

5058UY

Determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales



Técnica de filtración por membrana

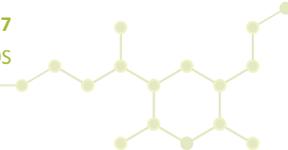
Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales filtrando un volumen determinado de la muestra, y obteniendo resultados en 24 horas.
- 1.2. Los enterococos son cocos gram positivos, anaerobios facultativos, que se presentan en parejas o en cadenas, siendo difícil distinguirlos de los estreptococos solo sobre la base de sus características físicas. Dos de las especies son comensales en el intestino humano: *E. faecalis* y *E. faecium*. También incluye otras especies como *E. gallinarum* y *E. avium*.
- 1.3. Los enterococos se diferencian de otros estreptococos por su habilidad de crecer en cloruro de sodio al 6,5 %, en bilis esculina agar, en BHIB agar a 10 °C y en caldo BHI a 45 °C. Los enterococos son muy resistentes y pueden tolerar una amplia variedad de condiciones ambientales.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento “Control de calidad analítico para verificar enterococos determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista” (5072UY)
- 2.6. Procedimiento “Modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis.” (5065UY)
- 2.7. Procedimiento “Control de calidad para análisis bacteriológicos.” (PGC 07)
- 2.8. Procedimiento “Limpieza de materiales.” (PR 16)
- 2.9. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02)
- 2.10. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 13, 86 y 97)
- 2.11. Instructivo de uso balanza plato abierto (INE 16)
- 2.12. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.13. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.14. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.15. Instructivo de uso analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98)
- 2.16. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44)
- 2.17. Rutas de análisis (RMB 06)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El grupo de enterococos para la técnica de filtración por membrana se define como todas aquellas bacterias que cuando se incuban en medio mEI por 24 h a 41 °C ± 0,5 °C desarrollan colonias con un halo azul, sin importar el color de las colonias.
- 3.2. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa y su incubación en un medio de cultivo selectivo a 41 °C.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El análisis y el recuento deben ser realizados utilizando túnica y guantes descartables a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Aguas con gran turbidez; presencia de tóxicos orgánicos como fenoles; existencia de una carga de bacterias muy grande de otros microorganismos.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, y estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla.
- 6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas. Referirse al **Procedimiento 5065UY**, cuando sea necesario realizar la modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis.
- 6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual. Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.
- 6.5. Cuando la muestra posee metales pesados ($> 1,0\text{ mg/L}$), el frasco de muestreo debe contener EDTA a pH 6,5 como agente quelante. Deben agregarse al frasco de muestreo antes de la esterilización del mismo 0,3 mL de una solución de EDTA al 15 % (p/p) cada 120 mL de muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de filtración: embudo y portafiltro poroso que se puedan trabar entre sí y se puedan esterilizar; bomba de vacío; kitasato de 1 litro o mayor; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío. En lo posible, la presión de vacío sobre el filtro debe ser de 34-51 Kpa.
- 7.2. Balanzas de resolución 0,01 g
- 7.3. Incubadora a $41 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10 a 15x y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de 60-80° con la placa (de preferencia).
- 7.5. Autoclave
- 7.6. Mecheros
- 7.7. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 47 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado.
- 7.8. Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles de $0,45\text{ }\mu\text{m} \pm 0,02\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro, libre de glicerina y sin áreas hidrofóbicas, de 47 mm de diámetro.
- 7.9. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.
- 7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca.
- 7.11. Pipetas automáticas de 1000 μL y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas.
- 7.12. Material de vidrio estéril para preparación del medio de cultivo.
- 7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.14. Heladera a 2-8 $^{\circ}\text{C}$.
- 7.15. Anzas
- 7.16. Cámara de Flujo Laminar (de preferencia)
- 7.17. Microondas (de preferencia)
- 7.18. Cinta de revelado de autoclave
- 7.19. Destilador de agua (Barnstead o similar)
- 7.20. Desionizador de agua (Milli-Q o similar)
- 7.21. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)



8. REACTIVOS

- 8.1. Peptona (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.2. Etanol
- 8.3. Medio de cultivo mE Agar
- 8.4. Agua desionizada (grado 2 según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.5. Acido nalidíxico ($C_{12}H_{12}N_2O$ Nro. CAS 389-08-2)
- 8.6. Triphenyl tetrazolium chloride (TTC $C_{19}H_5ClN_2$ Nro. CAS 298-96-4)
- 8.7. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS. 1310-73-2) 0,1 N
- 8.8. Indoxyl- β -D-glucoside ($C_{14}H_{17}NO_6$ Nro. CAS 487-60-5)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en la realización del medio de cultivo, así como en el procedimiento analítico debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y esterilizado.
- 9.2. Las placas de Petri de plástico deben estar estériles.
- 9.3. Los punteros de las pipetas automáticas y los embudos de filtración deben ser esterilizados previo su utilización.
- 9.4. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas.

Preparación del agua peptonada al 0,1 %

- 11.1. Adicionar 1 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días.

Preparación del medio de cultivo mEI.

- 11.4. Agregar 71,2 g del medio deshidratado mE y 0,75 g de indoxyl- β -D glucoside a 1 litro de agua desionizada, y calentar hasta que los ingredientes se disuelvan. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos, y posteriormente enfriar en un baño de agua a 44-46 °C.
- 11.5. Reactivos a agregar luego de la esterilización: mezclar 0,24 g de ácido nalidixico en 5 mL de agua desionizada estéril, agregar unas pocas gotas de NaOH 0,1 N para disolver (aproximadamente 0,2 mL). Filtrar para esterilizar y agregar al medio mEI. Agregar separadamente 0,02 g de triphenyl tetrazolium chloride (TTC) al medio mEI y mezclar.
- 11.6. El pH final del medio debe ser $7,1 \pm 0,2$. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período máximo de 14 días, ya sea en Erlenmeyer o repartido en las placas. Dejar registro en la ruta de análisis.

Preparación de las Placas de Petri

- 11.7. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatarlo a 45 °C. Colocar aproximadamente 3 mL de medio por cada placa de 47 mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.
- 11.8. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo.
- 11.9. Almacenar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta su utilización.

Preparación de tubos para diluciones

- 11.10. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar.
- 11.11. Colocar 9 mL ± 0,2 mL de agua desionizada en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio o papel de embalaje.
- 11.12. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.13. Conservar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis del de la muestra.

- 11.14. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1 mL de muestra o de la dilución previa, a los 9 mL de agua desionizada. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra es conveniente filtrar tres volúmenes diferentes.
- 11.15. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadrículada hacia arriba sobre el portafiltras poroso del embudo utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.
- 11.16. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.
- 11.17. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vortex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.
- 11.18. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo en la placa de Petri sobre el medio, con la parte cuadrículada hacia arriba, evitando la formación de burbujas de aire, pasar suavemente la pinza por el borde del filtro para sacar el aire. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla en la mesada para luego ser incubada.
- 11.19. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua peptonada estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.
- 11.20. Si el volumen a filtrar es poco (1 mL) colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.
- 11.21. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.
- 11.22. Incubar las placas de Petri en posición invertida dentro de bolsas herméticas, en incubadora a 41 °C ± 0,5 °C durante 24 h ± 2 h.

Recuento

- 11.23. Las colonias de enterococos son aquellas que presentan un halo azul, sin importar el color de las mismas.
- 11.24. El recuento de colonias se realiza en las placas que contengan entre 20 y 60 colonias de enterococos.

12. ANÁLISIS DE DATOS

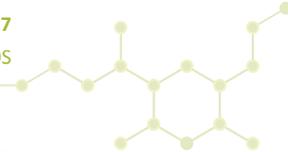
- 12.1. La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$\text{Enterococos (ufc/100 mL)} = \frac{\text{colonias de enterococos contadas} \times 100}{\text{mL de muestra filtrados}}$$

donde:

ufc: corresponde a Unidades Formadoras de Colonias.

- 12.2. Si las colonias crecen uniéndose sobre la membrana se informa como crecimiento confluyente con o sin presencia de enterococos y se sugiere la realización de otro muestreo del mismo punto.
- 12.3. Si el número de colonias de enterococos fuera entre 20 y 60 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto.



12.4. Si el número de colonias típicas es mayor a 60, el recuento se realiza siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación:

- Dividir la placa en 4 cuadrantes, contar en uno, multiplicar por cuatro.
- Contar 10 cuadrados del filtro al azar, promediar, multiplicar por el número total de cuadrados del filtro.

12.5. Si el recuento es cero, hay dos casos a considerar:

- Cuando el volumen filtrado es de 100 mL, se informa < 1 ufc/100 mL.
- Cuando el volumen filtrado es menor 100 mL, considerar 1 ufc en el mayor volumen filtrado, calcular la densidad de enterococos, y expresar los resultados como < valor obtenido.

12.6. Si el número de colonias a contar es menor a 20 se considera el recuento de la placa más cercana al rango aceptable. Por ejemplo si se examinan 50, 25 y 10 mL, y el conteo es 15, 6 y < 1 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(15 \times 100)}{50} = 30 \text{ enterococos /100 mL}$$

12.7. Si el número de colonias a contar es menor y mayor a 20, se considera el recuento de las placas más cercanas al rango aceptable. Por ejemplo si se examinan 0,1 y 0,03 mL, y el conteo es 78 y 21 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(78 + 21) \times 100}{(0,1 + 0,03)} = 76.000 \text{ enterococos /100 mL}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Calidad del proceso analítico:** Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis, filtrando al inicio y al final del procesamiento de muestras, 100 mL de agua estéril e incubando la placa con el filtro bajo las mismas condiciones que las muestras. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.

Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control de temperatura de la incubadora).

Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.

13.2. **Control de la precisión:** Para el control de la precisión del método se debe establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico. Dicho criterio debe ser establecido para los diferentes tipos de aguas que sean analizados por la técnica de membrana filtrante.

Al comienzo de nuevos programas de monitoreo, hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo criterio de precisión rápidamente. Una vez que está establecido el criterio de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al Sector por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 2), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido.

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

Repetibilidad: Chequeo mensual del recuento de un mismo analista a través de la duplicación de los conteos de una misma placa, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington DC. Método 9230 C Membrane filter techniques pp. 9-112 a 9-115.

14.2. EPA. Method 1600: Enterococci in water by membrane filtration using membrane-enterococcus Indoxyl-β-D-Glucoside Agar (mEI). Diciembre 2009.