

### Especificación

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

### Fórmula \* en g/L

Proteosa peptona.....	0,500
Peptona 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

pH final a 25 °C, 7,2 ±0.2

\*Fórmula ajustada y/o suplementada según necesidades para cumplir los criterios de recuperación

### Reconstitución

Suspender 18,1 g de polvo en 1 L de agua destilada y calentar hasta ebullición con agitación constante. Distribuir en contenedores y esterilizar al autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### 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.

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 30 - 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 28°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.

### Control de calidad

**Temperatura de incubación:** 30-35 °C / 20-28 °C      **Tiempo de incubación :** 48-72 h / ≤ 5 days

**Inóculo:** Rango práctico 50-100 UFC (Productividad) según Farm. Eur.& UNE-EN ISO 11133:2014/Amd 1:2018 .  
Método MF. x 2 Temperaturas.

Microorganismo	Crecimiento	Observaciones
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633	Productividad > 0.70	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538	Productividad > 0.70	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	Productividad > 0.70	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Productividad > 0.70	-
<i>Salmonella abony</i> NCTC® 6017	Productividad > 0.70	-
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	Productividad > 0.70	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404	Productividad > 0.70	-

---

**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.
- ISO 11133:2014/ Adm 1:2018. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- Van SOETSBERGER, A.A. and C.H. LEE (1969) Pour plates or streak plates?. Appl. Microbiol. 18:1092 -1094.

**Almacenamiento**

Solo para uso de laboratorio. Mantener bien cerrado, al resguardo de la luz, en lugar fresco y seco (entre 4°C y 30 °C).