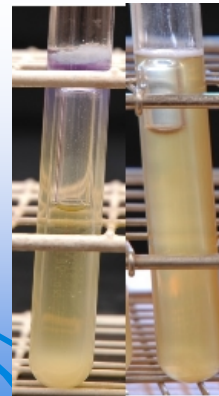
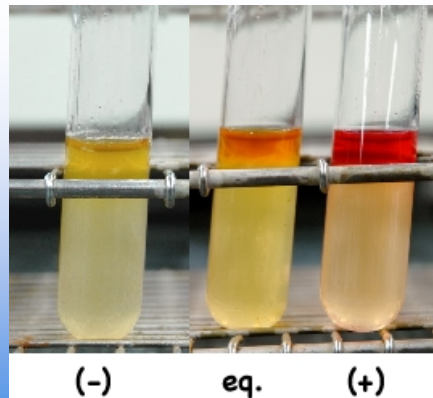




José María Obón de Castro
Dpto. Ingeniería Química y Ambiental
Universidad Politécnica de Cartagena

Análisis microbiológico del agua



Análisis microbiológico del agua

Se puede definir el **análisis microbiológico** como el conjunto de operaciones encaminadas a determinar los microorganismos presentes en una muestra problema de **AGUA**.



Factores que inciden en la flora bacteriana

- La acidez disminuye el contenido de microorganismos.
- La materia orgánica lo aumenta.
- Mucho oxígeno disuelto disminuye los microorganismos anaerobios.
- Las sales, si son abundantes, producen que el agua sea casi estéril.
- Si existe poca cantidad de sales se estimula el desarrollo bacteriano.
- La filtración disminuye el número de microorganismos.
- La temperatura puede aumentar o disminuir el contenido bacteriano.
- La turbidez hace que el contenido bacteriano pueda aumentar, ya que los rayos U.V. no manifiestan su acción.
- Los protozoos fagocitan bacterias y así disminuyen el número de estas.



Análisis microbiológico del agua

El interés se centra en los **microorganismos patógenos**, que son los diferentes tipos de bacterias, virus, protozoos y otros organismos, que transmiten enfermedades.

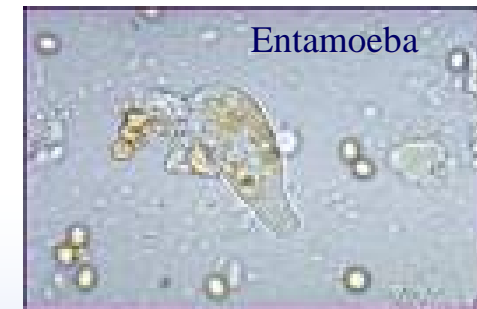
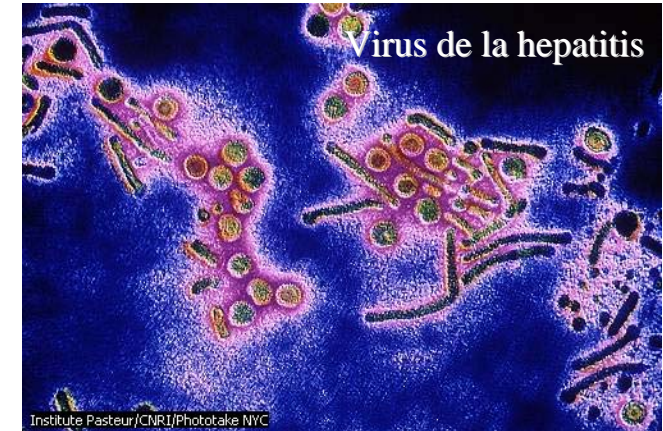
Enfermedad	Agente
Origen bacteriano	
Fiebres tifoideas y paratifoideas	<i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella Paratyphi A y B</i>
Disentería bacilar	<i>Shigella</i>
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>
Gastroenteritis agudas y diarreas	<i>Escherichia coli</i> ET <i>Campylobacter</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonella</i> sp <i>Shigella</i> sp

Bacterias



Análisis microbiológico del agua

Origen viral	
Hepatitis A y E	Virus de la hepatitis A y E
Poliomielitis	Virus de la polio
Gastroenteritis agudas y diarreas	Virus Nortwalk, Rotavirus, Astrovirus, Calicivirus, Enterovirus, Adenovirus, Reovirus
Origen parasitario	
Disentería amebiana	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Cristosporidium</i>



En los países en vías de desarrollo las enfermedades producidas por estos patógenos son uno de los motivos más importantes de muerte prematura, sobre todo de niños. Normalmente estos microbios llegan al agua en las heces y otros restos orgánicos que producen las personas infectadas.

Análisis microbiológico del agua

Al hacer el análisis de las aguas no buscamos tal o cual microorganismo patógeno, es decir, no aislamos o identificamos los microorganismos patógenos del agua, sino que averiguamos si esta **tiene o no contaminación de origen fecal**.

Criterio sanitario para un agua de consumo humano (Real Decreto 140/2003)

Anexo I. Características microbiológicas

Parámetros microbiológicos (1)	Valor paramétrico
<i>Escherichia coli</i>	0 UFC/100 ml
Enterococos	0 UFC/100 ml
<i>Clostridium perfringens</i> (incluidas las esporas)	0 UFC/100 ml
Parámetros indicadores (2)	Valor paramétrico
Recuento de colonias a 22°C	100 UFC/ml
Coliformes	0 UFC/100 ml

(1) Parámetros de obligado cumplimiento.

(2) En el caso de incumplimiento de estos parámetros, la autoridad sanitaria valorará la calificación del agua como "apta o no apta para el consumo humano" en función del riesgo para la salud.

*) Cuando la determinación de *Clostridium* sea positiva y exista una turbidez mayor 5 UNF se determinarán, en la salida de ETAP o depósito, si la autoridad sanitaria lo considera oportuno, *Cryptosporidium* u otros microorganismos o parásitos.

Análisis microbiológico del agua

Métodos de análisis:

1. Bacterias coliformes y *Escherichia coli* (*E. coli*): UNE EN ISO 9308-1:2000.
2. *Enterococos*: UNE EN ISO 7899-2:2001.
3. *Clostridium perfringens* (incluidas las esporas)
4. Enumeración de microorganismos cultivables-Recuento de colonias a 22 °C: UNE EN ISO 6222:1999.

Otros tests complementarios:

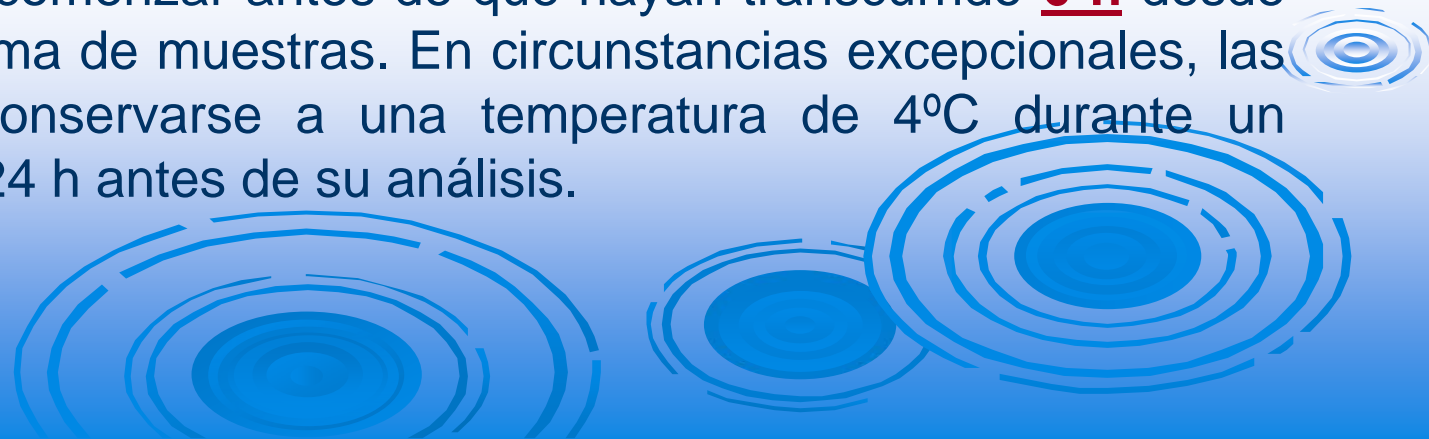
- Salmonelas
- Estafilococos patógenos
- Bacteriófagos fecales
- Enterovirus
- Protozoos
- Animáculos (gusanos-larvas), Invertebrados bénticos



Toma de muestras para análisis microbiológico

Las muestras que se tomarán para el análisis deben ser representativas para poder determinar así su calidad microbiológica. Hay normas para la toma de muestras de aguas según sus distintas procedencias (grifos, pozos, depósitos, lagos, ríos, manantiales, etc.). Para su recogida debe utilizarse frascos estériles y debe recolectarse cantidades comprendidas entre 500 y 1000 ml. En todos los casos los envases se llenarán por completo para excluir el aire. Cuando se estime probable que el agua a analizar contenga trazas de cloro, cloramina u ozono, será necesario neutralizar su efecto bactericida en el momento del muestreo. Para ello se añadirá una cantidad suficiente de tiosulfato sódico. Para un volumen de 250 ml son suficientes 0,2 ml de una solución acuosa al 3% de tiosulfato sódico.

Su análisis debe comenzar antes de que hayan transcurrido **6 h** desde el momento de la toma de muestras. En circunstancias excepcionales, las muestras pueden conservarse a una temperatura de 4°C durante un periodo máximo de 24 h antes de su análisis.



Análisis microbiológico: Bacterias coliformes

1. FUNDAMENTO

Los coliformes reagrupan ciertas especies bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, de morfología bacilar, Gram negativas, aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativa, no esporuladas y que fermentan la lactosa con producción de ácido a 37°C en 24-48 horas.

Del grupo coliformes forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*.

- *Escherichia coli* produce dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos y fiebre.
- *Klebsiella* produce enfermedades respiratorias.
- *Citrobacter* produce alteraciones a nivel del colon y a nivel intestinal.



Análisis microbiológico: Bacterias coliformes

2. MÉTODO

El método consiste en desarrollar solo una **prueba presuntiva** en el que una reacción negativa excluye la presencia del grupo coliforme.

3. PROCEDIMIENTO.

Inocular caldo de peptona con diluciones decimales de la muestra de agua, expresados en 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Inocular 3 tubos de lactosa bilis verde brillante (a los que se les añade un tubo de Durham invertido) con 1 ml de cada dilución. Incubar a 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 24 ó 48h.

4. LECTURA E INTERPRETACIÓN.

Si se observa crecimiento bacteriano con producción de gas las 24h o antes, la presencia de bacterias coliformes fecales se considerará confirmada, prosiguiendo con el método del filtro de membrana para conteo.



Análisis microbiológico: Coliformes fecales

Método de filtración de membrana. (UNE EN ISO 9308-1:2000)

1. FUNDAMENTO

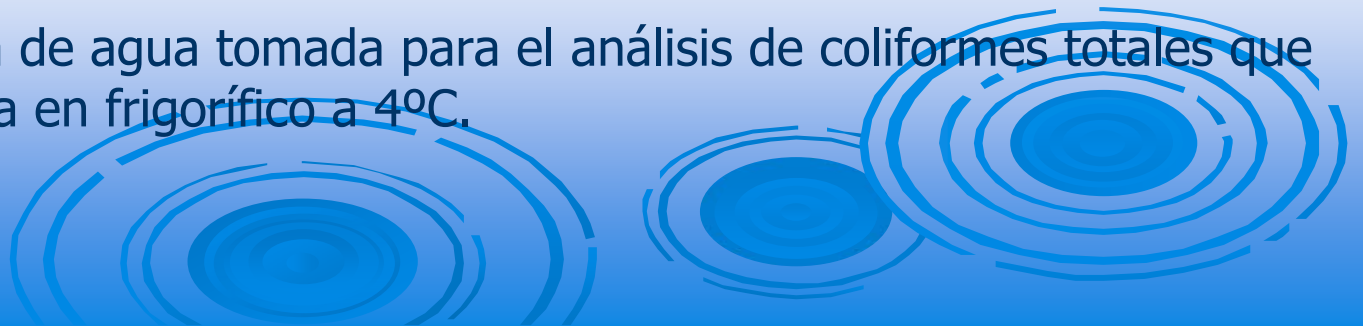
Las bacterias coliformes de origen fecal son aquellas comprendidas en el grupo anterior (coliformes totales), que además son capaces de fermentar la lactosa, con producción de ácido y de gas a 44°C, en un tiempo máximo de 24h.

2. MÉTODO

El método consiste en la determinación del nº de coliformes mediante filtración de volúmenes determinados del agua a analizar por filtros de membrana e incubación sobre medio de lactosa enriquecido (agar de lactosa TTC con heptadecilsulfato de sodio) y una temperatura de 44,5°C (+/-0,2°C).

3. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO.

Se utiliza la muestra de agua tomada para el análisis de coliformes totales que se encontraba guardada en frigorífico a 4°C.



Análisis microbiológico: Coliformes fecales

4. PROCEDIMIENTO

Colocar un filtro de membrana estéril sobre el soporte de filtración. Adaptar el embudo y conectar el matraz a una bomba eléctrica de vacío. Filtrar 100 ml de muestra si se trata de agua potable, y 0,1 y 1 ml si se trata de aguas no potables, previamente homogeneizadas. Lavar con unos 30 ml de agua destilada. Retirar el embudo. Mediante las pinzas esterilizadas, transferir la membrana filtrante sobre el medio de cultivo contenido en una placa de Petri, de modo que la superficie de filtración quede hacia arriba. Cerrar e invertir la placa e incubar a 44°C (+/-1°C) durante 24h (+/-2h).

5. LECTURA E INTERPRETACION

La lectura de los resultados requiere el examen de las colonias aparecidas sobre la membrana y el examen de los halos en la capa de agar subyacente a la membrana. La fermentación de la lactosa provoca la formación de un halo amarillo. Por ello se considera coliformes aquellas colonias que presentan halo amarillo, halo amarillo con centro **naranja** (*Escherichia* y *Citrobacter*), o halo amarillo con centro **rojo ladrillo** (*Klebsiella* y *Enterobacter*). La densidad se estima como el total de coliformes totales por 100ml, utilizando aquellos filtros de membrana que tengan 20-80 colonias de coliformes y no más de 200.

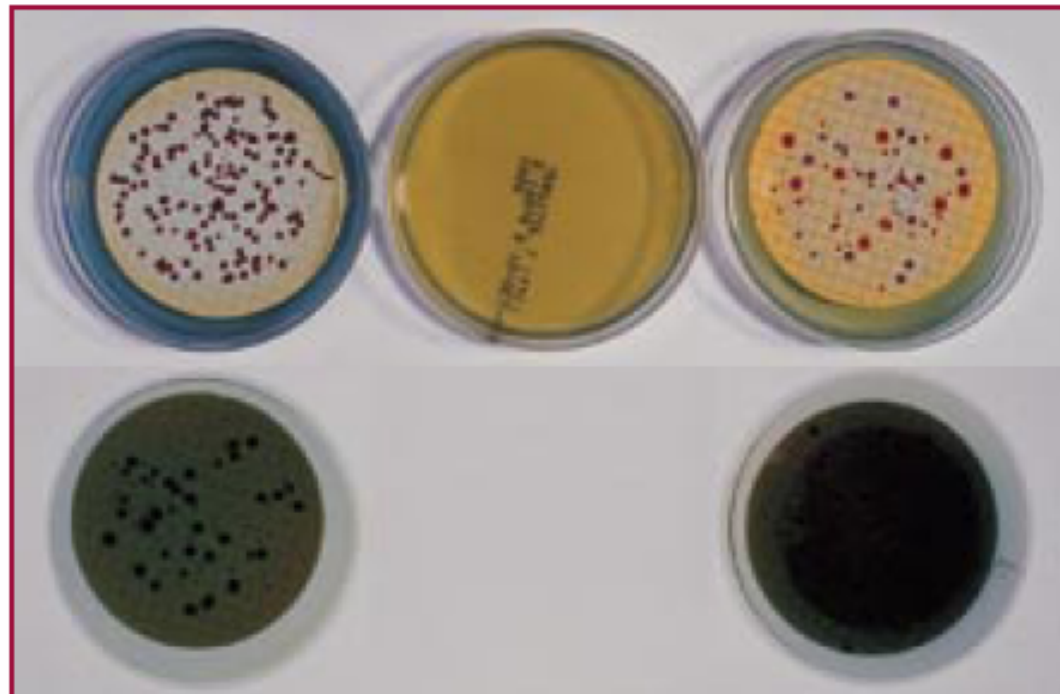
Coliformes y Escherichia coli

Tergitol 7, Agar (Chapman TTC modificado)

Cod. 424955 y 444955

Descripción:

Las colonias de coliformes se presentan de color amarillo, amarillo con centro naranja o rojo ladrillo con halo amarillo.



A

Agua contaminada con
S. typhimurium ATCC 14028 y
P. aeruginosa ATCC 10145 (100 ml)
Incubación a 37°C/ 24horas
Ausencia de coliformes

Placa **A** invertida
No aparece halo amarillo

B

Placa virgen

C

Agua contaminada con
S. typhimurium ATCC 14028 y
E. coli ATCC 25922 (100 ml)
Incubación a 37°C/ 24horas
Presencia

Placa **C** invertida
Aparece halo amarillo

Análisis microbiológico: Enterococos fecales

(Norma UNE-EN ISO 7899-2: 2001)

1. FUNDAMENTO

Los enterococos pueden considerarse como indicadores de contaminación fecal. Sin embargo, algunos enterococos presentes en las aguas pueden proceder de otros hábitats. Se pueden detectar y cuantificar las especies: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae*. Además, pueden determinarse ocasionalmente otras especies de *Enterococcus* y algunas especies de *Streptococcus* (en particular *S. bovis* y *S. equinus*). Estas especies de *Streptococcus* no tienen una supervivencia larga en agua y probablemente no puedan determinarse cuantitativamente. Como enterococos intestinales se consideran aquellos microorganismos capaces de reducir el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) y de hidrolizar la esculina en las condiciones y sobre unos medios específicos.

2. MÉTODO

Se utiliza para la determinación del número de enterococos intestinales mediante filtración de un volumen determinado del agua a analizar a través de filtros de membrana e incubación de los mismos sobre medios de cultivo a temperaturas adecuadas.

Análisis microbiológico: Enterococos fecales

3. PROCEDIMIENTO

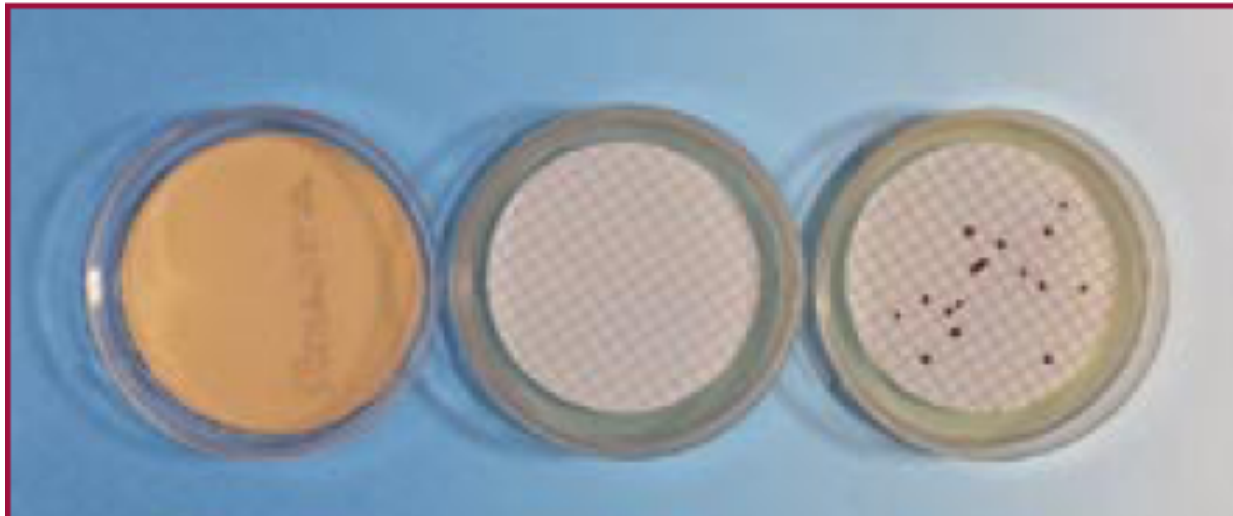
Se filtran 100 ml del agua a analizar previamente homogeneizada. Se coloca el filtro de membrana sobre el medio de Slanetz y Bartley y se incuban las placas a 37°C durante 48 h.

4. LECTURA E INTERPRETACIÓN

Tras la incubación, se consideran como colonias típicas de enterococos todas las que muestren un color rojo, marrón o rosado, en el centro o en toda la colonia, consecuencia de la reducción del TTC (incoloro) a trifenílformazán (rojo).

NOTA: Aunque no está incluido en la Normativa se realizará una tinción de Gram de una de las colonias positivas. Si hay colonias típicas se realizará un **ensayo confirmativo**. Para ello, con ayuda de unas pinzas estériles, se transfiere el filtro de membrana con las colonias, sin invertirla, sobre una placa con agar bilis-esculina-azida, precalentada a 44°C. Se incuba a 44°C durante 2 h y se lee la placa inmediatamente. En este medio, los enterococos hidrolizan la esculina dando origen a esculetina (6,7-dihidroocumarina) que se combina con los iones Fe^{3+} formando un compuesto de color marrón a negro. Por tanto, se considera que todas las colonias típicas que muestren un color de marrón a negro, en el medio circundante, dan reacción positiva y se cuentan como enterococos.

Enterococos



A
Placa virgen

B
Agua Potable (100 ml)
Incubación
a 37°C/ 24 horas
Ausencia/100ml

C
Agua contaminada
con *E. fecalis*
ATCC 19433 (100 ml)
Incubación
a 37°C/ 24horas
Presencia

Slanetz y Bartley, Medio

Cod. 423812 y 443812

Descripción:

Los Enterococos forman colonias de 1-2 mm de diámetro y de color rojo ladrillo.

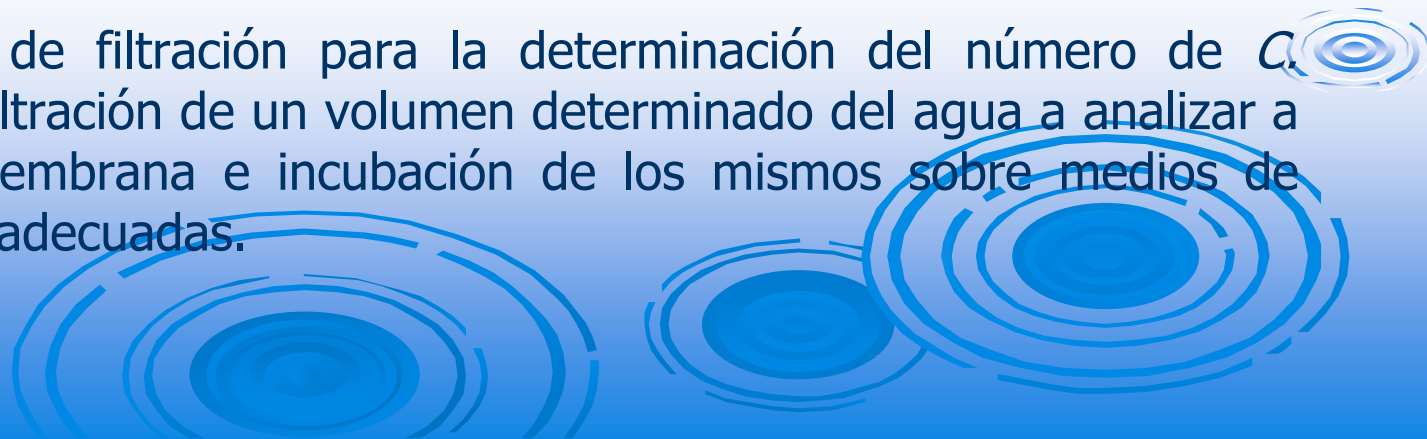
Análisis microbiológico: *Clostridium perfringens* (incluidas esporas)

1. FUNDAMENTO

Las bacterias incluidas en el género *Clostridium* tienen morfología bacilar, son Gram positivas, anaerobias estrictas y capaces de formar esporas. La especie *C. perfringens* está normalmente presente en heces. Sus esporas son resistentes al calor, a los procesos de desinfección y a los tratamientos de depuración habituales de las aguas (cloración), por lo que su supervivencia en agua es mayor. La diferenciación de *C. perfringens* de otras especies de *Clostridium*, se basa en su capacidad de fermentar la sacarosa con producción de ácido, en su incapacidad de fermentar la celobiosa (debido a la ausencia de β -D-glucosidasa) y en la producción de fosfatasa ácida.

2. MÉTODO

Se utiliza el método de filtración para la determinación del número de *C. perfringens* mediante filtración de un volumen determinado del agua a analizar a través de filtros de membrana e incubación de los mismos sobre medios de cultivo a temperaturas adecuadas.



Análisis microbiológico: *Clostridium perfringens* (incluidas esporas)

3. PROCEDIMIENTO

Siguiendo el método de filtración, se filtran 100 ml del agua a analizar, previamente homogeneizado. Se coloca el filtro de membrana sobre el medio de m-CP y se incuban las placas a 44°C durante 24 h en condiciones de anaerobiosis.

4. LECTURA E INTERPRETACIÓN

Tras la incubación, se consideran como colonias típicas de *C. perfringens* todas las que muestren un color amarillo opaco, consecuencia de la acidificación del medio tras la fermentación de la sacarosa, y que cambien a color rosa o rojo al cabo de 20 a 30 segundos de exposición a vapores de hidróxido amónico. En general, el resto de las especies de *Clostridium* aparecen de color azul-verdoso si, además de fermentar la sacarosa, son β -D-glucosidasa positivas (hidrolizan el indoxil- β -D-glucósido) o de color púrpura si no fermentan la sacarosa.

NOTA: Aunque no está incluido en la Normativa se realizará una tinción de Gram de una de las colonias positivas para observar al microscopio.

Colonias características de
C. perfringens en placa preparada
m-CP, Agar CULTIMED.



Viraje de las colonias de *C. perfringens*
en m-CP, Agar CULTIMED
tras la exposición a vapores de
hidróxido de amonio.



Análisis microbiológico: Bacterias aerobias

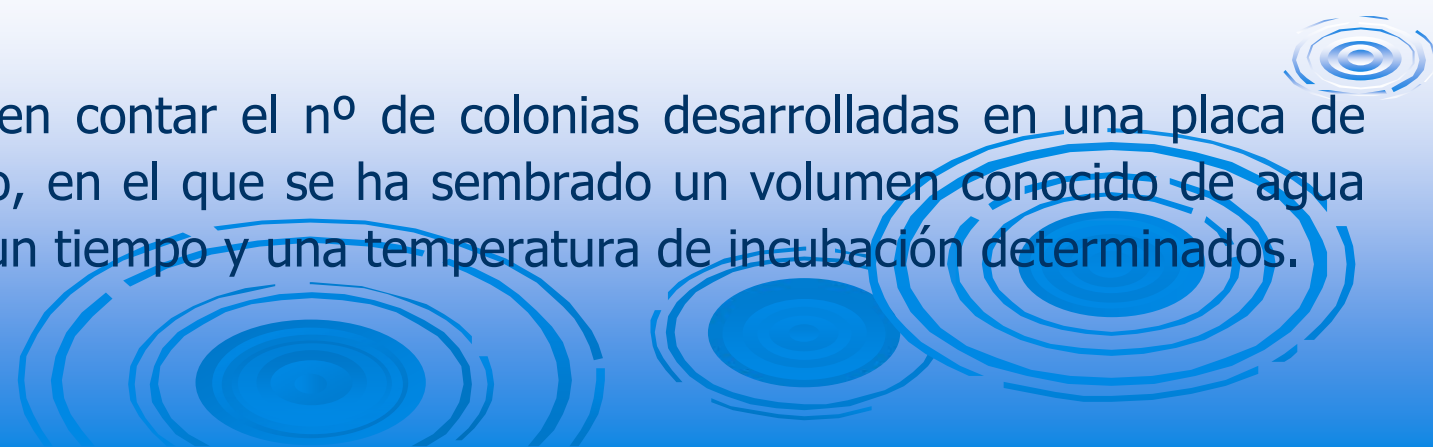
UNE EN ISO 6222:1999

1. FUNDAMENTO

Las bacterias aerobias son todas las bacterias heterótrofas, aerobias o anaerobias facultativas, mesófilas y psicotróficas capaces de crecer en un medio de agar nutritivo. Este recuento de colonias es útil para evaluar el estado de los recursos de agua en su origen y la eficacia del proceso de tratamiento de las aguas destinadas al consumo humano e indica la limpieza y el estado de los sistemas de distribución. De igual modo, permite detectar cambios anómalos en el número de microorganismos en la red de distribución. Así, todo aumento repentino del número obtenido puede advertir de la existencia de un foco de contaminación y requeriría su inmediata investigación.

2. MÉTODO

Este método se basa en contar el nº de colonias desarrolladas en una placa de medio de cultivo sólido, en el que se ha sembrado un volumen conocido de agua muestra, transcurrido un tiempo y una temperatura de incubación determinados.



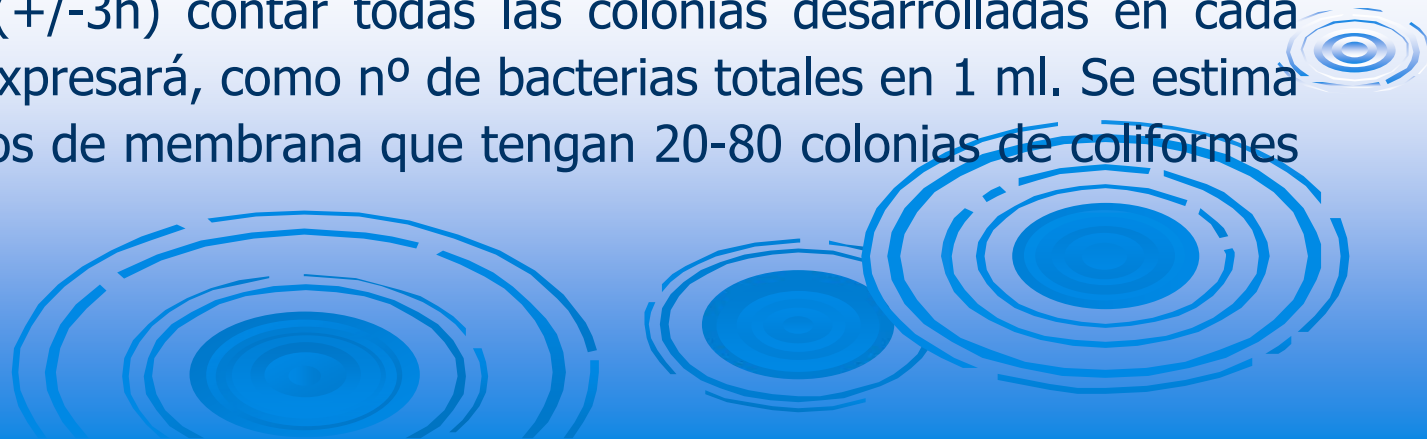
Análisis microbiológico: Bacterias aerobias

3. PROCEDIMIENTO

Preparar 3 tubos con 9 ml de agua peptonada cada uno. Inocular el caldo de peptona con diluciones decimales de la muestra de agua problema expresados en 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . De cada dilución depositar 1 ml en cada placa de Petri. Verter 30 ml de medio de cultivo de agar en cada placa y dejar solidificar (5-10min), invertir las placas y meterlas en la estufa a 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), incubar durante 48h. También se emplean placas con medio agar extracto de levadura en las que se siembra un volumen conocido de agua, y la incubación se lleva a cabo a 22°C durante 72 horas.

4. LECTURA Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Transcurridos 48h (± 3 h) contar todas las colonias desarrolladas en cada placa. El resultado se expresará, como n^o de bacterias totales en 1 ml. Se estima utilizando aquellos filtros de membrana que tengan 20-80 colonias de coliformes y no más de 200.



Recuento de Bacterias Aerobias

Nutritivo, Agar

Cod. 423792 y 443792



A

Placa virgen

B

Agua Potable (10 ml)

Incubación a 22°C/ 48 horas

<100 ufc/ml

C

Agua Potable (10 ml)

Incubación a 37°C/ 48 horas

<10 ufc/ml

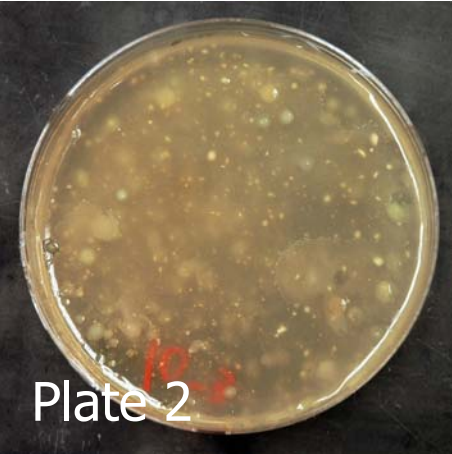
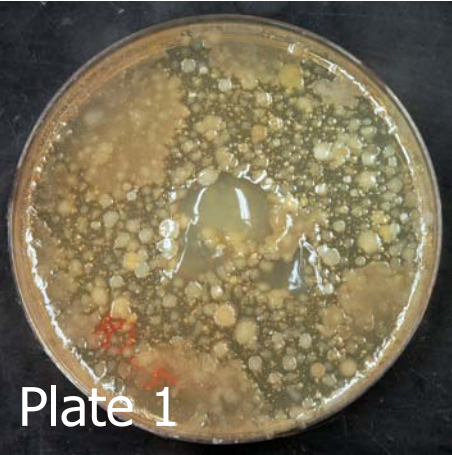
Aerobios totales: diluciones

10^{-2}

10^{-3}

10^{-4}

10^{-5}



Otras determinaciones

Rara vez se hacen otras determinaciones microbiológicas. Así, cuando la determinación de *C. perfringens* sea positiva y exista una turbidez mayor a 5 UNF (Unidad Nefelométrica de Formacina) se determinarán, si la autoridad sanitaria lo considera oportuno, *Cryptosporidium* u otros microorganismos o parásitos.

De igual modo, sólo en el caso de un brote epidémico se lleva a efecto la investigación de microorganismos transmitidos a través del agua:

- Salmonelas, Shigella, *Vibrio cholerae*
- Estafilococos patógenos
- Bacteriófagos fecales
- Enterovirus
- Protozoos
- Animálculos (gusanos-larvas)



Parámetros de la calidad microbiológica del agua

Depende del uso que se le:

- Uso doméstico o potable

Para aguas potables nos guiaremos por la Reglamentación Técnico-sanitaria para aguas potables de consumo público (Real Decreto 140/2003) o la Directiva comunitaria 75/440/CEE.



- Acuicultura (peces, crustáceos,...) y otros usos (envasada, medicinales, para baño, industria alimentaria, aplicaciones biológicas, análisis químicos,...)

Hay reglamentaciones específicas en todos los casos. Por ejemplo para baño y usos recreativos se sigue la Directiva comunitaria 76/160/CEE, y para piscicultura la 78/659/CEE.



Parámetros de la calidad microbiológica del agua

- Depurada para vertido

Para aguas residuales, por ende vertido, seguiremos la reglamentación europea en sus diferentes directivas, según se trate de vertidos a aguas subterráneas (D. 80/68/CEE), o a litorales o aguas continentales (D. 76/464/CEE), o la Normativa española dada por la Ley de Aguas R.D. 849/86 y de Costas (R.D. 1471/89).

A modo orientativo un agua residual urbana puede llegar a contener 108 coliformes totales/100 ml.



Borrador de Real Decreto que establece la reutilización de las aguas depuradas

Uso	Nematodos intestinales	<i>Escherichia coli</i>	Otros
1. USOS URBANOS			
1.1. Residenciales: Riego de jardines, descarga de aparatos sanitarios, sistemas de calefacción y refrigeración de aire y otros usos domésticos.	< 1 huevo/10 L	0 ufc /100 mL	<i>Legionella spp.</i> (si aerosoles) < 1000 ufc/L
1.2. Servicios urbanos: Riego de zonas verdes urbanas (parques, campos deportivos,...); baldeo de calles; sistemas contra incendios; fuentes y láminas ornamentales. Lavado industrial de vehículos.	< 1 huevo/10 L	< 200 ufc/100 mL	<i>Legionella spp.</i> (si aerosoles) < 1000 ufc/L
2. USOS AGRÍCOLAS			
2.1. Cultivos de Invernadero. Riego de cultivos para consumo en crudo. Frutales regados por aspersión.	<1 huevo/10 L	< 200 ufc/100 mL	<i>Legionella spp.</i> (si aerosoles) < 1000 ufc/L
2.2. Riego de pastos para consumo de animales productores de leche o carne. Riego de cultivos destinados a industrias conserveras y productos que no se consuman crudos. Riego de frutales excepto por aspersión. Acuicultura	<1 huevo/1L	<1.000 ufc/100 mL	No se fija límite <i>Taenia saginata</i> y <i>T. Solium</i>
2.3. Riego de cultivos industriales, viveros, forrajes ensilados, cereales, semillas oleaginosas y cultivo de flores ornamentales excepto por aspersión	<1 huevo/1L	<10.000 ufc/100 mL	No se fija límite
- Taxativamente prohibido el uso de agua regenerada para el cultivo de moluscos filtradores en Acuicultura			

Borrador de Real Decreto que establece la reutilización de las aguas depuradas

Uso	Nematodos intestinales	<i>Escherichia coli</i>	Otros
3. USOS INDUSTRIALES			
3.1. Refrigeración Industrial. - Queda prohibida la reutilización de aguas depuradas en los circuitos de refrigeración industrial de la industria alimentaria y similares.	No se fija límite	<10.000 ufc/100 mL	<i>Legionella spp</i> <100 ufc/L
4. USOS AMBIENTALES Y RECREATIVOS			
4.1. Riego de campos de golf	<1 huevo/10 L	< 200 ufc/100 mL	
4.2. Estanques, láminas de agua, fuentes y caudales circulantes de uso recreativo en los que no está impedido el acceso del público al agua (excepto baño).	<1 huevo/10 L	< 200 ufc/100 mL	No se fija límite
4.3. Estanques, láminas de agua y caudales circulantes ornamentales, en los que está impedido el acceso del público al agua.	No se fija límite	<10.000 ufc/100 mL	No se fija límite
4.4. Riego de bosques, zonas verdes y de otro tipo no accesibles al público. Silvicultura.	No se fija límite	No se fija límite	No se fija límite
5. RECARGA DE ACUÍFEROS			
5.1. Recarga de acuíferos por percolación localizada a través del terreno	No se fija límite	< 1.000 ufc/100 mL	No se fija límite
5.2. Recarga de acuíferos por inyección directa	< 1 huevo/10 L	0 ufc/100 mL	

USOS ESTABLECIDOS:

1. Los usos establecidos no serán los únicos posibles ni permitidos para el agua regenerada, cualquier nuevo uso no contemplado en la normativa básica deberá ser objeto de una regulación particular por la autoridad concedente del mismo.
2. Los criterios de calidad indicados para cada uno de los usos establecidos deben ser considerados como mínimos exigibles para la reutilización, pudiendo las autoridades competentes hacerlos más estrictos en las concesiones de agua si lo consideran conveniente.
3. Dentro de la categoría de los Nemátodos intestinales, se considerarán los géneros siguientes: *Ancylostoma*, *Trichuris*, *Ascaris*.
4. Se permite la reutilización de agua depurada para usos domiciliarios, con excepción del consumo humano que queda taxativamente prohibido, excepto en situaciones catastróficas o de emergencia. Dado el riesgo que comporta este uso, las autoridades deberán prestar una atención especial a la autorización de este tipo de concesión, además de asegurar un control estricto de las condiciones de reutilización exigidas.

