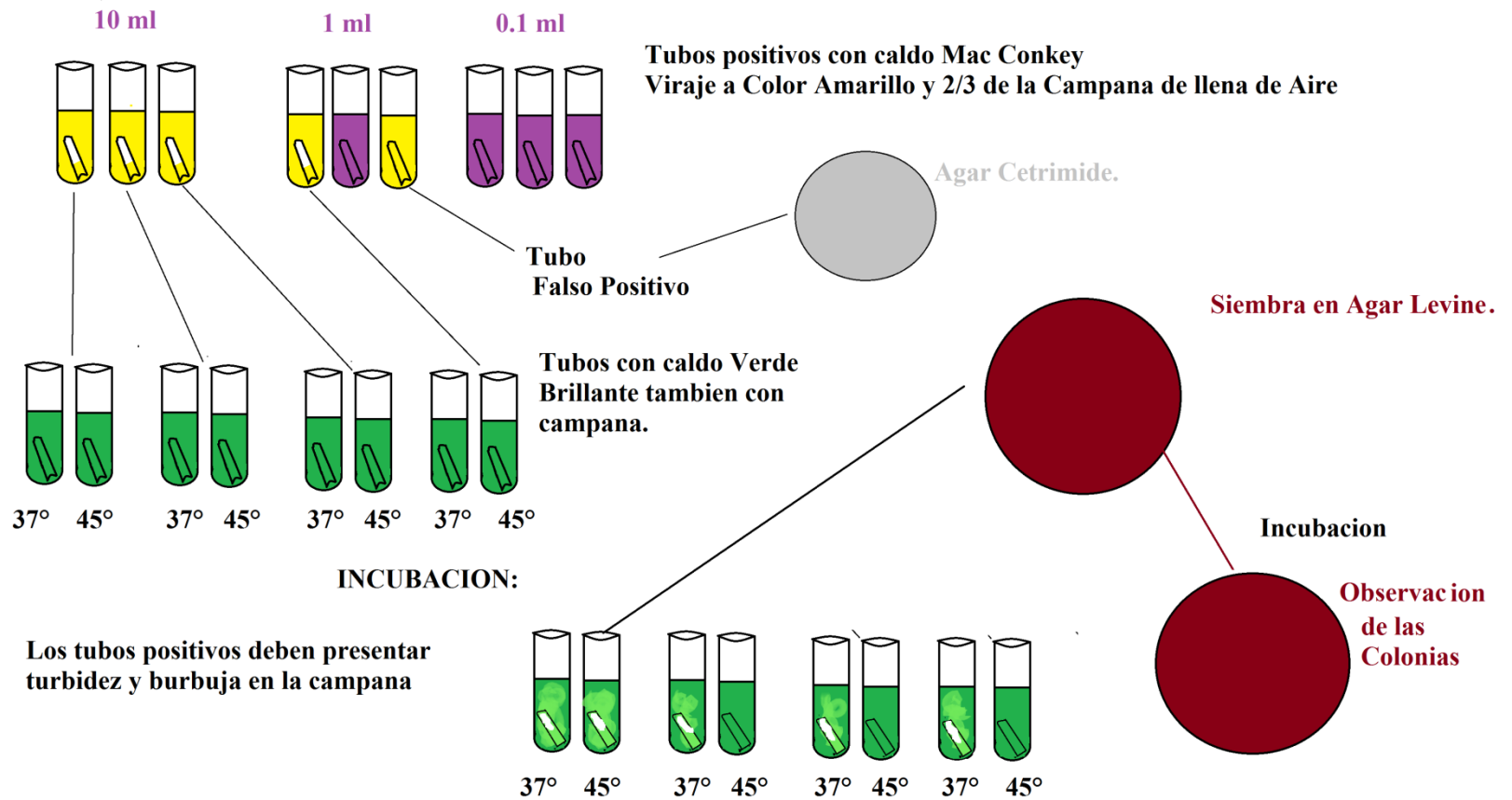
# Pseudomonas aeruginosa

## **Metodología alternativa:**

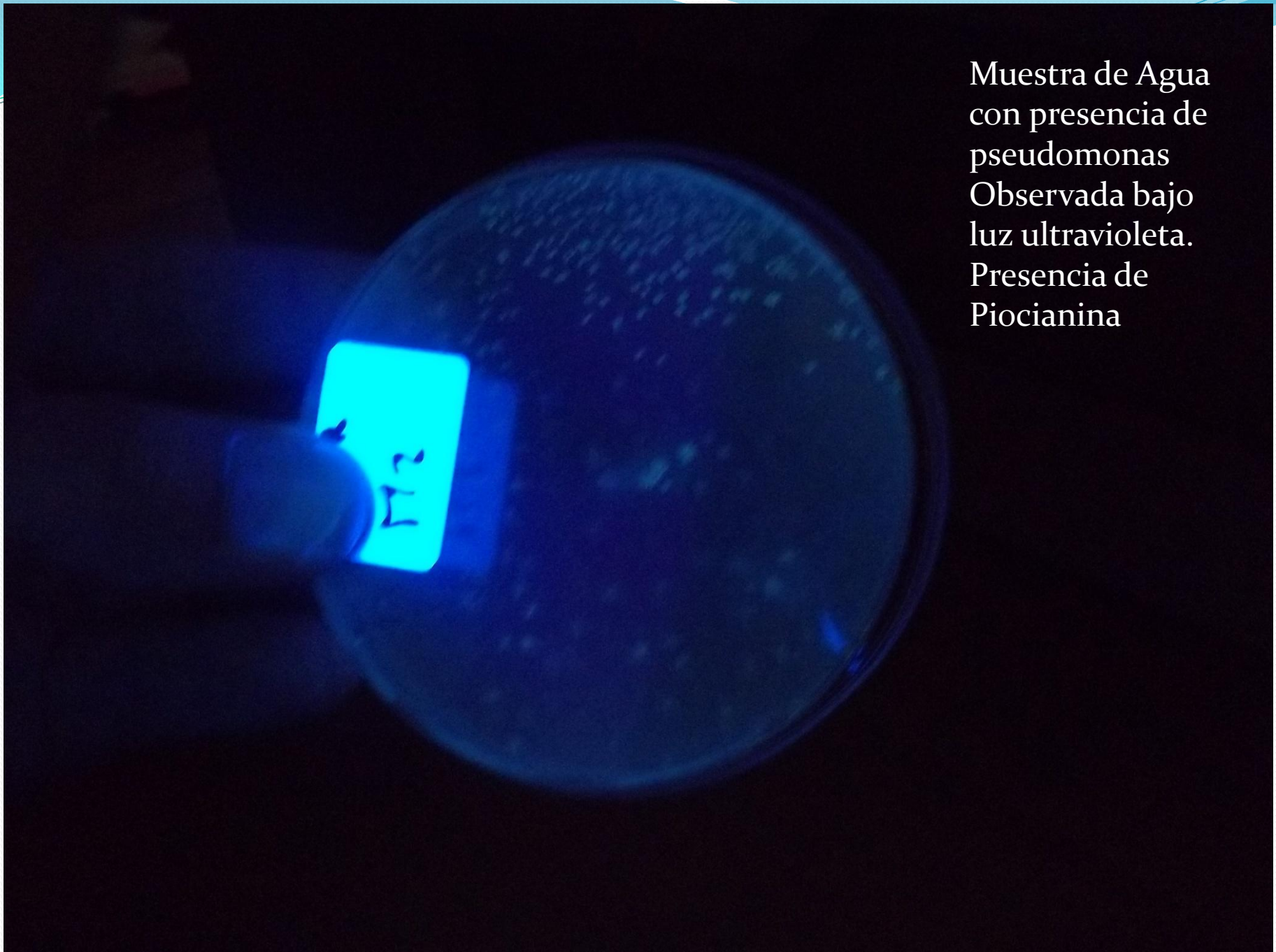
Las Pseudomonas, acidifican el medio pero no fermentan la lactosa produciendo gas.

De alguno de los tubos Falso Positivo (sin burbujas de gas de la prueba presuntiva) se toma una ansada y se estría en agar Cetrimide.

# Esquema



Muestra de Agua  
con presencia de  
pseudomonas  
Observada bajo  
luz ultravioleta.  
Presencia de  
Piocianina



# Otra técnica para E. Coli:

100 ml de muestra de agua se sembraran en 100 ml de caldo lactosado doble concentración.

Se incubara por 48 horas a 37 grados centígrados.

Luego se repicara una ansada a agar levine.

Si aparecieran colonias típicas, se llevara adelante tinción de gram y pruebas bioquímicas.

En el caso de presencia se indicara como Presencia de E. Coli en 100 ml de agua.

# Informe de los resultados

- INFORME DE RESULTADOS del ANALISIS de AGUA POTABLE

Muestra N°

Nombre de la empresa o solicitante:

Domicilio:

Localidad:

Tel:

Procedencia de la muestra: Pozo o red

Fecha y hora de recolección de la muestra.

Servicio normal o rápido

## RESULTADOS

Recuento de aerobios mesófilos totales a 37 °C .....**Según Recuento**.....en 1 ml

Recuento de Coliformes Totales .....**SEGUN TABLA DE MCCRADY**.....en 100ml

*Escherichia coli*.....**PRESENCIA / AUSENCIA**.....en 100ml

*Pseudomonas aeruginosa*.....**PRESENCIA / AUSENCIA**.....en 100ml

Observaciones

.....  
.....  
.....

Límite máximo permisible en agua potable: Recuento de aerobios mesófilos a 37 °C: hasta 500 ufc/ml. Coliformes totales hasta 3/100 ml. *Escherichia coli* : ausencia en 100 ml. *Pseudomonas aeruginosa* :ausencia en 100 ml.

Supervisor

Ejecutor de las tareas



- ¿Por que se evalúan estos parámetros y no otros?

Su detección es más fácil, rápida , segura y económica que la otros microorganismos patógenos.

# Mesófilos Totales en PCA.

- Determina el estado higiénico sanitario del reservorio y de la red de distribución, es un ensayo directo para el recuento de las bacterias.

# Pseudomonas

- Posee relativa resistencia al cloro por lo cual su presencia puede indicar un déficit en el proceso de cloración. Y como tiene bajos requerimientos nutricionales también puede indicar la presencia de distintos focos de contaminación en las redes.
- Es un patógeno oportunista. Provoca infecciones intrahospitalarias de muy difícil tratamiento.

# E. Coli

Microorganismos marcadores: Índices e indicadores

- *Microorganismos índices : Su presencia indica la presencia simultanea de microorganismos patógenos ecológicamente relacionados. Ej. E.coli es índice de posible presencia de patógenos de procedencia entérica, en agua y alimentos. Indica también Contaminación Fecal.*
- *Microorganismos indicadores: su presencia pone de manifiesto deficiencias en los métodos de obtención de un alimento, es decir en su inocuidad.*

# Coliformes fecales.

- Cabe aclarar que dentro de las Coliformes Totales se encuentran las denominadas Grupo de las I.A.C cuyo origen es el suelo y la vegetación pero presentan igual resultado en la prueba presuntiva. Debería realizarse un análisis con Citrato de Kosser para determinar si pertenecen al grupo de las I.A.C o a al de las coliformes fecales.

# RECOMENDACIONES

- En análisis microbiológicos de aguas de reservorios domiciliarios, si se obtiene mayor numero de UFC/MI de Mesofilas Aerobias totales y el resto de los parámetros esta dentro de los valores recomendados se deberá pedir una higienización del reservorio y un nuevo recuento.
- En el caso de Aguas No potables por presentar alguno de los otros parámetros por encima de los legislados se deberá recomendar:
  - Investigar la fuente de la contaminación y eliminarla de ser posible.
    - Realizar higienización del tanque y del sistema de distribución
      - Clorar el Agua de Persistir el Problema.

- 
- Gracias por su atención.