

5079UY

Determinación de Enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales



Sustrato definido, Enterolert™

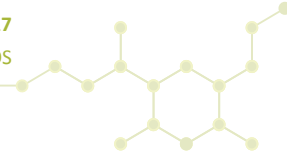
Elaborado - G. Pistone

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 domésticas e industriales, obteniendo resultados en 24 horas.
- 1.2. El grupo enterococos es un subgrupo del grupo de estreptococos fecales, que incluye *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. avium*. Los enterococos se diferencian de otros estreptococos por su habilidad de crecer en cloruro de sodio al 6,5%, en bilis esculina agar, y en BHIB agar a 10 °C y en caldo BHI a 45 °C.
- 1.3. El límite de detección, al igual que el límite de cuantificación, es de 1 NMP/100 mL.

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 de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.6. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16)
- 2.7. Instructivo de uso de autoclaves verticales (INE 13, INE 86, INE 97)
- 2.8. Instructivo de uso de balanza (INE 16)
- 2.9. Instructivo de uso de cámara de flujo laminar (INE17)
- 2.10. Instructivo de uso de destilador Barnstead (INE 36)
- 2.11. Instructivo de uso de desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.12. Instructivo de uso de agitador vórtex (INE 44)
- 2.13. Instructivo de uso de sellador Quanti-tray (INE 43)
- 2.14. Ruta de análisis (RMB 10)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El método consiste en agregar a 100 mL de la muestra de agua un reactivo específico, e incubar la muestra durante 24 horas. Enterolert™ detecta enterococos tales como *E. faecium* y *E. faecalis* en agua dulce y agua de mar. La identificación se basa en que cuando los enterococos utilizan su enzima β -D-glucosidasa para metabolizar el indicador de nutrientes de Enterolert, 4-metil-umbeliferil β -D-glucosido, la muestra fluoresce.
- 3.2. Enterolert™ detecta enterococos en una muestra de agua de 1 NMP/100 mL dentro de 24 horas.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El análisis debe ser realizado utilizando guantes descartables, lentes y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Si la muestra de agua tiene un cierto color de fondo, comparar la muestra inoculada de Enterolert™ con un blanco testigo de la misma muestra de agua.
- 5.2. La muestra de agua de mar deberá diluirse al menos 10 veces con agua destilada estéril.
- 5.3. Enterolert™ es una prueba primaria del agua. Las características de desempeño de rendimiento de Enterolert™ no se aplican a muestras alteradas por cualquier enriquecimiento o concentración previos.
- 5.4. Algunas especies del género *Serratia*, *Klebsiella*, y *Aerococcus* (no enterococos) que producen la enzima β -D-glucosidasa, no producen respuesta positiva a menos que se encuentren a una concentración mayor a 10^5 ufc/100 mL

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, estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar.
- 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 h.
- 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 0,3 mL de una solución de EDTA al 15 % (p/p) cada 120 mL de muestra deben agregarse al frasco de muestreo antes de la esterilización del mismo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

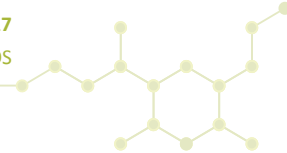
- 7.1. Bandeja de incubación (Quanti-Tray IDEXX).
- 7.2. Sellador de bandejas (Quanti-Tray Sealer Model 2X IDEXX).
- 7.3. Probetas de 100 mL estériles.
- 7.4. Estufa de incubación a $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.5. Lámpara UV 365 nm.
- 7.6. Recipientes estériles de vidrio con capacidad mínima de al menos 150 mL.
- 7.7. Anzas.
- 7.8. Autoclave.
- 7.9. Mecheros.
- 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. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.13. Heladera a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.14. Cámara de flujo laminar (de preferencia).
- 7.15. Cinta de revelado de autoclave.
- 7.16. Destilador de agua (Barnstead o similar).
- 7.17. Desionizador de agua (Milli-Q o similar).
- 7.18. Balanza de resolución 0,01 g.

8. REACTIVOS

- 8.1. Reactivo Enterolert™ IDEXX
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según norma ISO 3696 en su versión vigente).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Trabajar entre dos mecheros encendidos para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.
- 9.2. El material de vidrio que se emplee debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y esterilizado.



10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua desionizada estéril

- 11.1. Adicionar 1000 mL de agua desionizada en una botella.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días.

Preparación de tubos para diluciones

- 11.4. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra.
- 11.5. Colocar 9 mL \pm 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.
- 11.6. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.
- 11.7. Conservar en heladera (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis de la muestra

- 11.8. Añadir el contenido del reactivo Enterolert™ a una muestra de 100 mL de agua (o la dilución correspondiente) a temperatura ambiente, y en un recipiente estéril. En el caso de realizar diluciones, siempre llevar a 100 mL con agua desionizada estéril.
- 11.9. Tapar y agitar el recipiente hasta disolver.
- 11.10. Verter la mezcla de muestra + reactivo en una bandeja de incubación y sellar en el sellador de Quanti-Tray de IDEXX.
- 11.11. Colocar la bandeja sellada en la incubadora a 41 °C \pm 0,5 °C durante 24 horas.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Para determinar el NMP de enterococos /100 mL buscar fluorescencia usando una luz ultra violeta de 6 vatios, y 365 nm a una distancia de unos 13 cm de la muestra en un ambiente oscuro. Apuntar el haz de luz en dirección contraria a los ojos y hacia la muestra. Contar el número de pocillos fluorescentes grandes y chicos y obtener el valor de la tabla de doble entrada. Este valor corresponde al NMP (número más probable) de enterococos /100 mL. En caso de haber diluido la muestra realizar la corrección correspondiente.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Inocular 2 recipientes estériles con 100 mL de agua estéril, con lo siguiente:

- a) *Enterococcus sp.*
- b) Coliforme termotolerante.

Seguir el procedimiento antes mencionado para el análisis de muestras.

Incubar 100 mL de agua estéril para comprobar esterilidad.

Los resultados obtenidos deben ser:

no fluorescente	agua estéril
no fluorescente	coliforme termotolerante
fluorescencia azul	Enterococcus

- 13.2. Realizar el control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control de temperatura de la incubadora).
- 13.3. **Control de la precisión del método:** Establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC 07). Al comienzo de programas hacer las 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 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido.
- 13.4. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.
- 13.5. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista, 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, WPCF, Washington, DC. Método 9230 D Fluorogenic Substrate Enterococcus Test pp. 9-115 a 9-117.
- 14.2. Manual de instrucciones Enterolert™. 2004. IDEXX Laboratories, Inc.

