

Técnica de filtración ISO 9308 aplicada al monitoreo de agua de red

Mg. Silvia Moyano, Mg. Graciela Marín

Resumen

Se evaluó la reproducibilidad de la técnica de filtración (ISO 9308-1) para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli*, y su aplicación en muestras de agua de baja contaminación, como el agua de red domiciliaria. De este modo poder resolver inconvenientes en la interpretación de resultados originados debido a la presencia de otros tipos de bacterias que no pertenecen al grupo coliformes. Dichas bacterias desarrollan dando colonias anaranjadas-amarillas típicas de coliformes en el medio de Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) y pueden generar falsos positivos. Palabras clave: Norma ISO 9308, filtración por membrana, agua de red, colonias atípicas.

Abstract

This work was evaluated the reproducibility of filtration techniques (ISO 9308-1) for detection of total coliforms and *Escherichia coli*, and its application in water samples with low pollution, and the corresponding home network water. Thus to solve problems related to the interpretation of results caused due to the presence of other types of bacterial groups that do not belong to the coliform group. These groups develop resulting orange-yellow colonies typical of coliform agar medium TTC Lactose (Tergitol @ 7) and can generate false positives. *Keywords:* ISO 9308, membrane filtration, network water, atypical colonies.

Introducción

El monitoreo del agua potable provista a una población es indispensable para garantizar la calidad de vida debido que puede ser vehículo de importantes enfermedades infecciosas. La

Director Técnico Laboratorio, U.T.N. Facultad Regional Villa María, Av. Universidad 450, (5900) Villa María, Córdoba, 0353-4537500 Int. 201; Proyecto: "Calidad Del Agua Subterránea y Superficial y Gestión Del Recurso Hídrico en la Región Centro de la Provincia de Córdoba". Proyecto PID Código UTI 1782- Secretaría de Ciencia, Tecnología y Posgrado- Universidad Tecnológica Nacional. silmoyano@hotmail.com

importancia de métodos de detección confiables y con sensibilidad adecuada exige la aplicación de técnicas internacionales que presenten estas características. La prueba estándar para el grupo coliformes en muestras de agua puede realizarse mediante las técnicas de fermentación en tubos múltiples [1], o de filtro de membrana [2]. Son aplicables estos dos métodos teniendo en cuenta sus limitaciones específicas y el propósito del estudio. La técnica de filtro de membrana, que consiste en la siembra directa para la detección y cálculo de la densidad, es tan eficaz como la fermentación en tubos múltiples para la detección de bacterias de este grupo. La Norma ISO 9308 para la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua es la exigida por la comunidad económica europea para evaluar la calidad del agua. Esta norma se basa en el método de filtración por membrana (Norma española ISO 9308) [2].

La modificación de los detalles del procedimiento, ha hecho que los resultados por ambas técnicas sean comparables. Aunque existen limitaciones a la aplicación de la técnica del filtro de membrana, puede ciertamente ser equiparable a la anterior si se emplea teniendo



en cuenta de manera estricta sus inconvenientes y sus especificaciones técnicas.

Entre los detalles a verificar se encuentra el hecho que la Norma ISO 9308 establece que luego de la filtración de la muestra de agua, la membrana se coloca en placas con Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) donde todas las colonias amarillas desarrolladas, sin considerar el tamaño, que fueran oxidasa negativa, se pueden clasificar como perteneciente al grupo coliformes.

Con el fin de desarrollar dicha comparación, se realizó la evaluación de los detalles de aplicación de las técnicas de filtración en muestras de agua de baja contaminación provenientes de red de provisión urbana y otras fuentes con similares características [4] [5], para determinar los principales inconvenientes relacionados con la interpretación de resultados en cuanto a la presencia de otros tipos de grupos bacterianos no coliformes en muestras con bajo grado de contaminación que desarrollan dando colonias anaranjadas- amarillas típicas de coliformes en el medio de cultivo Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7), establecido en la Norma ISO 9308-1 para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua.

Metodología desarrollada y materiales utilizados

Con el propósito de evaluar muestras de baja contaminación de coliformes, se realizó el muestreo de agua de provisión de red urbana y de muestras de otros orígenes que presentaban antecedentes de esta situación. Se analizaron 109 muestras de agua con esta característica particular, en el Laboratorio de Química y Microbiología de la Universidad Tecnológica Nacional Regional Villa María.

Los análisis se realizaron utilizando las dos técnicas: la de filtración por membrana y el número más probable. En los métodos de filtración se utilizó la técnica establecida por la Norma ISO-9308-1:2000 (Coliformes totales y *E.coli*) [2] y para la del Número Más Probable las técnicas 9221-A y B (coliformes totales) del Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater (SMEWW), 21th (APHA, 2005) [1].

Se tuvieron en cuenta algunos detalles relacionados con el desarrollo de la Técnica de Filtración por Membrana en donde se filtran 100 ml de muestra utilizando monitores estériles descartables con la membrana filtrante. El filtro fue colocado en placa con Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) y luego incubado durante 48 (\pm) 2 horas a 36 (\pm) 1 °C.

Las colonias típicas de coliformes se presentan como amarillas- anaranjadas con o sin halo amarillo (CULTIMED) [6] (MERCK) [7]. A las colonias desarrolladas se le realizó el aislamiento en un medio no selectivo (Agar nutritivo) aplicando luego la prueba de la oxidasa (tabletas reactivas). Para la investigación de *Escherichia coli*, estas colonias fueron sembradas en Agua peptonada Indol, para observar la producción de Indol a 44,5 (\pm) 0,5°C.

Resultados y discusión

Se obtuvieron los resultados en estas muestras de baja concentración, por las dos técnicas mencionadas, sirviendo ambos grupos de datos para realizar comparaciones con el fin de asegurar los resultados, siendo la técnica del número más probable utilizada como técnica referencial, ya que es con la que se cuenta con mayor experiencia en su aplicación.

En la aplicación de la técnica de filtración por membrana, para la caracterización de las colonias típicas, se tuvieron en cuenta las características descritas en los manuales de los fabricantes de medios de cultivo tanto el de Merck y como el CULTIMED (MERCK, 1994; CULTIMED, 2003) (tabla 1 y 2). En dichos manuales, se especifica que al Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) puede agregarse el 2,3,5-Trifenil-2H-Tetrazolio Cloruro (TCC) dando colonias amarillas con halo (*E.coli*) o colonias rojas con halo amarillo (coliformes sin *E.coli*). Durante el desarrollo de evaluación de desempeño se observó que el agregado del TCC hace que las colonias de coliformes (sin *E.coli*) adquieran un color más anaranjado o amarillo oscuro pero no la coloración roja con halo amarillo, establecida en dicho manual (tabla 1).

Tabla N° 1: Características de las colonias desarrolladas en Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) según el Manual de Medios de

cultivo MERCK.

Colonias	Microorganismos
Sin TTC (2,3,5-Trifeni-2H-Tetrazolio Cloruro) Amarillo con halo amarillo Amarillo-verdosas, grandes mucosas. Azules	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter-Klebsiella</i> Gémenes lactosa negativos
Con TTC (2,3,5-Trifeni-2H-Tetrazolio Cloruro) Amarillo con halo amarillo Rojas con halo amarillo. Rojas con halo azulado Incoloras.	<i>Escherichia coli</i> Coliformes sin <i>E. coli</i> . Gémenes lactosa negativos. Monilia y otros.

Tabla N° 2: Características de las colonias desarrolladas en Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) según el Manual de Medios de cultivo CULTIMED.

Microorganismos	Temperatura Incubación		Color de la colonia	Halo
	35°C	44°C		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Satisfactorio	Bueno	Amarillo con centro naranja	Amarillo
<i>Citrobacter sp</i>	Satisfactorio	Inhibido	Amarillo con centro naranja	Azulado
<i>Klebsiella sp</i>	Satisfactorio	Inhibido	Rojo a amarillo	Amarillo
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Satisfactorio	Inhibido	Rojo a amarillo oscuro con centro naranja	Amarillo
Especies no fermentadoras	Satisfactorio	Inhibido	Violeta claro	Azulado

En la Norma ISO 9308 se establece que se debe examinar la membrana y contar las colonias, sin tomar en consideración el tamaño, que presentan un desarrollo del color del medio bajo la membrana (Norma española ISO 9308, 2000). Esto último (el viraje del medio bajo la membrana) no pudo ser considerado, debido a la utilización de monitores estériles donde se coloca el medio de cultivo después del filtrado de la muestra. Por eso se interpretó como colonias típicas todas las colonias amarillas-anaranjadas desarrolladas en Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7).

Para ser confirmadas como coliformes se siguieron las etapas propuestas por la Norma ISO 9308, de sembrar las colonias típicas en Agar Nutritivo y realizar la prueba de la oxidasa (Norma española ISO 9308, 2000). Además estas colonias desarrolladas en Agar nutritivo se sembraron en Caldo Lauril Sulfato, que es el medio de cultivo establecido por el Standard Methods for the examination of water and wastewater (APHA, 2005) para la determinación de bacterias coliformes en muestras de agua por el número más probable. Se consideró como perteneciente al grupo coliforme a toda bacteria capaz de producir turbidez y gas en Caldo Lauril sulfato.

Las 109 muestras de agua analizadas por el método de fermentación por tubos múltiples dieron resultados negativos para la determinación de coliformes totales. Por el

método de filtración por membrana, al cabo de 48 horas de incubación a 36 (±) 1°C, el 36,69 % (40 muestras de las 109 analizadas) presentaron colonias anaranjadas - amarillas típicas para ser confirmadas como coliformes (tablas 3 y 4). Debido al crecimiento de colonias amarillas desarrolladas en el Agar Tergitol que no resultaron ser coliformes cuando se sembraron en Caldo Lauril sulfato simple concentración se decidió realizar la observación microscópica de dichas colonias, observándose sólo las aisladas de 27 muestras (tabla 3).

Tabla N°3: Resultados obtenidos por el método de filtración por membrana para coliformes totales (Norma ISO 9308-1-2000).

N° de muestras analizadas	colonias amarillas o anaranjadas % de muestras		N° de muestras con colonias típicas
	No presentan	Si presentan	
109	63,30% (69 muestras)	36,69% (40 muestras)	27

Las colonias amarillas- anaranjadas con o sin halo típicas, se sembraron en Agar Nutritivo y luego Caldo Lauril Sulfato simple concentración para confirmar la pertenencia del grupo coliforme. De las 40 muestras con colonias típicas aisladas, 39 muestras no desarrollaron en Caldo Lauril Sulfato luego de 48 horas de incubación a 36 (+) 1°C, lo que descartó que sean bacterias coliformes. En la figura 1 se observan colonias amarillas – anaranjadas desarrolladas no coliformes en Agar de Lactosa TTC con Tergitol@7 de una muestra de agua de la red domiciliaria.

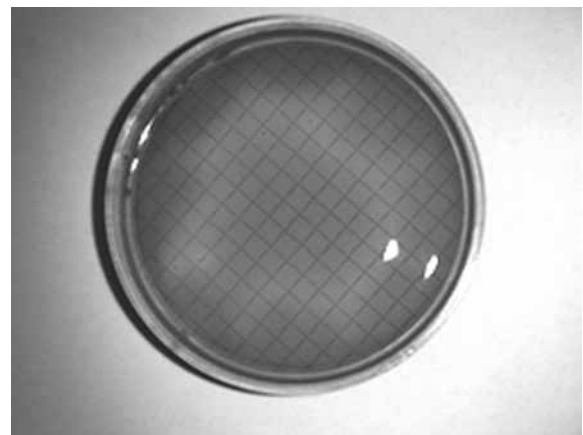


Fig. N°1: Colonias amarillas “no coliformes” en Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) confirmadas por el no crecimiento en Caldo Lauril sulfato.

Sólo en una muestra se desarrollaron

dos colonias amarillas (tabla 4) que fueron confirmadas como coliformes. Esta confirmación se basó en que resultaron ser oxidasa negativa y desarrollaron turbidez y producción de gas en tubos de Lauril Sulfato simple concentración. Esta muestra por la técnica del NMP (Collins C.H. y Taylor C, 1969) (tabla de 5-1-1) presentó resultado negativo con respecto a coliformes totales, lo que demostraría la mayor sensibilidad de la técnica de filtración por membrana en relación al método de fermentación por tubos múltiples. Por lo tanto la muestra sería apta para consumo analizada por la técnica de tubos múltiples y no apta con el método de filtración por membrana (Dipas, 1995; Norma española ISO 9308, 2000).

Tabla N° 4: Resultados obtenidos por el método de filtración (Norma ISO 9308-1-2000) y el Número más Probable en muestras de agua.

N° de muestras analizadas	% de muestras negativas por el método de filtración por membrana (0 ufc/100 ml)	% de muestras negativas por el número más probable (<2 NMP/100 ml)
109	99,8 % (108 muestras)	100 % (109 muestras)

En cuanto a la caracterización microscópica de las colonias amarillas-anaranjadas que crecieron en Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7), como puede observarse en las tablas 5 y 6 que se exponen en las páginas siguientes, el 41 % correspondieron cocos Gram (+) y el 41% de bacilos Gram (+) esporulados chicos.

Es importante resaltar que en dos muestras hubo desarrollo de dos colonias anaranjadas con el viraje total del color del Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) en el monitor por filtración de color verde a amarillo y que en la observación microscópica correspondieron a bacilos Gram (+) esporulados chicos (tabla 5.)

Tabla N° 5: Observación microscópica de colonias amarillas- anaranjadas.

N° de muestra	N° de colonias típicas	N° de colonias observadas	Características microscópicas de las colonias observadas.
1	70	13	6 bacilos Gram (+) esporulados chicos. 7 cocos Gram (+)
2	20	5	2 cocos Gram (+) 3 bacilos Gram (-)
3	14	4	4 cocos Gram (+)
4	81	8	2 cocos Gram (+) 5 bacilos Gram (+) esporulados grandes 1 bacilo Gram (+) esporulado chico
5	2	2	2 bacilos Gram (+) esporulados chicos 3 bacilos Gram (+) esporulados chicos (colonias blancas en AN)
6	5	5	2 cocos Gram (+) (colonias blancas en AN)
7	1	1	1 bacilo Gram (+) esporulado chico. Colonia amarilla y el medio todo amarillito.
8	2	2	2 Cocos Gram (+).
9	27	6	4 bacilos Gram (+) esporulados chicos 2 bacilos Gram (+) delgados
10	1	1	1 bacilo Gram (+) esporulado chico. Colonia amarilla y medio todo amarillito
11	1	1	1 bacilo Gram (-) corto

12	4	4	1 bacilo Gram (-) corto 1 coco Gram (+) 2 bacilos Gram (+) esporulados chicos
13	6	6	3 cocos Gram (+) 2 bacilos Gram (+) esporulados chicos 1 bacilos Gram (+) esporulado grande
14	2	2	2 bacilos Gram (+) esporulados chicos
15	2	2	2 cocos Gram (+)
16	1	1	1 coco Gram (+)
17	2	2	2 cocos Gram (+)
18	1	1	1 bacilo Gram (+) esporulado chico.
19	1	1	1 bacilo Gram (+) esporulado chico.
20	1	1	1 coco Gram (+)
21	2	2	2 bacilos Gram (+) esporulados chicos.
22	1	1	1 bacilo Gram (+) esporulado chico.
23	2	2	1 coco Gram (+) 1 bacilo Gram (+) pleomórficos
24	1	1	1 coco Gram (+)
25	1	1	1 coco Gram (+)
26	2	2	2 bacilos Gram (+) esporulados chicos
27	1	1	1 bacilo Gram (+) esporulado chico.

Tabla N° 6: Porcentaje de las distintas morfologías presentadas por las colonias amarillas desarrolladas en el Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7).

N° de colonias	% de cocos Gram (+)	% de bacilos Gram (+)		Otras morfologías
		esporulados chicos	esporulados grandes	
78	41 % (32)	41 % (32)	7,69 % (6)	10,26 % (8)

Ante estos resultados obtenidos se procedió a la siembra por aislamiento de cepas tipificadas de *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956, *S.bovis* ATCC 9809, *S. dysgalactiae* ATCC 27957 y *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, donde desarrollaron colonias amarillentas pequeñas.

El Manual de Merck de medios de cultivo (MERCK, 1994) para el Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7), en el control de calidad de este medio expresa que cuando se realiza la prueba con *Enterococcus faecalis* ATCC 11700, el desarrollo de esta bacteria es nulo/ligero con un viraje amarillento del medio. Esto indicaría que en muestras de agua con bajo grado de contaminación pueden desarrollar en Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) otros grupos bacterianos, además de los coliformes. Este inconveniente de la técnica de filtración por membrana podría ser evitado sembrando las colonias amarillas- anaranjadas desarrolladas en Agar Tergitol en un medio no selectivo como Agar nutritivo (tal como lo detalla la Norma ISO 9308), y luego sembrar estas colonias desarrolladas en Caldo Lauril simple concentración. La ausencia de turbidez y de gas en este caldo permite descartar que la bacteria aislada sea del grupo de los coliformes.

En relación las morfologías microscópicas observadas de las colonias amarillas-anaranjadas típicas crecidas en Agar de Lactosa TTC con Tergitol@7 se detallan en la tabla 7. Se puede

observar que la morfología más predominante, tanto en el agua de los pozos de provisión como de la red domiciliaria correspondió bacilo Gram (+) esporulados chicos. La otra morfología más frecuente fue de cocos Gram (+) (31,6% de las colonias amarillas observadas en las muestras de agua extraída de la red) (tabla 7).

Tabla N° 7: Porcentaje de las distintas morfologías presentadas por las colonias amarillas desarrolladas en el Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7)

N° de colonias observadas	% de cocos Gram (+)	% de bacilos Gram (+)		Otras morfologías
		esporulados chicos	esporulados grandes	
AGUA DE POZO DE PROVISIÓN DE VILLA MARIA				
7	14,3 % (1)	71,4 % (5)	0 % (0)	14,3 % (1)
AGUA DE RED DE VILLA MARIA				
76	31,6% (24)	51,3 % (39)	7,9% (6)	9,2% (7)

Conclusiones

Las conclusiones del estudio en la evaluación de la técnica de filtración por membrana ISO 9308 para la determinación de Coliformes totales y *Escherichia coli* fueron:

- Para la determinación de Coliformes totales y *E.coli*, el método de filtración resulta ser reproducible, con relación a las técnicas de fermentación por tubos múltiples, dando resultados comparables. De las 109 muestras de agua potable analizadas los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron idénticos en el 99,10%.

- De las 40 muestras de agua que presentaron crecimiento de colonias amarillas- anaranjadas en Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) cuando se sembraron en Caldo Lauril sulfato simple concentración, 39 muestras no mostraron turbidez ni producción de gas, confirmando el resultado negativo para coliformes totales. La muestra restante dio resultado positivo por el método de filtración por membrana (2 ufc/100 ml) y negativo con la técnica de fermentación por tubos múltiples (< 2 NMP/100 ml). Esto puede indicar una sensibilidad superior de la técnica de filtración con respecto al método del número más probable en niveles bajos de contaminación.

- En la observación microscópica de las colonias amarillas desarrolladas en el Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7). de muestras de agua potable el 41% correspondieron a cocos Gram (+) y 41 % a bacilos Gram (+) esporulado.

- En el Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7) crecieron colonias amarillas de las cepas tipificadas del género *Streptococcus*, lo que confirma la presencia de colonias amarillas en las muestras de agua cuya identificación microscópica perteneció al grupo de cocos Gram (+).

- Luego de la observación microscópica de las colonias amarillas- anaranjadas desarrolladas en Agar de Lactosa TTC con Tergitol@7, la morfología predominante correspondió bacilo Gram (+) esporulados chicos. La otra morfología bacteriana presente, fue la de cocos Gram (+).

- El inconveniente de la técnica de filtración por membrana debido al desarrollo de colonias amarillas-anaranjadas que no son coliformes en Agar de Lactosa TTC con (Tergitol@7), se puede evitar sembrando estas colonias crecidas en un medio no selectivo (Agar nutritivo), en Caldo Lauril simple concentración. La ausencia de turbidez y de gas en este caldo permite descartar que la bacteria aislada sea del grupo de los coliformes. Esta modificación de la técnica permite confirmar el resultado obtenido.

Referencias

- [1] APHA, AWWA, WEF *Standard Methods for the examination of water and wastewater* Ed. 21th, 2005.
- [2] Norma Española UNE-EN ISO 9308-1. *Detección y recuento de Escherichia coli y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración de membrana (ISO 9308-1:2000)*. 2000.
- [3] Moyano Silvia, Pegoraro Lidia, Marín Graciela. *Comparación de técnicas del número más probable y filtración de membrana para el análisis microbiológico de agua*. III Reunión Anual PROIMCA y I Reunión Anual PRODECA. Mendoza. Argentina.2011.
- [4] Moyano Silvia; Marín Graciela; Pegoraro Lidia. *Aplicación de la técnica microbiológica de filtración (ISO 9308-1) en la detección de coliformes totales en muestras de agua con baja contaminación*. Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento del Agua- Córdoba, Argentina.2012.
- [5] CULTIMED. *Manual Básico de Microbiología*. España. 2003.

[6] MERCK. *Manual de medios de cultivo*.
Alemania. 1994.

