

## Especificación

Medio sólido para la enumeración de microorganismos heterotróficos en aguas potabilizadas según el método de las farmacopeas.

## Presentación

	<b>Encajado</b>	<b>Caducidad</b>	<b>Almacenamiento</b>
30 Placas Filtración Placas filtración 55 mm con: 9 ± 1 ml	1 caja que contiene: 6 bolsas de plástico con 5 placas de 55 mm ø /bolsa.	6 meses	2-25 °C

## Composición

Composición (g/l):

Proteosa peptona.....	0,500
Hidrolizado de caseína.....	0,500
Extracto de levadura.....	0,500
Dextrosa.....	0,500
Almidón soluble.....	0,500
Piruvato sódico.....	0,300
Fosfato dipotásico.....	0,300
Sulfato magnésico.....	0,024
Agar.....	15,000

## Descripción/Técnica

### Descripción :

El Agar R2A fue propuesto en 1979 por Reasoner y Geldenreich y poco tiempo después adoptado como método alternativo por la APHA (1985) para recuperar células estresadas en los exámenes rutinarios de aguas potabilizadas. También ha sido adoptado por la farmacopea, para el control de agua purificada.

Habitualmente el empleo de medios de cultivo ricos en nutrientes como el PCA o el TSA permiten el crecimiento de la microbiota normal pero no facilita la recuperación de la estresada o de la resistente a la cloración. Utilizando un medio pobre en nutrientes, como el R2A y combinándolo con largas incubaciones a bajas temperaturas se consiguen recuperar estas células que de otro modo son difíciles de detectar.

En el Agar R2A la peptona y el hidrolizado de caseína son las fuentes de nitrógeno, mientras que el extracto de levadura suministra las vitaminas y otros factores de crecimiento y la glucosa constituye la fuente de carbono. El Piruvato facilita la recuperación de las células estresadas y el almidón funciona como detoxificante. El sulfato magnésico y el fosfato potásico aportan los iones necesarios para mantener la presión osmótica y el agar-agar es el agente solidificante.

### Técnica:

Las muestras de agua deben examinarse lo antes posible y si se han de demorar más de seis horas es imprescindible refrigerarlas, pero no más de 30 horas, pasadas las cuales la muestra se considera inadecuada.

Después de filtración de la muestra a través de una membrana de 0.45 micras de diámetro, colocar ésta sobre la superficie del medio de cultivo.

Con este medio se suele hacer una incubación a 35°C durante 72 horas como mínimo pero mejor si se prolonga hasta 5 ó 7 días. Si la incubación se hace entre 20 y 25°C, que es lo recomendado, el tiempo mínimo será de 5 días y la lectura definitiva a los 7 días. En todas estas incubaciones a tiempo prolongado, deben tomarse las debidas precauciones para evitar el excesivo desecado de las placas.

Los microorganismos que no están estresados o los de crecimiento rápido, en estas condiciones de cultivo, suelen producir colonias mucho más pequeñas que en los medios y condiciones habituales.

Hacer recuento de todas las colonias desarrolladas en la superficie de la membrana.

Calcular la carga bacteriana por ml de muestra considerando el volumen filtrado y la dilución y expresar el resultado en UFC/ml.

**Control de Calidad****Control Físico/Químico**

Color : Amarillo pálido                      pH: 7,2 ± 0,2 a 25°C

**Control de Fertilidad**

Filtración con Membrana; rango 10-100 UFC (Productividad) según Farm. Eur.

Aerobiosis. Incubación a 32,5 ± 2,5°C Lectura a las 24-72 h para bacterias y 5-7 días para hongos y levaduras

Metodología analítica acorde con ISO 11133:2014/A1:2018; A2:2020.

*Ps. aeruginosa* y *E. coli* doble temp. incubación 30-35 °C / 20-25 °C

Control microbiológico según ISO 11133:2014/ A1:2018; A2: 2020.

**Microorganismo***Ps. aeruginosa* ATCC® 9027, WDCM 00026*Bacillus subtilis* ATCC® 6633, WDCM 00003*Escherichia coli* ATCC® 8739, WDCM 00012*Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404, WDCM 00053*Candida albicans* ATCC® 10231, WDCM 00054*Staphylococcus aureus* ATCC® 6538, WDCM 00032*E. coli* ATCC® 8739, WDCM 00012 (20-25°C)*Ps. aeruginosa* ATCC® 9027, WDCM 00026 (20-25°C)**Desarrollo**

Bueno (≥70%)

Bueno (≥70%)

Bueno (≥70%)

Bueno (≥70%)

Bueno (≥70%)

Bueno (≥70%)

Bueno (≥70%)

Bueno (≥70%)

**Control de Esterilidad**

Incubación 48 h a 30-35°C y 48 h a 20-25 °C: SIN CRECIMIENTO

Verificación a 7 días tras incubación en las mismas condiciones.

**Bibliografía**

- ATLAS, R.M. (1995) Handbook of Media for Environmental Microbiology. CRC Press. Boca Raton. Fla. USA.
- CLESCERI, L.S., A.E. GREENBERG and A.D. EATON (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. APHA Washington D.C. USA.
- EATON, A.D., A.E. GREENBERG and L.S. CLESCERI (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. APHA Washington D.C. USA.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 10th ed. Suppl 6.3 (2020). General Monographs. Water for injections. (pg. 4339) EDQM. Council of Europe. Strasbourg.
- GREENBERG, A.E., R.R. TRUSSELL and L.S. CLESCERI (1985). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th ed. APHA-AWWA-WPCF. Washington D.C. USA.
- REASONER, D.J. and E.E. GELDREICH (1979) A new Medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Abstracts of Annual Meeting. ASM 79th Meeting. Paper #N7.
- Van SOETSBERGER, A.A. and C.H. LEE (1969) Pour plates or streak plates?. Appl. Microbiol. 18:1092 -1094.