



ADAPTRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para
a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia

Procedimiento de trabajo

Aislamiento y recuento de *E. coli* y
coliformes en aguas residuales y
depuradas mediante filtración por
membrana (basado en ISO 9308-1:2014)

Objetivo 2 - Actividade 2.2

Autor: Néstor Abreu

Revisado por: Gilberto Martel y Vanessa Millán

Parceiro: ITC

Fecha: octubre de 2020

Versión: 1





INDICE

1. OBJETO	2
2. ALCANCE	2
3. REFERENCIAS	2
4. DEFINICIONES	2
5. FUNDAMENTO	3
5.1. Filtración por membrana	3
5.2. Confirmación	4
6. REACTIVOS, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	4
6.1. Reactivos	4
6.2. Soluciones	4
6.3. Medios de cultivo	5
7. EQUIPAMIENTO	6
8. PROCEDIMIENTO	7
8.1. Preparación de la muestra	7
8.2. Filtración e incubación	8
8.3 Recuento y confirmación	9
9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS	10
10. OBSERVACIONES	10



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



1. OBJETO

El objetivo de este procedimiento es establecer un plan de trabajo para el aislamiento y recuento de *Escherichia coli* y coliformes en aguas depuradas cuando el ensayo se realiza según el siguiente método.

2. ALCANCE

Este procedimiento se establece para el aislamiento y recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes en aguas depuradas según la técnica de filtración por membrana.

3. REFERENCIAS

- 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.
- Lange B et al. 2013. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Letters Appl. Microbiol. 57, 547-553.

4. DEFINICIONES

Coliformes: Microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae que expresan la enzima β -galactosidasa. Bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, citocromo oxidasa negativos, capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas. Los coliformes totales incluyen especies que pueden habitar en el intestino de animales de sangre caliente o que se encuentran naturalmente en el suelo, la vegetación y el agua. Por lo general, se encuentran en agua contaminada con heces y a menudo se asocian con brotes de enfermedades. Aunque no suelen ser patógenos en sí mismos, su presencia en el agua potable indica la posible presencia de patógenos.

***Escherichia coli*:** Microorganismo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae que expresa las enzimas β -galactosidasa y β -glucuronidasa. *E. coli*, es una especie del grupo de los coliformes, que siempre se encuentra en las heces y, por lo tanto, es un indicador más directo de contaminación fecal



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



y de la posible presencia de patógenos entéricos. Además, algunas cepas de E. coli son patógenas por sí mismas. Su presencia en ambientes no entéricos es limitada, por lo que su detección en el agua indica un origen reciente de la contaminación.

Filtración por membrana (MF): Técnica por la que se hace pasar una muestra de agua problema a través de un filtro de membrana microporosa, en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Se utilizan membranas que suelen tener un tamaño de poro de 0,45 micras ya que la mayoría de los microorganismos tienen un tamaño superior (diámetro).

Prueba del indol: Prueba que se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias. Esta enzima degrada el aminoácido triptófano a indol, que es el compuesto que se detecta en el ensayo. Si en el medio de cultivo se encuentra este aminoácido y la bacteria posee la enzima, al añadir el reactivo de Kovacs se producirá un halo rojo alrededor de la colonia.

β -D-glucuronidasa: Enzima de la familia de las glucosidasas que catalizan la descomposición de los carbohidratos complejos. Se encuentra presente en E. coli pero no en otros miembros del grupo de los coliformes.

β -D-galactosidasa: Enzima hidrolítica que cataliza la hidrólisis de los galactósidos hasta monosacáridos. Esta enzima se encuentra en todos los miembros del grupo coliforme.

5. FUNDAMENTO

5.1. Filtración por membrana

El recuento de E. coli y coliformes mediante filtración por membrana se basa en la filtración de un volumen determinado de agua, o dilución de la misma, a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro capaz de retener estas bacterias (0,45 μ m). El filtro se coloca sobre el medio selectivo (Agar Cromogénico Coliformes, CCA), al que se le añade un suplemento con antibióticos para inhibir la flora acompañante, y se incuba en atmósfera aeróbica según las especificaciones del medio.

5.2. Confirmación.

El agar CCA se basa en reacciones enzimáticas que dan color a las colonias de los organismos objetivo para una detección simultánea de E. coli y coliformes. Se contabilizan todas las colonias que han aparecido sobre la superficie de la membrana observando el desarrollo de color: E. coli produce colonias de un color azul oscuro a violeta debido a que posee las dos enzimas (β -D-glucuronidasa y β -D-galactosidasa) que escinden las dos sustancias cromogénicas presentes en el medio (X-glucurónido y Salmon-GAL), mientras que las bacterias coliformes sólo tienen una enzima (β -D-galactosidasa) que escinde el sustrato Salmon-Gal dando lugar a colonias de color rojo salmón.

6. REACTIVOS, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

6.1. Reactivos

1. Cloruro sódico (NaCl) (CAS 7647-14-5) (Scharlab Ref. SO022710500 o similar).
2. Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O) (CAS nº 10034-99-8) (Scharlab Ref. MA00850500 o similar).
3. Cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂·2H₂O) (CAS nº 10035-04-8) (Scharlab Ref. CA01940500 o similar).
4. Hidrógeno fosfato de disodio (Na₂HPO₄) (CAS nº 7558-79-4) (Scharlab Ref. SO03370500 o similar).
5. Dihidrógenofosfato de potasio (KH₂PO₄) (CAS nº 7778-77-0) (Scharlab Ref. PO02600500).
6. Agua destilada tipo II.
7. Alcohol para quemar.
8. Reactivo de Kovacs (Scharlab Ref. RE0007G100 o similar)

6.2. Soluciones

1. [Solución Salina de Page \(SSP\)](#).

Reactivo	Cantidad
Cloruro sódico	0,120 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,004 g



Cloruro de calcio hidratado	0,004 g
Hidrógeno fosfato de disodio	0,142 g
Dihidrógenofosfato de potasio	0,136 g
Agua destilada	1000 ml

Para una preparación más precisa, se recomienda preparar un volumen de 10 l. de la solución y repartirlo en volúmenes más pequeños, según se requiera y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

6.3. Medios de cultivo

1. Agar Cromogénico Coliformes (CCA) (Scharlab Ref. 01-797-500 o similar), al que se debe añadir el Suplemento Selectivo Coliform CV (Scharlab Ref. 06-116LYO1 o similar).

Medio sólido y diferencial para la detección y recuento de Escherichia coli y coliformes en aguas.

Composición:

Reactivo	Cantidad
Digerido enzimático de caseína	1,00 g
Extracto de levadura	2,00 g
Cloruro sódico	5,0 g
Hidrógeno fosfato disódico	2,70 g
Dihidrógeno fosfato de sodio di-hidratado	2,20 g
Triptófano	1,00 g



Piruvato sódico	1,00 g
Tergitol® 7	0,15 g
Sorbitol	1,00 g
6-Cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosido	0,20 g
5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glucuronido	0,10 g
IPTG	0,10 g
Agar	13,00 g

Se disuelve el liofilizado, en agua destilada según las recomendaciones del fabricante, se lleva a ebullición agitando con frecuencia hasta disolución completa. **NO AUTOCLAVAR NI SOBRECALENTAR.** Si es necesario se ajusta el pH a $6,8 \pm 0,2$ después del tratamiento. Enfriar hasta $45-50^{\circ}\text{C}$ y añadir el contenido de 1 vial del Suplemento Selectivo Coliform CV por cada 500 ml del medio base. Homogeneizar evitando la formación de burbujas y, en un ambiente aséptico, verter el medio fundido a razón de 10 ml en placas de Petri de 55 mm de diámetro. Se deja solidificar el medio en las placas sobre una superficie nivelada. Llegado este punto, las placas se pueden conservarse hasta 3 semanas a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

7. EQUIPAMIENTO

1. Autoclave, capaz de mantener una temperatura de $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
2. Balanza de precisión (0,001 g).
3. Placa calefactora con agitación (que alcance 100°C).
4. Equipo de filtración por membrana conforme a la Norma ISO 8199 (rampa de filtración de 3 puestos más bomba de vacío).
5. Embudos de filtración estériles desechables de 100 ml (se pueden reutilizar una vez autoclavados. Soportan varios ciclos de autoclave).
6. Filtros de membrana estériles, de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño nominal de poro y cuadrículadas.
7. Soplete de laboratorio.
8. Placas de Petri de 55 mm con agar CCA.
9. Estufa microbiológica, capaz de mantener una temperatura de $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

10. Agitador vórtex.
11. pHmetro.
12. Refrigerador.
13. Pinzas de laboratorio de punta plana para la manipulación de los filtros de membrana.
14. Vaso de vidrio de unos 50 ml de capacidad con alcohol para quemar.
15. Pipeta automática de 1000 µl.
16. Pipeta automática de 5000 µl.
17. Tubos de ensayo estériles de vidrio borosilicato de 13 ml con tapón.
18. Gradillas para tubos de 13 ml.
19. Mechero de gas butano o de alcohol.
20. Guantes desechables de varias tallas (S, M, L, XL).
21. Puntas estériles para pipeta automática 100-1000 ul.
22. Puntas estériles para pipeta automática 1000-5000 µl.
23. Material de vidrio para la preparación del medio de cultivo.
24. Frascos lavadores para SSP.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación de la muestra

El volumen de agua a filtrar dependerá de la concentración bacteriana de la muestra, de tal manera que se ha de procurar filtrar la cantidad adecuada para que el número de colonias que crezcan en el filtro quede en el intervalo recomendado para el cálculo final, que no deben ser inferiores a 20 y superior a 60 colonias típicas. En la mayoría de los casos, para aguas depuradas o regeneradas deben prepararse diluciones en SSP estéril.

1. Se preparan 3 tubos con 9 ml de SSP estéril.
2. Se añade al primer tubo 1 ml de la muestra a analizar previamente homogeneizada (dilución 1/10 o 10-1), se agita en vórtex y, con una punta de pipeta nueva se toma 1 ml de esta dilución y se añade al segundo tubo con 9 ml de SSP estéril (dilución 1/100 o 10-2).



3. Se agita en vórtex y, con una nueva punta, se toma 1 ml de esta dilución y se añade al tercer tubo de SSP estéril (dilución 1/100 o 10⁻³).
4. Realizar la misma operación tantas veces como diluciones se requiera en función de la carga bacteriana estimada de la muestra. En la última dilución que se prepare, se agita en vórtex y con una nueva punta se toma 1 ml y se descarta.

8.2. Filtración e incubación

El equipo de filtración debe estar instalado con excepción del embudo. Tanto el embudo como el soporte de filtración deben estar estériles. Se debe trabajar cerca de una fuente de calor (mechero de gas o alcohol), para crear un flujo de aire ascendente y evitar contaminaciones accidentales. Al conectar la bomba comprobar que proporciona suficiente vacío, si no sucede esto, comprobar que las llaves estén cerradas y que las conexiones no presenten fugas. Las pinzas deben estar en un lugar accesible y se deben mantener en un vaso pequeño con las puntas sumergidas en alcohol de quemar o similar para su esterilización por flameado antes de cada uso.

1. Esterilizar el soporte de filtración con un soplete (dejar enfriar).
2. Con la ayuda de las pinzas previamente flameadas, colocar un filtro de membrana (0,45 µm de diámetro de poro) en el soporte de filtración, procurando que quede bien centrada y con la cuadrícula hacia arriba.
3. Colocar el embudo de filtración (100 ml) sobre el soporte con la membrana.
4. Se homogeneiza la muestra o dilución y según el volumen de agua a filtrar se pueden considerar los siguientes casos:
 - Si el volumen a filtrar es superior a 50 ml se puede filtrar directamente de una sola vez.
 - Si el volumen de agua a filtrar está entre 1 y 50 ml se introducen previamente en el embudo unos 20 ml de SPS estéril y a continuación se añade la muestra o dilución.
 - No se deben filtrar volúmenes de agua inferior a 1 ml. Cuando esto suceda se debe diluir la muestra como se comentó en el apartado 8.1 y hacer la filtración con el volumen de dilución igual o superior a 1 ml.
 - Sea cual sea el volumen utilizado, hacer el análisis por duplicado para realizar la media durante la fase de recuento y confirmación.
5. Se aplica vacío para realizar la filtración.
6. Lavar con SPS estéril (aproximadamente 30 ml), para arrastrar las partículas que puedan haber quedado, y volver a filtrar.
7. Retirar el embudo de filtración y, con ayuda de las pinzas flameadas previamente y enfriadas, se retira la membrana del soporte y se coloca con la cuadrícula hacia arriba sobre una placa de Petri



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



MAC 2014-2020
Cooperação Territorial



Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



con agar CCA. Es importante asegurarse que no queden burbujas de aire entre el medio y la membrana, ya que impedirían el crecimiento bacteriano.

8. Se tapan las placas y en posición invertida se incuban en estufa a $36\pm 2^{\circ}$ C durante 18-24 h. (Esta temperatura debería controlarse diariamente conservando dentro de la estufa un termómetro sumergido en un frasco con agua).
9. El análisis se debe realizar por duplicado. Realizar dos filtraciones por muestra o dilución, obteniéndose como resultado final la media de los recuentos de las colonias que han crecido en las dos placas.

8.3 Recuento y confirmación

1. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las placas se retiran de la estufa y se realiza el recuento de las colonias sospechosas. El recuento se debe hacer dentro de los 30 minutos siguientes de haber sacado las placas de la estufa.
2. El medio contiene 6-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosido (Salmon[®]-GAL) y el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucuronido (X-Glucuronido). La primera de las sustancias es selectivamente degradada por la enzima característica de coliformes, la β -D-galactosidasa, provocando que la colonia de coliformes adquiera un color que va del salmón al rojo, en función de la intensidad de la actividad enzimática. La segunda sustancia cromogénica es atacada por la β -D-glucuronidasa, un enzima presente en todas las cepas de E. coli, de forma casi exclusiva y que libera un pigmento azulado que tiñe la colonias de tonos azules. E. coli posee los dos enzimas y ataca los dos sustratos cromogénicos con lo cual la colonia se tiñe de un color azul oscuro o violáceo como resultado del acúmulo de los dos pigmentos liberados. Los coliformes totales se consideran la suma de las colonias de E. coli (color azul-violeta) más las de coliformes (salmón-rojo). Las otras colonias de bacterias Gram – (las Gram + son inhibidas por el Tergitol[®]7) aparecen incoloras, excepto algunas pocas capaces de producir glucuronidasa, que dan colonias de color azul claro a azul turquesa y que se diferencian bien de las de E. coli o de las coliformes.
3. Se recomienda verificar la identidad de E. coli por la producción de indol, ya que el triptófano se ha incluido en el medio para este fin. Para ello se cubre la colonia azul oscuro-violeta con una gota del Reactivo de Kovacs para indol. Si el reactivo vira a un color rojo en pocos segundos se considera la producción de indol (+) y con ello la presencia de E. coli queda confirmada.
4. Al utilizarse el medio CCA con la técnica de filtración por membrana, deberá tenerse en cuenta que el color y tamaño de las colonias puede modificarse por la composición y tipo de la membrana, por lo cual se recomienda una validación previa del tipo de membrana filtrante.



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



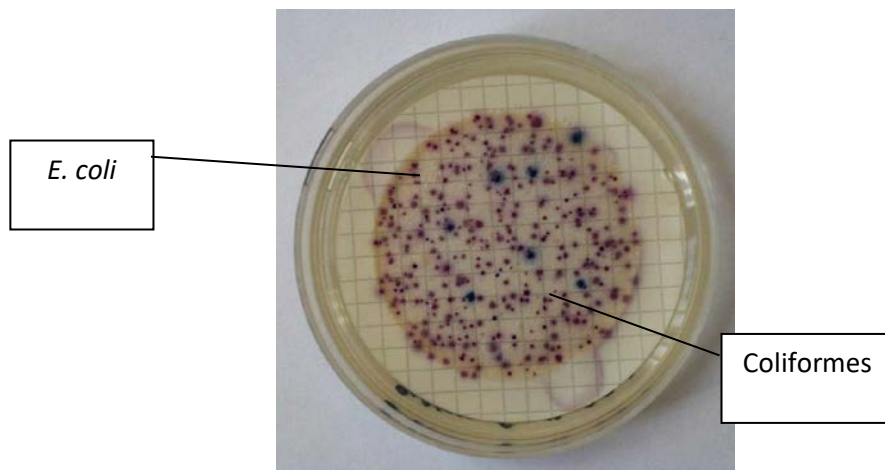
MAC 2014-2020
Cooperação Territorial

Interreg 
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Los resultados se expresan en forma de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por 100 ml.
2. En el caso de haber filtrado 1 ml de una dilución, el número medio de colonias contadas en las placas de la dilución adecuada se multiplica por dicha dilución y a continuación por 100 para obtener UFC/100 ml.
3. En el caso de haber filtrado 1 ml de muestra directamente, el número medio de colonias contadas se multiplica por 100 para obtener UFC/100 ml (no recomendable).
4. En el caso de haber filtrado 10 ml de muestra directamente, el número medio de colonias contadas se multiplica por 10 para obtener UFC/100 ml.
5. En el caso de haber filtrado 100 ml de muestra directamente, el número medio de colonias contadas será el número de UFC/100 ml.

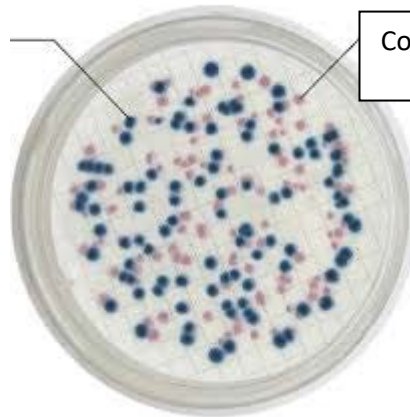
10.OBSERVACIONES



E. coli/Coliformes en medio CCA



E. coli



Coliformes