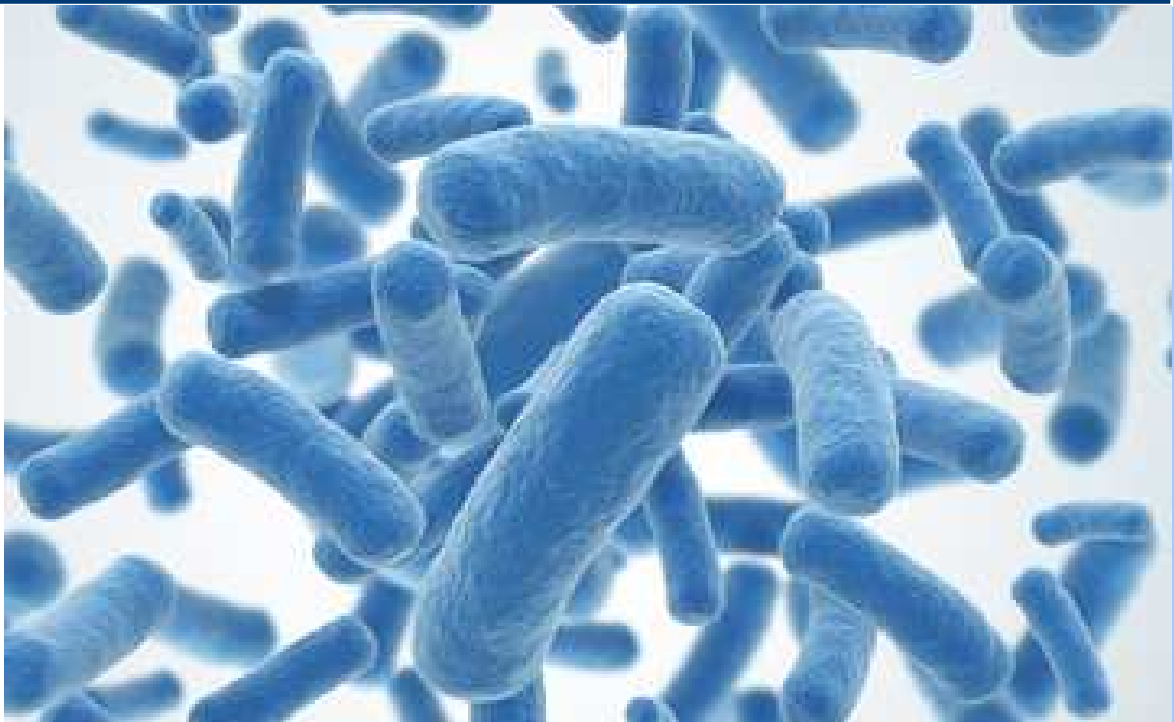


2023

Métodos microbiológicos alternativos en agua de consumo





MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS SEGÚN LO DISPUESTO EN EL ANEXO III, DEL REAL DECRETO 3/2023 DE 10 DE ENERO.

Febrero 2023



El Ministerio de Sanidad no es responsable del uso que pueda hacerse del contenido de esta publicación, o por cualquier error que, a pesar de una cuidadosa preparación y verificación, pueda aparecer.

@ MINISTERIO DE SANIDAD
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones
Paseo del Prado, 18, 28014 Madrid
Nipo CD Rom:
Nipo en línea:

El Copyright y otros derechos de la propiedad intelectual de este documento pertenecen al Ministerio de Sanidad. Se autoriza a las organizaciones de atención sanitaria a reproducirlo total o parcialmente para su uso no comercial, siempre que se cite el nombre completo del documento, año e institución.

Catálogo general de publicaciones oficiales

<http://www.O6O.es>

2023



INDICE

1. Introducción	4
2. <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	5
3. <i>Clostridium perfringens</i> incluidas las esporas	8
4. <i>Enterococo intestinal</i>	11
5. <i>Laboratorios participantes en los ejercicios de equivalencia</i>	13

Agradecimientos

Queremos dar las gracias a todos aquellos laboratorios que participaron en los diferentes estudios de equivalencia de métodos microbiológicos en agua de consumo.



1. Introducción

El **Real Decreto 3/2023**, de 10 de enero, *por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro*, publicado en el BOE del día 11 de enero de 2023, es la transposición al derecho interno español de la **Directiva (UE) 2020/2184** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2020, *relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano*.

Tanto en el real decreto como en la directiva se señalan concretamente los métodos de análisis de los parámetros microbiológicos: *Escherichia coli*, *Enterococo intestinal*, *Clostridium perfringens*, *Legionella spp*, Bacterias coliformes, Colifagos somáticos, Recuento de colonias a 22°C.

En dichas normativas determinan que ***“se podrán utilizar aquellos métodos que hayan sido evaluados mediante un ejercicio de equivalencia de métodos y aprobados y publicados por el Ministerio de Sanidad”***. La evaluación se deberá hacer basándose en la norma **UNE-EN ISO 17994**. *Calidad del agua. Requisitos para la comparación de la tasa de recuperación relativa de microorganismos por dos métodos cuantitativos o la norma UNE-EN ISO 16140*. *Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos*.

En 2006 se efectuaron dos ejercicios de equivalencia para le ***Escherichia coli* y Bacterias coliformes**, dando como resultados dos nuevos métodos oficiales. Estos ejercicios se han repetido en 2022 para el ***Clostridium perfringens*** y el ***Enterococo intestinal***.

Las cuatro evaluaciones se rigieron por la norma **UNE-EN ISO 17994**.

En esta publicación se presentan los cuatro métodos oficiales para los microorganismos citados.



2. *Escherichia coli* y Bacterias coliformes

MÉTODO DE DETECCIÓN Y RECUENTO EN AGUAS DE CONSUMO POR FILTRACIÓN DE MEMBRANA UTILIZANDO AGAR CROMOGENICO PARA COLIFORMES (ACC).

Procedimiento:

- 1º. Filtrar la muestra a través de una membrana de ésteres de celulosa o equivalente, testadas con arreglo a la norma ISO 7704:1985, de 0,45 µm de diámetro de poro, que retenga los microorganismos. Colocar la membrana sobre una placa conteniendo el ACC.
- 2º. Incubar la placa durante 21 ± 3 horas a 36 ± 2 °C. Si a las 18 horas aparecen colonias rojas o incoloras, prolongar la incubación hasta las 24 horas para incluir posibles reacciones tardías de beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.
- 3º. Contar las colonias -galactosidasa positivas y -glucuronidasa negativas (color rosa asalmonado a rojo) como bacterias coliformes distintas a *Escherichia coli*. Contar las colonias -galactosidasa positivas y -glucuronidasa positivas (color azul oscuro a violeta) como *Escherichia coli*. El recuento de bacterias coliformes totales corresponderá a la suma de las colonias de color rosa asalmonado a rojo y las colonias de color azul oscuro a violeta.

Cálculo de resultados

A partir del volumen de agua filtrado y del número de colonias características contadas sobre la membrana, calcular la concentración de bacterias coliformes y de *Escherichia coli* en 100 ml de muestra.

Expresión de resultados

Los resultados se expresarán como UFC/100 ml.

Composición del método de cultivo

- ✓ Medio base (1 litro):
- ✓ Peptona: 3,0 g.
- ✓ Cloruro sódico: (NaCl): 5,0 g.
- ✓ Dihidrogenofosfato sódico (NaH₂PO₄): 2,2 g.
- ✓ Hidrogenofosfato disódico (Na₂HPO₄): 2,7 g.



- ✓ Triptófano: 1,0 g.
- ✓ Piruvato sódico: 1,0 g.
- ✓ Tergitol® 7: 0,15 g.
- ✓ Sorbita: 1,0 g.
- ✓ Mezcla cromógena: Salmon-GAL (0,2 g) y X-Glucuronido (0,2 g).
- ✓ Agar: 10 g.
- ✓ Agua destilada: 1.000 ml.

Suspender los ingredientes en agua calentando al baño maría o en vapor fluente con agitación frecuente hasta completa disolución. El pH final debe ser de $6,8 \pm 0,2$ a 25 °C. No autoclavar ni sobrecalentar.

Solución de vancomicina (5 ml):

- ✓ Vancomicina HCl: 5 mg.
- ✓ Agua destilada: 5 ml.

Disolver la vancomicina en agua y esterilizar por filtración de membrana de 0,2 μm de diámetro de poro.

Solución de cefsulodina (5 ml):

- ✓ Sal sódica de cefsulodina: 5 mg.
- ✓ Agua destilada: 5 ml.

Disolver la sal sódica de cefsulodina en agua y esterilizar por filtración de membrana de 0,2 μm de diámetro de poro.

Para el estudio de equivalencia se reemplazó ambas soluciones (solución vancomicina y solución cefsulodina) por el suplemento comercial.

Medio completo:

- ✓ Medio base: 1000 ml.
- ✓ Solución de vancomicina: 5 ml.
- ✓ Solución de cefsulodina: 5 ml.

Fundir el medio base y atemperar hasta 45-50 °C. Añadir de modo aséptico las soluciones de vancomicina y de cefsulodina. Homogeneizar evitando la formación de burbujas.

Repartir en placas de Petri. Almacenar a 5 ± 3 °C en la oscuridad hasta un plazo máximo de un mes.

En el estudio de equivalencia se empleó el medio Chromocult Coliform Agar, fabricado por la casa comercial Merck.



MÉTODO DE DETECCIÓN Y RECuento EN AGUAS DE CONSUMO POR EL NMP (NÚMERO MÁS PROBABLE) EN MEDIO LÍQUIDO UTILIZANDO LA TECNOLOGÍA DEL SUSTRATO DEFINIDO® (DST)

Materiales específicos del método:

- ✓ Frascos estériles con enrase a 100 ml.
- ✓ Bandeja multipocillos: Para recuentos hasta 200,5/100 ml.
- ✓ Dosis de sustrato definido: Reactivo dosificado para un ensayo.
- ✓ Selladora.
- ✓ Lámpara de luz UV de 365 nm.
- ✓ Tablas del NMP para bandeja de 51 pocillos.

Procedimiento:

- 1º. Introducir 100 ml de muestra en un envase estéril de 100 ml de capacidad. Añadir una dosis de sustrato definido y agitar hasta completa disolución. Introducir en una bandeja. Colocar la bandeja en una selladora para repartir la muestra entre los distintos pocillos, que quedarán aislados entre sí.
- 2º. Incubar la bandeja entre 18 y 22 horas a 36 ± 2 °C.
- 3º. Contar los pocillos de color amarillo como positivos para bacterias coliformes. Utilizando una lámpara de luz UV de 365 nm, marcar los pocillos que presenten fluorescencia azulada. Contar como positivos para *Escherichia coli* los pocillos a la vez amarillos y fluorescentes.

Cálculo de resultados:

- ✓ A partir del número de pocillos amarillos contados en la bandeja, buscar en la tabla del NMP correspondiente el de bacterias coliformes en 100 ml de muestra.
- ✓ A partir del número de pocillos a la vez amarillos y fluorescentes contados en la bandeja, buscar en la tabla del NMP el de *Escherichia coli* en 100 ml de muestra.

Expresión de resultados:

Los resultados se expresarán como NMP/100 ml.

En caso de obtenerse Ausencia, este resultado equivale a 0 UFC/100 ml.

En el estudio de equivalencia se empleó la bandeja Quanti-Tray® de 51 pocillos y el sustrato definido Colilert 18®.



3. *Clostridium perfringens* incluidas las esporas

MÉTODO ALTERNATIVO UTILIZANDO COMO MEDIO DE CULTIVO EL TSC-MUP

Determinación del número de *Clostridium perfringens* mediante filtración de volúmenes determinados de agua por filtros de membrana e incubación sobre medio selectivo bajo condiciones adecuadas. Recuento del número de colonias negras, con punto negro o amarillas-marrón que presentan halo fluorescente en el medio al exponer la placa a luz U.V. (365 nm).

El agar base TSC proporciona unas condiciones óptimas para el desarrollo de Clostridios. Las colonias que producen sulfuro de hidrógeno se pueden caracterizar por el color negro o grisáceo que se produce debido a la reacción del sulfito con las sales de hierro.

El suplemento selectivo para *Clostridium perfringens*, que se añade al agar base de TSC, contiene D-cicloserina. Esta inhibe a la flora bacteriana acompañante, hace que las colonias que crezcan tengan un tamaño menor y reduce un halo negro difuso que aparece rodeando a las colonias de *Clostridium perfringens*. El 4-Methylumbelliferyl-phosphate (MUP), es un sustrato fluorogénico para la fosfatasa ácida y alcalina. La fosfatasa ácida, que es un indicador muy específico de *Clostridium perfringens*, escinde el sustrato fluorogénico (MUP) formando 4-Metilumbelíferona, que puede identificarse gracias a que es fluorescente bajo luz U.V. a 365 nm.

La incubación anaerobia, la temperatura de 44°C y la presencia de D-cicloserina inhiben el crecimiento de flora acompañante como organismos aerobios, bacterias gram-negativas y estafilococos.

Medios de cultivo, material y aparatos:

- ✓ Medio TSC-MUP.
- ✓ Reactivo para ambiente anaerobio para utilización en jarra de anaerobiosis.
- ✓ Equipo de filtración.
- ✓ Mechero Bunsen.
- ✓ Embudos de filtración estériles para filtro de 47 mm de diámetro.
- ✓ Membranas filtrantes estériles de 47 mm de diámetro y 0,45 micras de poro.
- ✓ Pinzas de punta plana esterilizables a la llama.
- ✓ Estufa de incubación regulada a 44±1°C.
- ✓ Lámpara de luz U.V. (365 nm).
- ✓ Jarra para incubación Anaerobia.



- ✓ Indicador de Anaerobiosis.

Procedimiento:

- ✓ Colocar las membranas filtrantes sobre la base de filtración y colocar los embudos estériles de filtración.
- ✓ Agitar el frasco de muestra.
- ✓ Llenar el embudo con el volumen de muestra seleccionado.
- ✓ Aplicar vacío hasta completar la filtración.
- ✓ Mediante las pinzas previamente flameadas transferir la membrana sobre el medio de cultivo contenido en una placa Petri, de modo que la superficie de filtración quede hacia arriba y procurando que ninguna burbuja de aire se interponga entre la membrana y el medio.
- ✓ Cerrar e invertir las placas, introduciéndolas en esta posición en la jarra de anaerobiosis.
- ✓ Introducir un sobre de reactivo para ambiente anaerobio previamente humedecido en la jarra, así como el indicador de anaerobiosis.
- ✓ Cerrar la jarra e incubar a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 21 ± 3 horas.

Es importante que el tiempo entre la filtración y la incubación en anaerobiosis no supere los 30 minutos.

Recuento y cálculo de resultados:

- ✓ Comprobar que el indicador de anaerobiosis ha virado al color especificado por el fabricante.
- ✓ Proceder al recuento de colonias crecidas en medio TSC-MUP, considerando como presuntos *C. perfringens* las de color negro o gris.
- ✓ Se consideran *C. perfringens* aquellas colonias presuntivas, que además presentan halo fluorescente en el medio al exponerlas en la lámpara de luz U.V a 365nm.
- ✓ A partir del volumen filtrado y del número de colonias características contadas en la placa, calcular el recuento final en 100 ml de muestra.

Expresión de resultados:

Los resultados se expresarán como UFC/100 ml.

Composición del medio de cultivo:

- D-cicloserina: 0,4 g/l
- 4-metilumbeliferilo, sal disódica (MUP): 0,1 g/l



- ✓ Fundir en el autoclave, microondas o al baño maría el número necesario de frascos de 500 ml y mantener la ebullición durante 15 minutos para regenerar el medio. Dejar atemperar a 45 ± 1 °C y añadir el aditivo previamente disuelto en 3 mL de agua estéril (200 mg de Cicloserina y 50 mg de MUP) que está en la nevera.
- ✓ Conectar durante 30 minutos la campana de flujo laminar y la lámpara UV.
- ✓ Apagar la lámpara y manteniendo el flujo laminar disponer en placas Petri de 55 mm, en grosor de 3 a 5 mm.
El pH final a 25°C debe de ser de $7,6 \pm 0,2$, y el aspecto sólido color crema traslúcido.
- ✓ Los aditivos deben prepararse el mismo día de uso.
- ✓ Las placas preparadas pueden conservarse en nevera a 5 ± 3 °C durante 2 días y en condiciones de anaerobiosis durante un periodo máximo de 7 días.

El medio de cultivo TSC-MUP Agar empleado en el ejercicio de equivalencia fue la referencia VWR 171142 AF.



4. *Enterococo intestinal*

MÉTODO ALTERNATIVO MEDIANTE EL MÉTODO DE ENTEROLERT – DW QUANTI - TRAY

El método Enterolert-DW/Quanti-Tray está basado en la tecnología patentada de sustrato definido de IDEXX (Defined Substrate Technology, DST), y detecta la presencia de enterococos en muestras de agua de consumo. A medida que los enterococos crecen en el medio líquido, las enzimas de los organismos metabolizan un sustrato específico (orto-nitrofenil- β -D-glucosido) para β -glucosidasa, a la vez que inhibe el crecimiento de otras bacterias.

El medio se añade a un volumen conocido de muestra (100 ml), se mezcla para hasta disolución y se vierte en una bandeja de reacción con múltiples pocillos. Esta se sella, se incuba a $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-28 horas tras las cuales se examina para detectar los pocillos con la coloración característica. Cuando hay enterococos en una muestra de agua de consumo, el color azul del medio se vuelve verde. El número de pocillos positivos corresponde al Número Más Probable (NMP) de enterococos en la muestra original.

Cualquier cambio del color azul original a verde se considera resultado positivo. No se precisa una luz ultravioleta.

Medios de cultivo, material y aparatos:

- ✓ Medio Enterolert-DW (dosis de sustrato definido, reactivo dosificado para ensayo).
- ✓ Frascos de cultivo de 120 ml, con enrase a 100 ml estériles (no deben presentar fluorescencia a la luz UV de 365 nm y con un cierre hermético).
- ✓ Bandejas Quanti-Tray estériles de 51 pocillos.
- ✓ Mechero tipo Bunsen.
- ✓ Campana de flujo laminar.
- ✓ Selladora para bandejas Q-Tray.
- ✓ Estufa de cultivo regulada a $41 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ✓ Autoclave.
- ✓ Tablas NMP para bandeja de 51 pocillos.

Procedimiento:

- ✓ Agitar vigorosamente el frasco con la muestra para homogeneizarla.



- ✓ Destapar el frasco de cultivo teniendo la precaución de que la tapa del mismo quede encima de la mesa en posición boca arriba, y añadir el agua de la muestra hasta el enrase del frasco de cultivo (100 ml).
- ✓ Separar una dosis de sustrato definido (reactivo Enterolert-DW) y golpearla ligeramente para asegurarse de que todo el polvo queda en el fondo de la misma.
- ✓ Doblar la parte superior por donde indica la muesca con la precaución de no tocar con los dedos la zona de apertura.
- ✓ Agregar la dosis a los 100 ml de agua, tapar el frasco y agitar hasta la completa disolución del reactivo.
- ✓ Introducir la mezcla homogeneizada en una bandeja Quanti-Tray (51 pocillos).
- ✓ Sellar la bandeja según las instrucciones de la selladora.
- ✓ Incubar la bandeja a $41 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24-28 horas (los resultados son válidos de 24 a 28 horas después).

Recuento y cálculo de resultados:

- ✓ Contar como positivos para Enterococos aquellos pocillos que presentan un cambio de coloración de azul a verde por pequeño que sea el cambio. (en el recuento se incluye el pocillo superior, de mayor tamaño).
- ✓ A partir del número de pocillos positivos contados en la bandeja, buscar en la tabla de NMP correspondiente el de enterococos en 100 ml de muestra.
- ✓ Los resultados se expresan como NMP/100 ml.
- ✓ En caso de obtenerse Ausencia (número de pocillos positivos = 0) el resultado equivale a 0 UFC/100 ml.

En el estudio de equivalencia se empleó la bandeja Quanti-Tray[®] de 51 pocillos y el sustrato definido Enterolert-DW.



5. Laboratorios participantes en los ejercicios de equivalencia

A. En 2006 se realizó un ejercicio de equivalencia para comparar el método de referencia **UNE EN ISO 9308-1** para **Escherichia coli** y **Bacterias coliformes** con el método de detección y recuento en aguas de consumo por filtración.

Los laboratorios participantes fueron:

1. Aguas de Valencia – GAMASER
2. Aguas de Valladolid
3. Aigües de Barcelona
4. Aigües de Terrassa
5. Aigües Ter Llobregat
6. Aqualia – Avila
7. Aqualia – Denia
8. Aqualia – Jerez
9. Aqualia - Oviedo
10. Ayuntamiento de Madrid
11. Canal de Isabel II – Madrid
12. CEDIA SL – Sant Celoni
13. EMASESA Sevilla
14. Gobierno de Canarias
15. Universidad de Santiago. Ins. Inv. Ana. Alimentario
16. Ayuntamiento de Barcelona. Ins. Municipal de Salud Pública
17. IPROMA – Castellón
18. LABAQUA – Alicante
19. LABAQUA – Santiago
20. Lab. de Salud Pública de Guipúzcoa
21. Lab. de Salud Pública de Zaragoza
22. Servicios de la Comarca de Pamplona
23. Universidad de Lleida

B. En 2006 se realizó un ejercicio de equivalencia para comparar el método de referencia **UNE EN ISO 9308-2** para **Escherichia coli** y **Bacterias coliformes** con el método de detección y recuento en aguas de consumo por el NMP (número más probable) en medio líquido utilizando la tecnología del sustrato definido® (DST).

Los laboratorios participantes fueron:

1. Aguas de Valencia – GAMASER
2. Aguas de Valladolid



3. Aigües de Barcelona
4. Aigües de Terrassa
5. Aigües Ter Llobregat
6. Aqualia – Avila
7. Aqualia – Denia
8. Aqualia – Jerez
9. Aqualia - Oviedo
10. Ayuntamiento de Madrid
11. Canal de Isabel II – Madrid
12. CEDIA SL – Sant Celoni
13. EMASESA Sevilla
14. Gobierno de Canarias
15. Universidad de Santiago. Ins. Inv. Ana. Alimentario
16. Ayuntamiento de Barcelona. Ins. Municipal de Salud Pública
17. IPROMA – Castellón
18. LABAQUA – Alicante
19. LABAQUA – Santiago
20. Lab. de Salud Pública de Guipúzcoa
21. Lab. de Salud Pública de Zaragoza
22. Servicios de la Comarca de Pamplona
23. Universidad de Lleida

C. En 2022 se realizó un ejercicio de equivalencia para comparar el método de referencia **UNE EN ISO 14189 para *Clostridium perfringens*** incluidas las esporas con el método de método absoluto de confirmación de colonias mediante observación de fluorescencia, el medio de cultivo empleado es el TSC-MUP.

Los laboratorios participantes fueron:

1. Aguas del Añarbe-Añarbeko Urak S.A.
2. Aigües de Barcelona, empresa metropolitana de gestión del ciclo integral del agua S.A.
3. Canal de Isabel II, S.A.
4. Consorci d'Aigües de Tarragona
5. EMASA: Empresa Municipal de Aguas de Málaga
6. EMASESA - Laboratorio Control de Calidad Dpto - ETAP Carambolo
7. HIDROTEC (FCC-Aqualia). Laboratorio de Jerez de la Frontera
8. HIDROTEC (FCC-Aqualia). Laboratorio de Lleida
9. Interlab Laboratorios SLU – Madrid
10. Interlab Murcia (
11. IPROMA, S.L.
12. LABAQUA, S.A.U. Alicante
13. Laboratorio de EMALSA
14. Laboratorio Dr. Oliver Rodés, S.A.
15. Laboratorios Munuera S.L.U.



16. Labs & Technological Services AGQ, S.L.
17. PROAGUAS COSTABLANCA, S.A.
18. Servicios de la Comarca de Pamplona S.A.
19. EMATSA Tarragona
20. GAMASER

D. En 2022 se realizó un ejercicio de equivalencia para comparar el método de referencia **UNE EN ISO 7899-2 para *Enterococo intestinal*** mediante el uso de la tecnología patentada de sustrato definido de IDEXX (Defined Substrate Technology, DST).

Los laboratorios participantes fueron:

1. FCC AQUALIA, S.A. Laboratorio de OVIEDO.
2. Lab. ETAP de Venta Alta-Arrigorriaga, Consorcio de Aguas BILBAO BIZKAIA.
3. Análisis biológicos BIOTALDE, S.L.
4. Canal De Isabel II, S.A. Subdirección de calidad de las aguas
5. Consorcio de aguas de Tarragona. ETAP L'AMPOLLA
6. EMASESA. ETAP EL CARAMBOLO
7. EUROFINS IPROMA S.L.U.
8. Laboratorios Munuera SL
9. LC AGUAS DE GIPUZKOA
10. NUTRILAB, SL
11. ETAP de EGUILLOR
12. Principado De Asturias
13. STENCO LABORATORIO, SL
14. SGS TECNOS SA
15. XUNTA DE GALICIA

=====