

Especificación

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

Presentación

| | Encajado | Caducidad | Almacenamiento |
|---|---|------------------|-----------------------|
| 10 Frascos Botella 125 ml con: 100 ± 3 ml | 1 caja con 10 botellas de 125 ml. Tapón plástico con rosca. | 16 meses | 8-25 °C |

Composición

| Composición (g/l): | |
|---------------------------|--------|
| Proteosa Peptona..... | 0.500 |
| Peptona de Caseína..... | 0.500 |
| Extracto de levadura..... | 0.500 |
| Glucosa..... | 0.500 |
| Almidón soluble..... | 0.500 |
| Piruvato sódico..... | 0.300 |
| Fosfato dipotásico..... | 0.300 |
| Sulfato magnesico..... | 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.

El Agar R2A se admite como alternativo con cualquier método de inoculación, superficial, en profundidad o como soporte de membranas filtrantes. Sin embargo el método de inóculo en profundidad, en este caso no está recomendado, ya que debido al "shock" térmico que provoca, puede afectar seriamente a la viabilidad de las células estresadas.

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.

Nota: Los medios sólidos pueden fundirse de diferentes maneras: autoclave, baño y si el cliente lo ve conveniente también el microondas. Siempre que se escoja la opción del microondas es necesario tomar ciertas medidas de seguridad para evitar la rotura del frasco o tubo, tales como aflojar el tapón y poner la botella o tubo en un baño maría dentro del microondas. Las temperaturas y tiempos de fusión dependerán de la forma del envase, del volumen de medio y de la fuente calorífica. Deben evitarse tanto los sobrecalentamientos como los calentamientos prolongados.

Control de Calidad

Control Físico/Químico

Color : Amarillo pálido

pH: 7,2 ± 0,2 a 25°C

Control de Fertilidad

Fusión- Preparar placas- inocular: 50-100 UFC según Farm. Eur. y normas ISO 11133.

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

Escherichia coli ATCC® 8739, WDCM 00012

Staphylococcus aureus ATCC® 6538, WDCM 00032

Bacillus subtilis ATCC® 6633, WDCM 00003

Aspergillus brasiliensis ATCC® 16404, WDCM 00053

Candida albicans ATCC® 10231, WDCM 00054

Ps. aeruginosa ATCC® 9027, WDCM 00026

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.