

## TP N°9: Microorganismos del agua

### Objetivos:

- Determinar la potabilidad microbiológica del agua de consumo según los requisitos establecidos en el Código Alimentario Argentino.
- Reconocer la probable contaminación de diferentes fuentes de agua con patógenos, a través de la búsqueda de microorganismos indicadores y otros.

El agua es un sistema ecológico en equilibrio que constituye la base de todas las comunidades vivas. Como es indispensable se procura aumentar sus recursos, especialmente almacenándola, y mejorar su calidad mediante purificación. El análisis biológico del agua para determinar la calidad sanitaria utiliza métodos que indican el grado de contaminación con excrementos. Se emplean técnicas para la detección y recuento de organismos indicadores, porque principalmente interesa conocer el peligro potencial de la transmisión de patógenos a través del agua, antes que la búsqueda de éstos.

**Coliformes:** Los coliformes son bacterias de origen entérico que son capaces de fermentar la lactosa con producción de gas. Los géneros de enterobacterias incluidos en el grupo de los coliformes a efectos de análisis de aguas son *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. Este grupo es el principal indicador de la conveniencia del agua para uso doméstico, industrial u otro.

La prueba de fermentación en una serie de tubos (caldo bilis lactosa verde brillante, caldo MacConkey, etc.) con determinación del número más probable (NMP) fue la primera usada luego se incorporó la técnica de filtración por membrana que, con algunas limitaciones es comparable a la anterior y finalmente se introdujo el substrato cromogénico al medio líquido para NMP.

Comúnmente para determinar el NMP se realiza una prueba presuntiva basada en la fermentación de la lactosa con producción de gas que queda atrapado en la campanita. La ausencia de gas se interpreta como ausencia de coliformes, pero su presencia es una posibilidad de presunción, pero no de seguridad puesto que algunas bacterias lácticas suelen producir gas. El medio de cultivo líquido lleva un indicador de pH para facilitar la lectura y sales biliares para inhibir el desarrollo de las bacterias no entéricas. Los coliformes presentes en el intestino y las heces de animales de sangre caliente incluido el hombre, son capaces de producir gas al fermentar lactosa a 44,5°C.

Más específica es la búsqueda de *Escherichia coli* por cultivo sobre placas de medios que permiten la detección en 7 horas o en 24-48 horas (EMB, Endo y otros), o bien un medio líquido con el substrato fluorogénico MUG específico para bacterias 24 hs a 44,5°C. En los casos que se requiere confirmar la presencia de *E. coli* se emplean las pruebas de: fermentación de lactosa, sorbitol y celobiosa, hidrólisis de ONPG, producción de indol, viraje del rojo de metilo, producción de acetoina, uso del citrato, motilidad, descarboxilación de lisina y ornitina, oxidasa y formación de

pigmento amarillo; las que permiten clasificar las especies de enterobacterias presentes en aguas.

El significado de estos análisis se basa en que la falta de coliformes implica una ausencia de contaminación fecal próxima o remota, mientras que su presencia no certifica una contaminación de aguas con materias fecales. En cambio, la presencia de *Escherichia coli* demuestra una contaminación fecal reciente.

**Enterococos:** Constituyen un grupo de estreptococos fecales que incluye *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. gallinarum* y *S. avium*. Se diferencian de los otros estreptococos por su capacidad para crecer en presencia de 6,5% cloruro de sodio, a pH 9,6, entre 10 y 45°C. Son bacterias esféricas, grampositivas, fisiológicamente relacionadas con las bacterias lácticas que dan negativa la prueba de catalasa. Como tienen requerimientos nutricionales más complejos que otras bacterias difícilmente se multiplican en el agua, aunque resisten mejor la cloración que *Escherichia coli*. Los enterococos también son indicadores fecales, y para su análisis se emplean pruebas de cultivo en una serie de tubos de medio selectivo (caldo glucosa azida) para determinar el NMP y la filtración por membrana (agar mE, etc), siendo confirmado por repiques en agar bilis esculina u otro medio especial, además de la prueba de catalasa y la coloración de Gram.

Los enterococos son indicadores que permiten determinar el grado de la contaminación fecal. Una relación entre el número de coliformes fecales al número de enterococos, mayor que cuatro indica contaminación fecal humana, mientras que si es menor que uno sugiere otra fuente.

**Clostridios:** *Clostridium perfringens* tiene el mismo significado que los enterococos y una supervivencia mucho mayor que cualquier otro indicador bacteriano de polución fecal, debido a su capacidad formadora de endosporos. En aguas naturales superficiales, no contaminadas, no se suele detectar la presencia de estos microorganismos ni en grandes volúmenes de muestra, aunque se lo pueda observar en agua profundas.

La proporción de clostridios frente a otros indicadores fecales es muy reducida. La detección simultánea de *Cl. perfringens* y coliformes o *E. coli* constituye una clara evidencia del origen fecal de la contaminación. En cambio, la presencia exclusiva de los clostridios debe interpretarse como un indicio de contaminación fecal remota. La existencia de endosporos de clostridios en aguas tratadas carece de significado. El ensayo se funda en el sistema enzimático de la sulfito-reductasa que en el caso de *Cl. perfringens* es estrictamente endocelular y la reducción de sulfito a ácido sulfhídrico solo tiene lugar en contacto con la colonia y el ennegrecimiento en una zona muy próxima ella, si en el medio existen sales solubles de hierro. Otros esporulados también suelen reducir el sulfito.

**Pseudomonas spp.:** En las aguas se suele buscar *Pseudomonas aeruginosa*, un organismo asociado al tracto respiratorio superior o la piel, que se comporta como patógeno oportunista. Su presencia es poco favorable para la calidad del agua. Es un indicador primario de la eficiencia de la desinfección, mientras que los coliformes son indicadores de la contaminación de las superficies.

Se emplea tanto el método de siembra en una serie de tubos de medio líquido (caldo asparagina u otro) para determinar el NMP, como la técnica de filtración por membrana (agar M-PA). Para la confirmación se suele usar caldo acetamida, agar leche, agar King A y B, agar King A- cetrimida. El bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (Cetrimide) es un agente antibacteriano de amplio espectro que no afecta a la especie citada por lo que se adiciona en cantidades de 0,1 - 0,3 g/L de medio King A para el aislamiento.

Las colonias típicas de estos bacilos Gram negativos son de bordes generalmente irregulares que tiene tendencia a difundirse, las cepas no pigmentadas dan colonias translúcidas, las otras pueden estar teñidas de verde o parduzco. El pigmento colorea a la porción del medio que rodea a la colonia.

*Pseudomonas aeruginosa* forma piocianina que tiene un color azul-verdoso y difunde en el medio cuya producción se ve favorecida en un medio (King A) que contiene sulfato de potasio, cloruro de magnesio y glicerol y no incluye nitratos ni sales de sodio pues actúan como inhibidores. Este pigmento es soluble en agua y cloroformo. La solución azulada se colorea de rojo por el agregado de ácidos.

La producción de un compuesto fluorescente por especies de *Pseudomonas* se favorece en un medio que contiene fosfatos y sulfatos (King B). Es soluble en agua y ácido acético e insoluble en cloroformo. La solución acida es incolora y no fluorescente; la neutra ó alcalina es amarillenta a parda y fluorescente.

### **Otros microorganismos**

En las aguas industriales suele ser conveniente conocer la incidencia de bacterias del azufre y el hierro, debido a que intervienen en los procesos de corrosión. Los olores desagradables, como a moho, que ocasionalmente suelen presentarse en aguas potabilizadas pueden deberse a la presencia de geosmina y 2-metilisoborneol producidos por actinomicetos en aguas superficiales. Suele hacerse un recuento de estas bacterias ramificadas en agar almidón caseína con cicloheximida.

Los protozoos patógenos de importancia transmitidos por las aguas son quistes de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, así como ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. Este último puede encontrarse en aguas cloradas.

### **ACTIVIDADES DE LABORATORIO**

Se realizará una primera actividad referida a la determinación del origen de la contaminación de muestras de agua, el número más probable de coliformes, enterococos y la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. En una segunda actividad se realizará la observación y análisis de los resultados de:

- Número más probable de coliformes y enterococos
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Escherichia coli*

### **PROCEDIMIENTO**

#### **Número más probable de coliformes**

Sembrar tres tubos de caldo-lactosa doble concentración con 10mL de muestra, tres tubos de medio simple con 1mL y los tres restantes con 0,1mL cada uno. Incubar a

35°C durante 24-48hs. Para coliformes fecales usar el medio EC e incubar a 44,5°C. Se reparte en tubos con una campanita.

Observar los tubos que presentan gas en cada una de las series. Obtener el número característico donde la primera cifra corresponde a los tubos de positivos sembrados con 10mL de muestra, la segunda a los positivos que recibieron 1 mL y la tercera a los positivos con 0, 1mL de agua. Consultar la tabla para obtener el número más probable de coliformes o coliformes fecales en 100mL de la muestra.

### ***Escherichia coli***

Sembrar 1 asa de cada uno de los tubos positivos para coliformes fecales en sectores de las placas de agar Levine (EMB). Incubar a 35°C durante 48 horas. En este medio las colonias son negras con brillo metálico.

### **Número más probable de enterococos**

Sembrar cada uno de los tres tubos de caldo-azida doble concentración con 10mL de muestra. Agregar 1mL a cada uno de tres tubos de caldo-azida simple y 0,1mL a los tres restantes. Se incuban a 35°C y se observan a las 24 y 48 horas.

El medio doble concentración se prepara agregando la misma cantidad de sólidos a 500mL de agua. Se reparten a razón de 10mL en cada tubo.

Se consideran positivos los tubos que presentan turbiedad debido al crecimiento microbiano. Consultar la tabla para obtener el número más probable de enterococos en 100mL de muestra.

### **Clostridios sulfito-reductores**

Se prepara un medio con caldo nutritivo 1L, glucosa 20g, agar 30g y se reparte a razón de 20mL por tubo. Se esteriliza 30 minutos a 121°C. Aparte se prepara una solución de 1g sulfito de sodio y 4 gotas de alumbre férrico (al 5%) en 10 mL de agua destilada estéril.

Se calienta a ebullición 25mL de muestra. En el momento de usar se funden cinco tubos de medio en baño de agua hirviente, se agrega 1mL de la solución de sulfito y 5mL de la muestra tratada evitando la incorporación de aire. Enfriar bajo chorro de agua e incubar a 35°C durante 48 horas.

Contar las colonias negras en cada tubo sembrado con 5 mL de muestra sumar y calcular el número de organismos presentes en 100 mL de muestra.

### **Pseudomonas**

Sembrar 0,1mL de la muestra o diluciones de la misma (1/10 ó 1/100 en agua estéril) en placas de los medios King A y King B. Incubar el medio A durante 48 hs a 37°C y el medio B durante 24 hs a 37°C y luego 3-4 días a temperatura ambiente. El medio King A, que exalta la producción de pirocianina. El medio King B que favorece la producción de fluoresceína. Observar las colonias con pigmentos solubles y/o fluorescentes bajo luz visible y ultravioleta.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" 19° ed. , parte 9000: Microbiological Examination. APHA, Washington, 1995.
- Guinea J, Sancho J, Parés R. "Análisis Microbiológico de Aguas", Omega, Barcelona, 1979.