

## Especificación

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

## Presentación

	Encajado	Caducidad	Almacenamiento
20 Placas Irradiadas 90 mm - Doble envase con: 21 ± 2 ml	1 caja con 2 paquetes de 10 placas, envueltas por bolsa de celofán. Con etiquetado lateral. Cada paquete contiene un indicador de irradiación (8 -14kGy).	3,5 meses	2-14 °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 importante:** Las placas de Petri se utilizan en el control microbiológico de las superficies y del aire del interior de salas limpias, en aisladores, en RABS, en la industrias alimentarias y en los hospitales. La envoltura doble / triple de las placas irradiadas, asegura que el paquete en sí no contamine el medio ambiente, para ello debe retirarse la primera envoltura justo antes de entrar en la zona limpia.

**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***Escherichia coli* ATCC® 8739, WDCM 00012*Staphylococcus aureus* ATCC® 6538, WDCM 00032*Bacillus subtilis* ATCC® 6633, WDCM 00003*Candida albicans* ATCC® 10231, WDCM 00054*Ps. aeruginosa* ATCC® 9027, WDCM 00026*Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404, WDCM 00053*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**

Verificación a 7 días tras incubación en las mismas condiciones.

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

**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.