



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Instituto Universitario del Agua y de las Ciencias Ambientales

Máster oficial en Gestión sostenible y tecnologías del agua

“Evaluación del rendimiento de recuperación de Legionella en muestras de agua, siguiendo la norma UNE ISO 11731”

Periodo de prácticas realizadas en la empresa Labaqua S.A, bajo la dirección de Vicente Catalán Cuenca.

Raquel Martín Marcos

Índice

	Pág.
1. Introducción	4
2. Descripción de Labaqua, S.A	4
2.1 Sección de cromatografía	4
2.2 Sección de espectrofotometría	5
2.3 Sección de vertidos y residuos	5
2.4 Sección de microbiología	5
2.5 Bioseguridad	6
2.6 Olfatometría	7
2.7 Ejercicios de intercomparación	7
2.8 Materiales de referencia y kits de diagnóstico molecular	8
3. Tareas desarrolladas	8
3.1 Tareas globales	8
3.1.1 Objetivo	8
3.1.2 Plan de trabajo	8
3.1.2.1 Preparación y control de medios de cultivo bacteriológicos	9
3.1.2.2 Preparación y control de material para la realización de ensayos microbiológicos	9
3.1.2.3 Formación en técnicas de aislamiento en cultivo: por filtración	11
de membrana, preenriquecimiento, enriquecimiento	
3.1.2.4 Manipulación de materiales de referencia	12
3.2 Tarea específica	
3.2.1 Objetivo	13
3.2.2 Introducción	13
3.2.3 UNE-ISO 11731	14
3.2.4 Materiales	14
3.2.5 Medio de cultivo y reactivos	15
3.2.6 Plan de trabajo	
3.3.6.1 Preparación de muestras	15
3.3.6.2 Metodología	16
3.3.6.3 Incubación	22
3.3.7 Resultados	22
3.3.8 Conclusiones	27
4. Valoración del aprendizaje	28
5. Bibliografía	29

Agradecimientos

Quisiera mostrar mi agradecimiento al Departamento de Microbiología, por acogerme de una forma tan grata durante mi estancia de prácticas en la empresa.

A Vicente Catalán por guiarme en los distintos aspectos del proyecto.

En especial a José Luis, Ana, Lorena, Victoria, Alicia e Israel, por ayudarme en todo lo necesario para llevar mis tareas a cabo.

1. Introducción

En la siguiente memoria se expone el trabajo realizado durante la estancia de prácticas en la empresa LABAQUA, en el Centro Tecnológico de Alicante que conforma su sede central. Dicha estancia tuvo una duración de 300 horas y fue realizada en la sección de Microbiología, desarrollando tareas de colaboración en análisis de muestras de aguas, y más específicamente en el proyecto “*Evaluación del rendimiento de recuperación de Legionella en muestras de agua, siguiendo la norma ISO 11731*”. En las siguientes páginas se hace una revisión sobre la importancia de los análisis de Legionella en muestras de agua para mantener la vigilancia epidemiológica, la legislación vigente y la evaluación de las técnicas analíticas presentes en la norma ISO 11731.

2. Descripción de LABAQUA, S.A

LABAQUA formada por el Centro Tecnológico de Alicante (sede central) y delegaciones en Barcelona, A Coruña, Murcia, Sevilla, Valencia, Vizcaya y Zaragoza, ofrece servicios de laboratorio de análisis, diagnóstico y certificación medioambiental.

Se realizan análisis y control de calidad de todo tipo de aguas, suelos, lodos, lixiviados, residuos y aire (emisiones e inmisiones). También ofrece un servicio de Control ambiental y bioseguridad, y medición y control de olores mediante olfimetría.

La empresa dispone de distintas secciones analíticas, una vez recibidas las muestras y debidamente procesadas se analizarán en la sección pertinente según el paquete de servicio contratado por el cliente:

2.1 Sección de cromatografía

Sección especializada en el análisis de microcontaminantes orgánicos (plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos orgánicos volátiles), radiactividad e iones por cromatografía líquida de alta resolución.

En microcontaminantes orgánicos se cuenta con la más avanzada tecnología que permite llevar a cabo análisis de compuestos a niveles de concentración de trazas; caso de la determinación de acrilamida, cuyo límite de determinación es de 0'05 µg/L, siendo el único laboratorio acreditado de España para estos niveles de concentración.

Se centran en desarrollar métodos de análisis que necesiten de un volumen mínimo de muestra para facilitar manipulación y transporte, desde cualquier punto geográfico.

Un ejemplo en este sentido es el empleo de la técnica Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) acoplado a cromatografía de gases-espectrometría de masas. Este método, que ha sido validado y acreditado por ENAC, permite el análisis simultáneo de más de 150

microcontaminantes orgánicos en aguas y otras matrices con niveles de cuantificación inferiores a 0'01 µg/L con tan solo 100 mL de muestra.

2.2 Sección de espectrofotometría

En la sección de espectrofotometría, se engloban las áreas de espectrofotometría, colorimetrías y volumetrías. Aquí se ubican los equipos para la determinación de los cationes mayoritarios, así como los metales pesados que pueden encontrarse en las muestras.

En el área de Colorimetrías se realizan técnicas basadas en reacciones colorimétricas que son cuantificadas por medición espectrofotométrica de absorción molecular (UV-VIS).

Las Volumetrías son técnicas rápidas, mediante las que se obtiene una visión global sobre las características físico-químicas de cualquier tipo de agua, por lo que puede evitarse una analítica más cara y compleja, cuando esta información descarta un determinado uso del agua problema.

2.3 Sección de vertidos y residuos

Es la Sección donde se utilizan técnicas específicas para la determinación de la carga contaminante de cada muestra (además de la determinación de parámetros clásicos de contaminación como la DQO o la DBO5, se realizan ensayos más específicos como los ensayos de toxicidad con *Photobacterium phosphoreum*).

También donde se procesan las muestras de lodos para su reutilización en usos agrícolas, cuantificando el contenido en determinados elementos y calculando valores de interés agronómico.

2.4 Sección de microbiología

Aquí se analizan todos los parámetros microbiológicos que contempla la actual legislación sobre de muestras de agua, aire, suelos, lodos y superficies, y en general, se determinan todos aquellos microorganismos de transmisión hídrica que pueden ser patógenos para el ser humano.

Disponen de multitud de técnicas convencionales, acreditadas, que abarcan las diferentes áreas de la microbiología, que capacita a la sección para realizar análisis rutinarios en las muestras sospechosas de contener algún agente patógeno. La realización de técnicas rápidas de identificación para aquellos microorganismos difícilmente identificables por otros métodos o de lento crecimiento, se realiza en el Área de Biología molecular donde somos especialistas en el diseño, desarrollo, validación e implementación de métodos moleculares rápidos y específicos, basados en la amplificación de ácidos nucleídos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Además se realizan otras actividades como:

- Implementación de sistemas basados en el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). Control de calidad microbiológica de ambientes interiores (hospitales, oficinas, hoteles,...) y de ambientes exteriores (vertederos, estaciones depuradoras de aguas residuales,...)
- Secuenciación de ácidos nucleicos empleando secuenciación automática por electroforesis capilar. Identificación bacteriana por secuenciación del DNAr 16S.
- Investigación de enterovirus humanos por aislamiento en cultivos de líneas celulares de riñón de mono (BGM,) y mediante amplificación de RNA específico por la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)
- Importante actividad investigadora e innovadora orientada a la aplicación de métodos moleculares rápidos, al diagnóstico microbiológico ambiental y en el aseguramiento de la calidad en laboratorios microbiológicos.

2.5 Bioseguridad

Labaqua, ofrece un servicio integral en el desarrollo y aplicación del Real Decreto 865/2003, 4 de Julio, en el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis y obliga a un control y mantenimiento óptimo de las instalaciones con riesgo de crecimiento y diseminación de Legionella.

En éste sentido, realizan diagnósticos iniciales, y realizan un mantenimiento y control siguientes instalaciones con predisposición a ser colonizadas por el microorganismo: torres de refrigeración y condensadores evaporativos, sistemas de agua caliente sanitaria, sistemas de agua climatizada (piscinas, bañeras de hidromasaje, etc.), centrales humidificadoras industriales, sistemas de instalación interior de agua fría de consumo humano, fuentes ornamentales, etc.

Dentro del control de las instalaciones se realiza un proceso rápido de actuación en caso de que aparezcan incidencias:

- Auditoría de Instalaciones
- Toma de muestras en agua y bioaerosoles, aire y lodos.
- Empleo de métodos de aislamiento en cultivo adaptados a cada tipo de muestra.
- Diagnóstico molecular rápido, basados en PCR a “tiempo real” que permiten la cuantificación (Q-PCR) y viabilidad (RT-PCR) de Legionella (total de organismos y si están vivos o muertos).
- Ensayos complementarios como: Identificación de especie por secuenciación del DNAr 16S; Caracterización molecular por AP-PCR; Ensayos de actividad biocida frente a Legionella.
- Instauración de acciones preventivas y de mantenimiento
- Aplicación de medidas correctoras.

- Limpieza y desinfección de instalaciones
- Métodos analíticos acreditados por ENAC (109/LE285).
- Conservación de todos los aislados obtenidos, disponiendo en la actualidad de un cepario con más de 2600 aislados de Legionella

Desde la labor investigadora cuenta con más de 15 años de experiencia en el conocimiento y mejora de los métodos de detección, prevención y erradicación de Legionella en sistemas de agua susceptibles de producir brotes epidémicos.

2.6 Olfatometría

La olfatometría es una técnica normalizada que permite establecer una relación entre los posibles orígenes de los malos olores (generación y emisión) y su repercusión en el entorno (inmisión), permitiendo objetivar la incidencia de los malos olores y establecer la adopción de medidas correctoras para su eliminación o minimización.

En este sentido los estudios olfatométricos resultan una herramienta muy eficaz en la solución a los problemas de contaminación por olores.

En un primer proceso se determinan las posibles fuentes de olor y se analizan mediante un olfatómetro totalmente controlado por ordenador muestras de aire contaminado por olores, permitiendo almacenar las respuestas de los panelistas e interpretar estadísticamente los resultados.

Posteriormente se calcula la emisión de olores de cada fuente y la inmisión resultante en el entorno, mediante la aplicación de un modelo matemático de dispersión. Dicho modelo permitirá establecer una estrategia para la adopción de medidas correctoras e incluso predecir los resultados que se pueden obtener con la aplicación de las mismas.

2.7 Ejercicios de intercomparación

Un ejercicio de intercomparación está formado por un conjunto de laboratorios que deben analizar varias veces al año, muestras idénticas proporcionadas por la entidad organizadora.

LABAQUA posee gran experiencia en este campo ya que organiza desde 1996, junto a CALITAX, (desde el año 2003 CALITAX-LABAQUA, A.I.E.) ejercicios de intercomparación en temas del campo medioambiental.

Mediante estos ejercicios de intercomparación se pone de manifiesto de la calidad del resultado analítico que ofrece el laboratorio

2.8 Materiales de referencia y kits de diagnóstico molecular

El uso de materiales de referencia es muy frecuente en los laboratorios de ensayo, ya que permiten de una forma sencilla evaluar la validez de los resultados obtenidos.

LABAQUA viene desarrollando desde hace años, a través de su Departamento de I+D+i y Departamento de Calidad, materiales de referencia microbiológicos y físico-químicos.

En cuanto a los kits de diagnóstico molecular se realizan mediante la técnica de amplificación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se caracteriza por la rapidez, sensibilidad, la capacidad de discriminación entre células viables y células muertas, permitiendo una cuantificación celular.

- Kits de detección y/o cuantificación de microorganismos mediante PCR (PCR cuantitativa y convencional de Legionella, y de confirmación bacteriana para varios microorganismos).
- Kits de preparación de muestras para el análisis de Legionella mediante PCR (kit para la concentración de muestras, kit de extracción de DNA de aguas limpias y aguas sucias)
- Material de Referencia cuantitativo para Legionella pneumophila (BACuanti-DNA y BACuanti-PCR)

3. Tareas desarrolladas en la empresa

Las tareas llevadas a cabo se dividieron en dos partes:

- Tareas globales: durante el primer mes de prácticas desarrolle actividades rutinarias que se realizan en el laboratorio, como análisis microbiológicos, preparación de medios de cultivo y material necesario para el trabajo diario
- Tarea específica: en los dos meses siguientes desarrolle el trabajo titulado “Evaluación del rendimiento de recuperación de Legionella en muestras de agua siguiendo la norma ISO 11731”.

3.1 Tareas globales

3.1.1 Objetivo

Adquirir formación en técnicas analíticas microbiológicas así como en la preparación de medios de cultivos y material necesario para las mismas.

3.1.2 Plan de trabajo

3.1.2.1 Preparación y control de medios de cultivo bacteriológicos

Los medios de cultivos bacteriológicos eran preparados diariamente en el laboratorio en función de la entrada de muestras a analizar. Era importante mantener una reserva de medios debidamente refrigerados para su conservación ya que la entrada de muestras era variable. Otra razón por la cual la reserva es importante es debido a que las

muestras no siempre llevan los mismos analitos a detectar si no que va a depender de su procedencia.

La determinación de los analitos a analizar es una función externa a la sección de microbiología, y es en la recepción de muestras donde se procesan y son llevadas a la sección correspondiente según el paquete contratado.

Los medios utilizados habitualmente en el laboratorio se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1: Tabla de medios de cultivos utilizados

Medio	Analito
Tergitol	Coliformes totales/ <i>Escherichia coli</i> / <i>Estreptococos</i> fecales
TBX (Tryptone bile x-gluconoride)	<i>Escherichia coli</i> (específico)
WPCA (Water plate count agar)	Bacterias aerobias
TSC (Agar Triptosa Sulfito Cicloserina)	<i>Clostridium perfringens</i>
SB	<i>Enterococos</i> (especifico)
CET	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
BCYE	<i>Legionella</i>
XLD (Agar Xilosa Lisina Desoxicolato)	<i>Shigella</i> sp
Rambach	<i>Salmonella</i>
Verde brillante	<i>Salmonella</i>
SS (Agar Salmonella Shigella)	<i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>
Rappaport-Vassiliadis	<i>Salmonella</i> (enriquecimiento)
Selenito cistina	<i>Salmonella</i> (enriquecimiento)

- o Metodología
 - a. Disolución del medio en agua destilada (la cantidad de medio por volumen de agua viene determinada por cada fabricante)
 - b. Esterilización del medio. (Autoclave o hirviendo)
 - c. Dispensación en placas de petri.
 - d. Conservación refrigerada

En cada medio, existe la posibilidad de añadir suplementos o antibióticos que hagan el medio más específico para la bacteria que se quiere aislar.

La calidad del medio realizado es importante para asegurar el análisis. El medio debe ser estéril y específico para su analito. Por ello a la hora de dispensar el medio en las placas petri siempre se realizan al menos 3 controles, con sus respectivas replicas, como se muestra en la siguiente figura. En los medios permisivos como el TSA o el WPCA, no necesitan control negativo ya que como su propio nombre indica crece cualquier microorganismo.

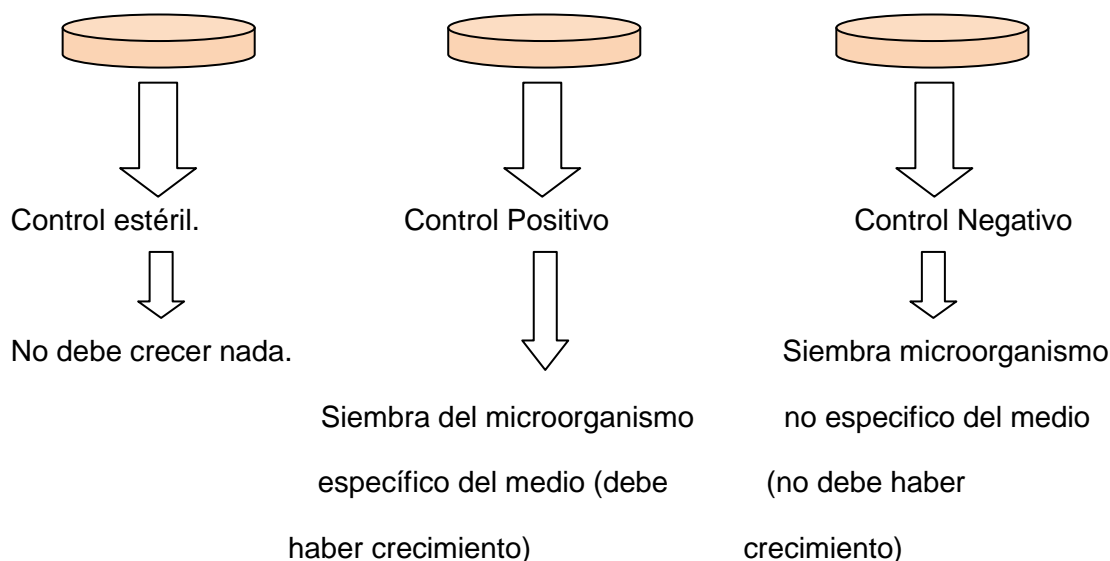


Figura 1. Controles de calidad de medio bacteriológico.

3.1.2.2 Preparación y control de material para la realización de ensayos microbiológicos

La esterilidad del material en los ensayos microbiológicos resulta tremendamente importante dado la facilidad de contaminación por microorganismos presentes en el ambiente del propio laboratorio.

Los procesos de esterilización de material no desechable (vidrio) se realizan diariamente mediante autoclavado.

El agua que se utiliza en las técnicas de aislamiento y manipulación de microorganismos debe ser estéril, por lo que en el propio laboratorio se autoclavan las botellas de agua que se utilizarán. Cada botella tiene su propio control de esterilidad, que se realiza en el medio WPCA, un medio permisivo que permite el crecimiento si hubiera contaminación en el agua.

3.1.2.3 Formación en técnicas de aislamiento en cultivo: por filtración de membrana, preenriquecimiento, enriquecimiento

➤ Filtración por membrana:

El equipo de filtración por membrana es un sistema que consta de una rampa de filtración formada por de 3 a 6 cabezales, donde se colocan los filtros de celulosa y embudos estériles. Las muestras de agua se hacen pasar mediante el vacío creado por una bomba peristáltica por el filtro de celulosa de 0,45 micras de tamaño de poro donde quedarán retenidas las bacterias de un mayor tamaño que el poro.

El filtro se dispone sobre el medio de cultivo específico del microorganismo que se quiere aislar. Este método es ágil y rápido ya que en 24 horas se pueden tener los resultados en las bacterias Coliformes. La única dificultad viene dada por las muestras muy concentradas o turbias, donde es recomendable hacer diluciones o disminuir el inóculo de la muestra.

➤ Preenriquecimiento, enriquecimiento de Salmonella

El enriquecimiento es una técnica que utiliza un medio selectivo líquido para permitir el desarrollo de un microorganismo a partir de una muestra que contiene una gran variedad de microorganismos. Así, aquellos microorganismos para los que el ambiente sea más favorable crecerán más que los otros y finalmente serán predominantes. Es una técnica cualitativa ya que detecta presencia o ausencia del microorganismo en la muestra. (Ver figura 2).

o Metodología

Primer día:

Preenriquecimiento:

Filtrar 1L de muestra en filtro de celulosa

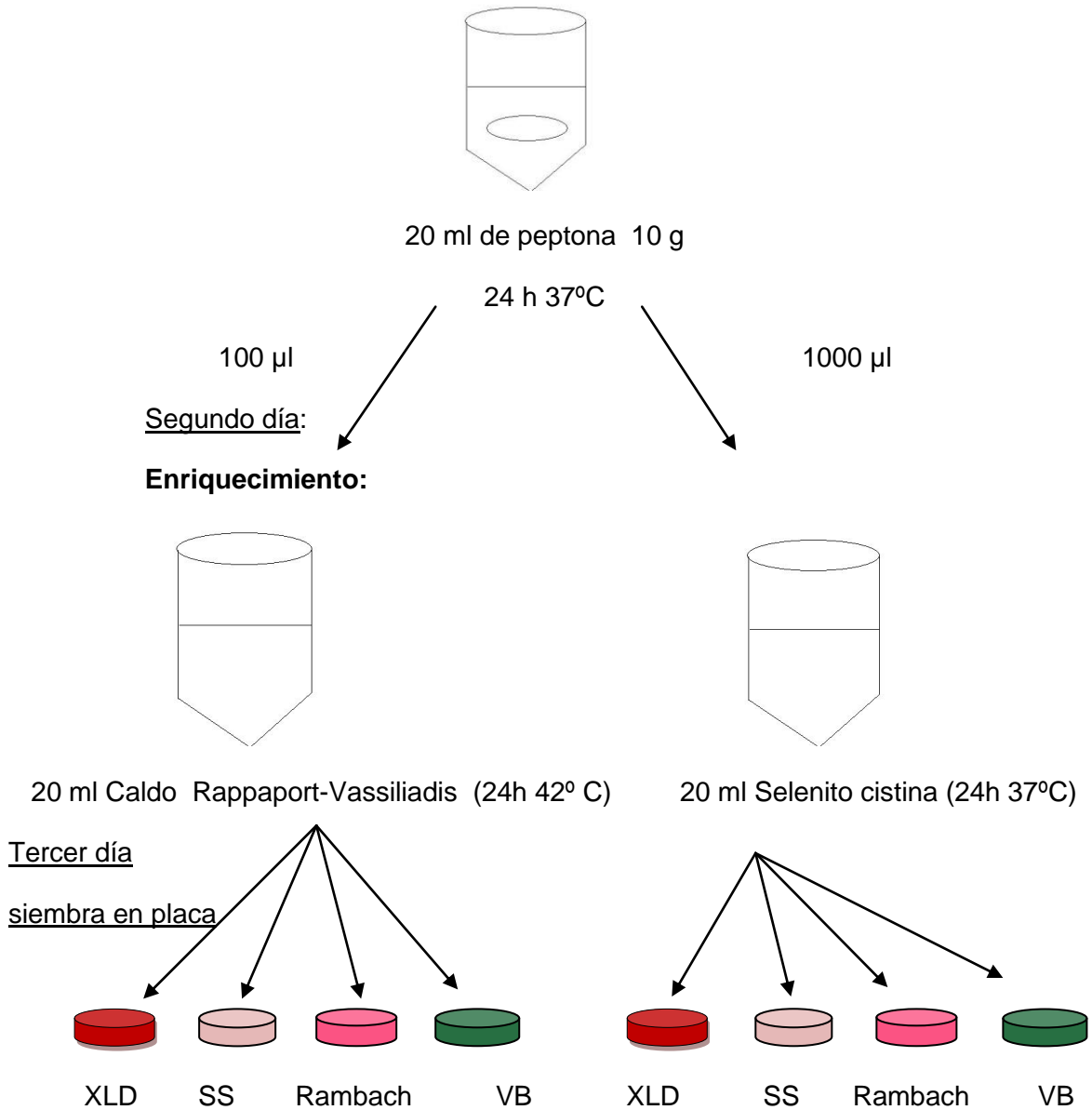


Figura 2. Preenriquecimiento y enriquecimiento de salmonella

3.1.2.4 Manipulación de materiales de referencia

Los materiales de referencia permiten validar los resultados de los ensayos. En el caso de los medios se utilizan para calcular la productividad del medio.

En el propio laboratorio se liofilizan pastillas de microorganismos con un número determinado de unidades formadoras de colonias. Al disolver la pastilla en agua destilada se crea una muestra artificial que se filtra y se coloca en el medio correspondiente. Se puede determinar la productividad del medio, relacionando las colonias observadas con las colonias esperadas. La productividad debe aproximarse al 100 % lo que refleja que el medio es el adecuado para recuperar los microorganismos en los análisis.

Productividad del medio (%): $(\text{Observados} / \text{esperados}) \cdot 100$

3.2 Tarea específica:

3.2.1 Objetivos

Se pretende evaluar el rendimiento de los diferentes tratamientos de reducción de microbiota descritos en la norma UNE ISO 11731 relativa al aislamiento de *Legionella* en cultivo.

3.2.2 Introducción

La legionelosis es una enfermedad bacteriana de origen ambiental que presenta dos formas clínicas diferenciadas: la infección pulmonar (Enfermedad del Legionario) que se caracteriza por neumonía con fiebre alta y la forma no neumónica (fiebre de Pontiac), que se manifiesta como un síndrome febril agudo.

La infección por *Legionella* se adquiere en ambiente comunitario y hospitalario, asociada a varios tipos de instalaciones, equipos y edificios.

La *Legionella* es una bacteria ambiental que sobrevive en un amplio rango de condiciones físico-químicas, se multiplica entre 25°C y 45°C destruyéndose a 70°C. La bacteria puede llegar a colonizar los sistemas de abastecimiento de las ciudades mediante las redes de distribución, incorporándose a sistemas de agua sanitaria o torres de refrigeración. La bacteria sobrevive de forma intracelular dentro de amebas que forman una biocapa favorecida por el acumulo de nutrientes y materia orgánica.

La temperatura favorable y la formación de esta biocapa son las propicias para que la bacteria llegue a una dosis infectiva para el hombre. Si las instalaciones en las que se encuentra son productoras de aerosoles, la bacteria se puede mantener en el aire dentro de las pequeñas gotas y ser inhaladas por el hombre.

En el Real Decreto 865/2003 (BOE núm. 171 del 18 de julio) se establecen los criterios higiénico-sanitario para la prevención y control de la legionelosis.

Como ya se ha citado anteriormente, en Labaqua se controlan instalaciones en contacto con el agua susceptibles de ser reservorios de Legionella

En el laboratorio se analizan las muestras mediante la norma internacional UNE- ISO 11731. A continuación se evaluará el rendimiento de recuperación de Legionella bajo los distintos tratamientos que se describen en la norma.

3.2.3 UNE-ISO 11731

La norma UNE- ISO 11731 describe un método de cultivo para el aislamiento de los organismos de Legionella y para el recuento en muestras ambientales.

A su vez se divide en dos partes:

- UNE- ISO 11731: 2007, (parte 1): donde las muestras ambientales pueden ser de toda clase: potables, industriales, naturales y materiales asociados tales como sedimentos, depósitos y lodos.
- UNE-ISO 11731-2: 2008, (parte 2): en este caso las aguas analizadas son las destinadas al uso humano en lavabos, aguas de piscina. Se aplica a aguas con bajo contenido en bacterias.

El aislamiento de Legionella en las muestras de agua, resulta dificultoso, sobre todo en las muestras ambientales más sucias, ya que la propia microbiota presente en la muestra va a competir con la Legionella y puede verse desplazada por microorganismos de más fácil crecimiento. El metabolismo de Legionella es muy específico y necesita crecer en un medio agar tamponado de extracto de levadura y carbón vegetal que contiene L-cisteína y hierro (III). Este medio le resulta muy atractivo a otras bacterias como Escherichia coli que puede crecer sin problemas y de una forma más rápida y evitar el aislamiento de Legionella.

Por ello los tratamientos desarrollados en la norma UNE-ISO 11731 están encaminados a reducir al máximo la microbiota acompañante, pero eso conlleva una pérdida inevitable de Legionella, ya que los tratamientos son inespecíficos.

Lo que se pretende en este trabajo es evaluar la recuperación de Legionella que se obtiene con cada tratamiento.

3.2.4 Materiales

Los materiales utilizados en el trabajo fueron los que habitualmente se usan en el laboratorio y se citan a continuación:

- Placas Petri estériles de un diámetro de 150 mm.
- Estufa , capaz de mantener una temperatura de 37°C
- Equipo de filtración con soporte para el filtro y embudos para filtrar volúmenes hasta de 500 ml.
- Bomba de filtración de membrana de presión positiva, peristáltica y capaz de producir un flujo de hasta 3L/ min

- Filtros de membrana de celulosa y policarbonato con tamaño de poro de 0,42 μm .
- Fuente de calor: mechero de gas de corona
- Agitador rotatorio (Vortex)
- Baño de agua, capaz de mantener una temperatura de 50°C
- Material de vidrio esterilizado mediante autoclave
- Tubos estériles de plástico.

3.2.5 Medio de cultivo y reactivos

El medio de cultivo utilizado fue BCYE, medio tamponado de Agar, Extracto de levadura y carbón activo. Específico para el aislamiento de Legionella cuyos componentes son

- Extracto de levadura
- Agar
- Carbón activo
- Alfa –cetoglutarato
- Tampón ACES
- Hidróxido potásico
- L- cisteína
- Pirofosfato de hierro
- Agua destilada

Como suplementos se añadieron:

- Glicina exenta de amonio
- Sulfato de polimixina (antibiótico)
- Clorhidrato de vancomicina (antibiótico)
- Cicloheximida (antibiótico)

Los reactivos que se utilizaron fueron:

- Tampón ácido 10X (10 veces concentrado), a partir de ácido clorhídrico y cloruro potásico.
- Tampón ácido 1X, se obtiene mediante dilución del tampón ácido 10X.

3.3.6 Plan de trabajo

3.3.6.1 Preparación de muestras

Para evaluar la recuperación en los distintos tratamientos, debemos saber lo que tenemos en la muestra original. Las muestras a analizar son muestras controladas e inoculadas con un número conocido de bacterias. Para ello se tituló una dilución de la cepa ATCC 33152 de Legionella pneumophila perteneciente al cepario del laboratorio. Como medio de cultivo se utilizó caldo nutritivo y ácido bórico que funcionó como agente

bacteriostático y permitía conservar el número de unidades formadoras de colonia por dilución durante un determinado tiempo.

A partir de una suspensión de Legionella en 20 ml de caldo nutritivo y ácido bórico, se prepararon diluciones seriadas que fueron filtradas mediante filtración en membrana. El filtro se colocó sobre el medio BCYE y se obtuvieron recuentos de colonias que disminuían a medida que aumentaba la dilución.

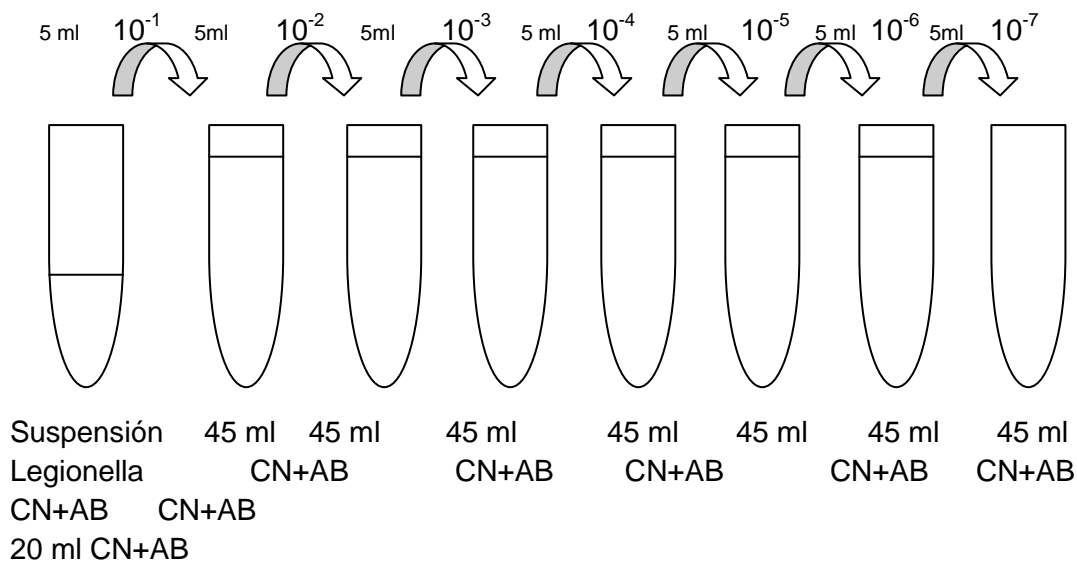


Figura 3. Diluciones cepa ATCC 33152 Legionella pneumophila

De cada dilución se filtró un 1 ml mediante filtración de membrana para obtener recuentos contables en las placas de BCYE. En la dilución 10^{-5} se contaron 43 u.f.c, por lo que si en el tratamiento se espera una reducción logarítmica de 2 o 3 unidades debemos utilizar la dilución 10^{-2} o inclusive la 10^{-1} para asegurarnos una dilución de trabajo con al menos 10^5 u.f.c.(unidades formadoras de colonias).

La renovación semanal del título es imprescindible para que la bacteria este en las condiciones adecuadas de crecimiento.

3.3.6.2 Metodología

Diariamente se inoculó un botellón de 2L de agua estéril con 1ml de la dilución de trabajo. Partiendo de la misma muestra, se realizó el análisis según la dos partes de la norma UNE- ISO 11731. A su vez se realiza una filtración directa que no es sometida a ningún tratamiento, con sus correspondientes replicas para saber la cantidad de bacterias que tenemos en la muestra.

En el siguiente esquema se muestra la metodología de trabajo.

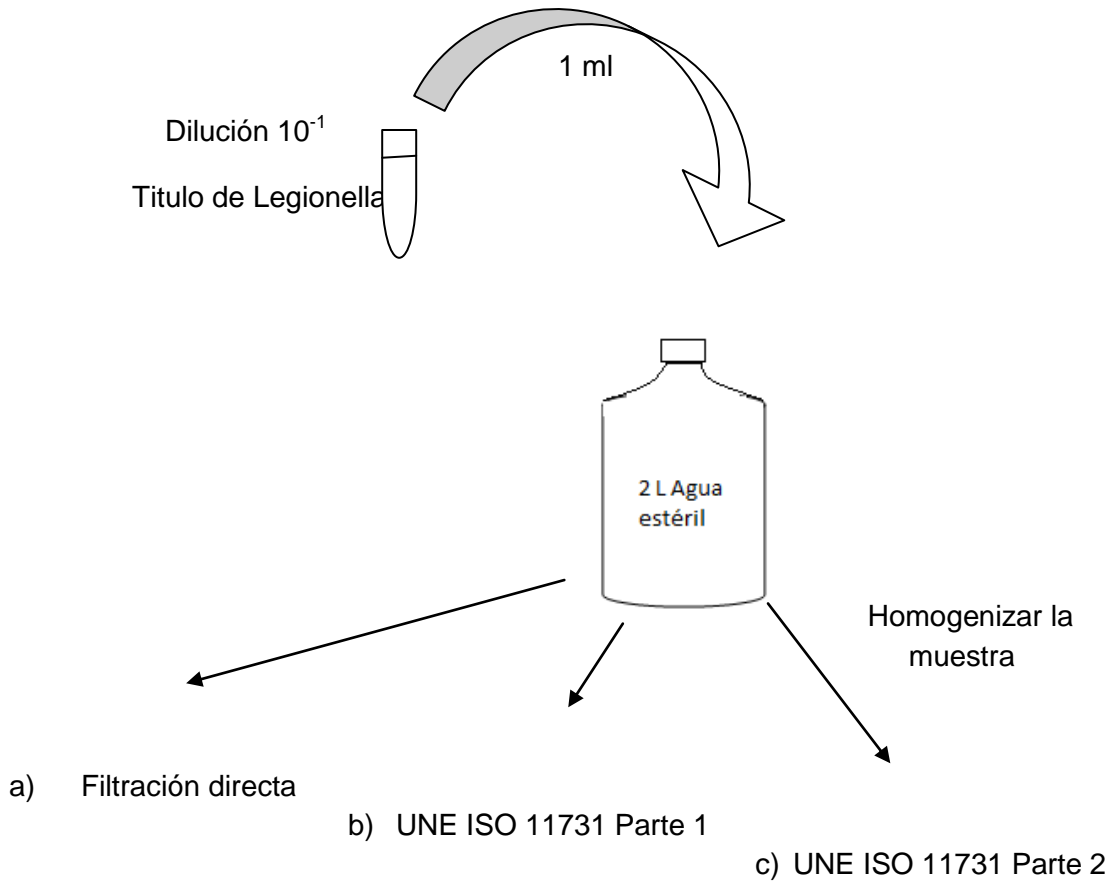


Figura 4. Obtención de muestras a analizar

a) Filtración directa sobre filtros de celulosa.

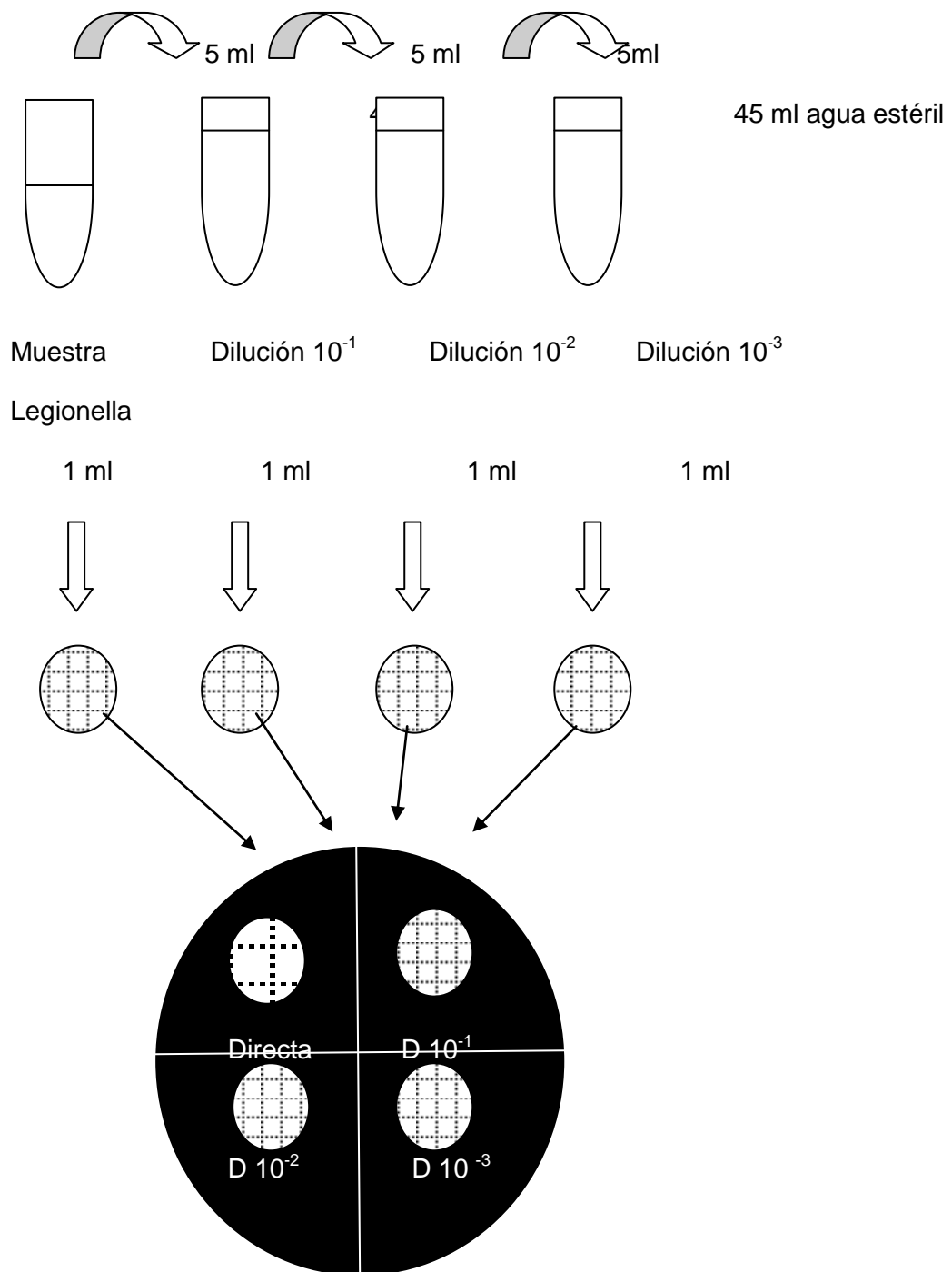
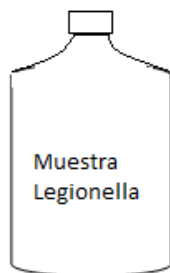


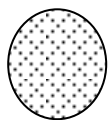
Figura 5. Filtración directa para obtener el recuento total de u.f.c

Los filtros se depositaron sobre medio BCYE. El proceso se realizó por triplicado por lo que se obtuvieron 3 replicas realizadas mediante filtración directa. Las diluciones en este caso se realizan como medida de seguridad para obtener un número de colonias contables

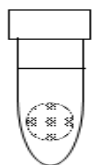
b) UNE ISO 11731 parte 1: Muestras con alta densidad de bacterias.



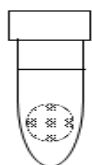
↓
Filtrar 500 ml en filtro de policarbonato



↓
Lavar en 10 ml de agua estéril mediante Vortex durante 2 minutos.



↓
Añadir 4 ml de agua estéril y lavar mediante Vortex durante 1 minuto



↓
Recoger el volumen de lavado

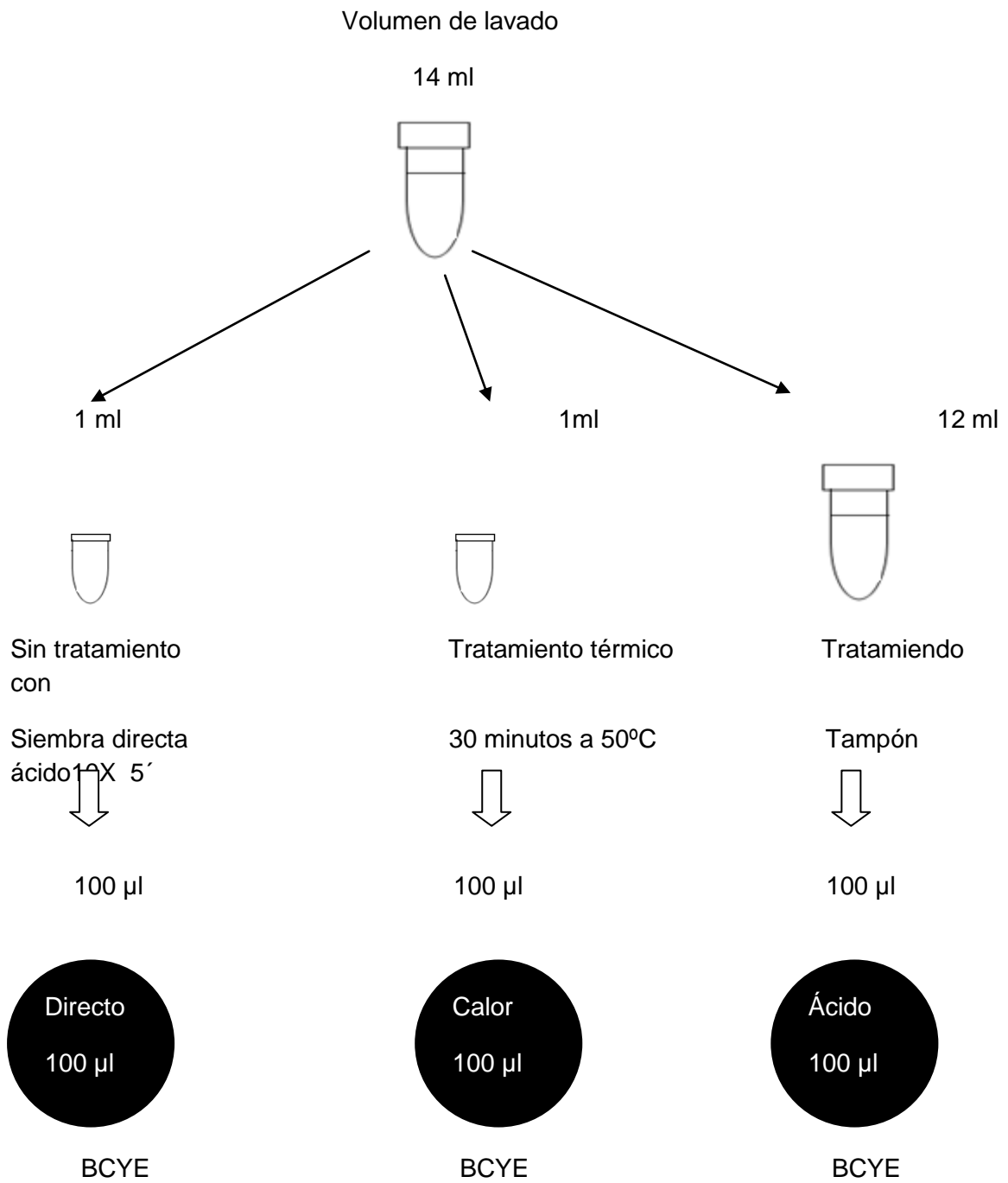


Figura 6. Tratamientos de la parte 1 de la norma UNE- ISO 11731

c) UNE-ISO 11731 parte 2: muestras con baja densidad de bacterias. (Tratamiento IN SITU)

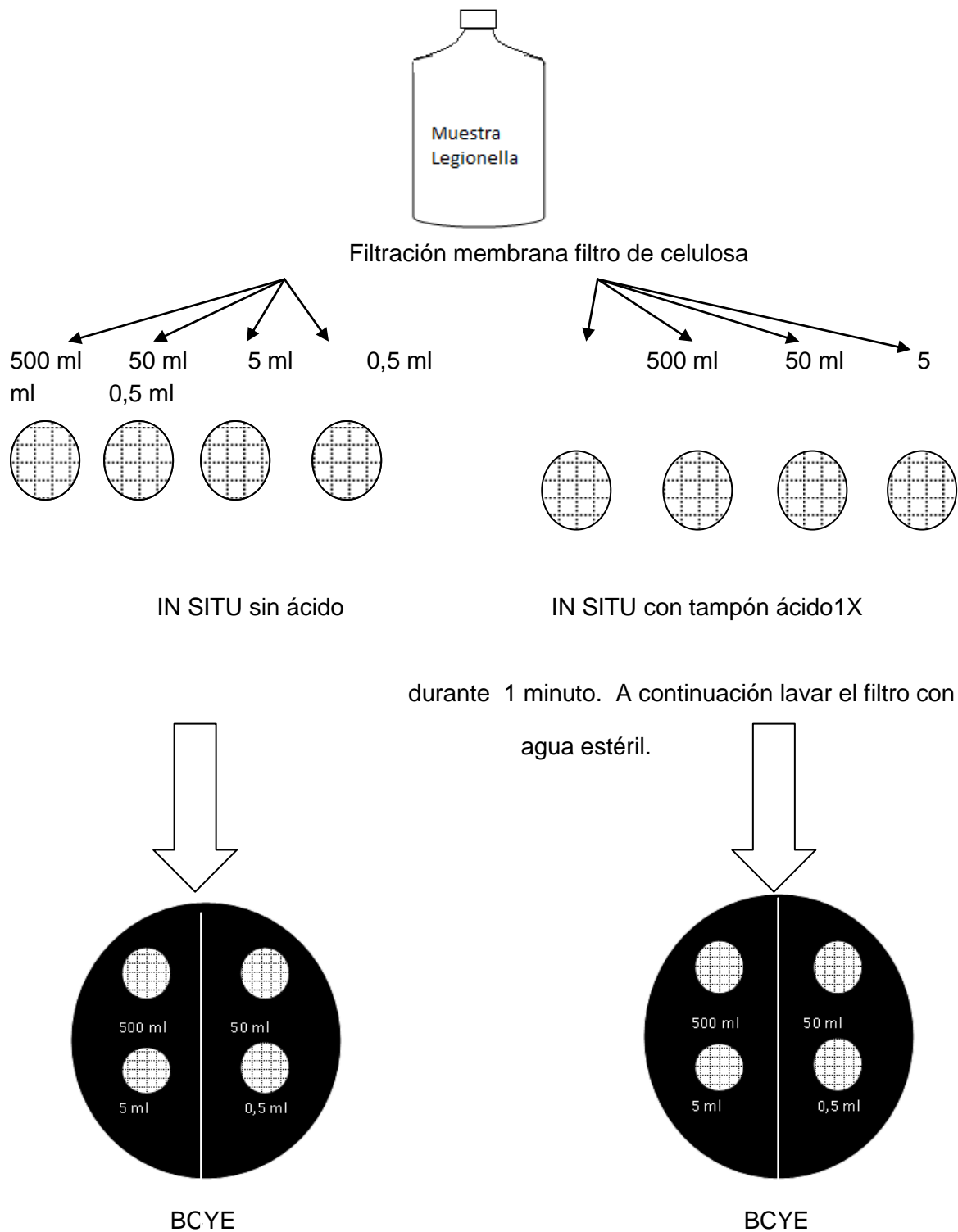


Figura 7. Tratamiento In situ (parte 2 de la norma UNE-ISO 11731)

(*)Se utiliza como doble control de crecimiento, ya que solo está sometido a la filtración de membrana. Sirve para ver la pérdida que supone el paso de filtración de membrana,

pero es conveniente resaltar que este método no está descrito en la norma UNE-ISO 11731.

3.3.6.3 Incubación

Diariamente se obtuvieron 9 placas de BCYE de los distintos tratamientos. Una vez inoculadas, se dejaron en reposo hasta que todo el inóculo hubiese sido absorbido, a continuación se invierten y se incuban a 37°C durante 10 días. El crecimiento de Legionella es muy lento, por eso es conveniente observar las placas cada dos días para seguir asegurarse que hay crecimiento.

3.3.7 Resultados

Después de la incubación, las colonias de morfología característica que se forman en el medio selectivo se consideran presunta Legionella. Las colonias son normalmente blancas o amarillas con apariencia de vidrio esmerilado como se muestra en la siguiente imagen. Con muy pocas excepciones, el crecimiento no tiene lugar en ausencia de L-cisteína.



Figura 8. Colonias de Legionella en BCYE

A continuación se muestran los resultados obtenidos de 25 muestras analizadas mediante los tratamientos de reducción de microbiota expuestos anteriormente.

Tabla 2: Recuentos mediante filtración directa

Filtración Directa		
Muestra	Recuento (ufc)	Log
1	7,9E+04	4,90
2	5,2E+04	4,72
3	1,6E+04	4,20
4	1,7E+05	5,23
5	2,37E+05	5,37
6	8,13E+05	5,91
7	3,05E+04	4,48
8	4,13E+05	5,62
9	3,40E+05	5,53
10	1,40E+05	5,15
11	2,06E+05	5,31
12	3,10E+05	5,49
13	2,70E+05	5,43
14	3,05E+05	5,48
15	2,70E+05	5,43
16	3,10E+05	5,49
17	3,35E+05	5,53
18	3,06E+05	5,49
19	3,39E+05	5,53
20	3,05E+05	5,48
21	2,70E+05	5,43
22	3,70E+05	5,57
23	3,10E+05	5,49
24	3,35E+05	5,53
25	3,06E+05	5,49

*Unidades= Log ufc/L

Los recuentos en la filtración directa nos dan la cantidad de bacterias que teníamos en un principio en la muestra inoculada con el título de Legionella. Se han obtenido recuentos de 10^4 u.f.c en cuatro muestras y en el resto 10^5 u.f.c son lo suficientemente elevados como para someterlos a un tratamiento de reducción de microbiota.

Tabla 3: Recuentos y pérdidas de Legionella mediante UNE-ISO 11731 parte 1 para las muestras más contaminadas.

UNE ISO 11731 parte 1						
Muestra	Directo		Ácido 10X		Térmico	
	Recuento	Pérdida	Recuento	Pérdida	Recuento	Pérdida
1	3,49	1,41	2,79	2,11	0	4,90
2	4,42	0,30	3,1	1,62	0	4,72
3	3,79	0,41	3,27	0,93	0	4,20
4	2,27	2,95	2,01	3,21	0	5,23
5	4,42	0,95	4,32	1,05	0	5,37
6	3,9	1,01	3,85	1,06	0	5,91
7	3,89	0,59	3,77	0,71	0	4,48
8	5,27	0,33	5,05	0,55	0	5,62
9	5,32	0,21	5,3	0,23	0	5,53
10	5,11	0,05	5,03	0,13	0	5,15
11	5,13	0,18	4,92	0,39	3,7	1,61
12	5	0,49	4,93	0,56	2,74	2,75
13	5,21	0,19	5,19	0,21	2,74	2,66
14	5,52	-0,04	5,32	0,16	4,14	1,34
15	5,34	0,1	4,99	0,45	3,59	1,85
16	5,33	0,16	5,2	0,29	2,92	2,57
17	5,5	0,03	5,45	0,07	3,29	2,23
18	4,9	0,59	4,62	0,87	0	5,49
19	4,4	1,13	3,81	1,72	0	5,53
20	5,52	-0,04	5,32	0,16	4,14	1,34
21	5,34	0,1	4,99	0,45	3,59	1,85
22	5,17	0,4	5,05	0,52	0	5,57
23	5,33	0,16	5,2	0,29	2,92	2,57
24	5,5	0,03	5,45	0,07	3,29	2,23
25	4,9	0,59	4,62	0,87	0	5,49

La pérdida de biomasa está calculada en función del crecimiento resultante en la filtración directa.

De los 3 tratamientos expuestos en la UNE-ISO 11731 parte 1 para las muestras con altas densidad bacteriana el tratamiento térmico es el más agresivo con la biomasa de bacterias presentes en la muestra, llegando a ser cero en 14 muestras.

La recuperación con el tratamiento ácido 10X y el tratamiento directo se asemejan siendo siempre superior a la que se consigue con el tratamiento térmico.

Tabla 4: Recuento y pérdida de Legionella mediante UNE-ISO 11731 parte 2 para las muestras con baja densidad de bacterias.

UNE-ISO 11731 parte 2				
	IN SITU Ácido 1X		IN SITU Sin ácido	
Muestra	Recuento	Pérdida	Recuento	Pérdida
1	4,23	0,67	4,53	0,37
2	3,78	0,94	4,56	0,16
3	1,48	2,72	4,2	0,00
4	3,18	2,04	5,9	-0,68
5	2,53	2,84	5,4	-0,03
6	1,95	2,96	4,6	0,31
7	3,98	0,50	4,25	0,23
8	5,6	0,02	5,9	-0,3
9	3,25	2,28	5,6	-0,07
10	3,14	2,02	5,76	-0,6
11	4,53	0,78	5,38	-0,07
12	2,53	2,96	5,04	0,45
13	1,14	4,26	5,33	0,07
14	5,39	0,09	5,62	0,14
15	4,91	0,53	5,41	0,3
16	5,23	0,26	4,13	1,36
17	4,48	0,69	5,5	0,03
18	3,38	2,11	5,45	0,04
19	4,25	1,28	5,55	-0,02
20	5,39	0,09	5,62	0,14
21	4,91	0,53	5,41	0,3
22	4,14	1,43	5,5	0,07
23	5,23	0,26	4,13	1,36
24	4,48	0,69	5,5	0,03
25	3,38	2,11	5,45	0,04

En este caso la recuperación que se observa en el tratamiento ácido 1X es menor que el que se obtiene con el tratamiento ácido 10X, puede ser debido a que el tratamiento con el ácido 1X se hace directamente sobre el filtro, lo que da lugar a un mayor contacto con los microorganismos retenidos en el filtro. Respecto al tratamiento IN SITU sin ácido, los resultados de colonias recuperadas se asemejan a la filtración directa ya que es el mismo procedimiento, e incluso, en algunos casos, se consigue mayor crecimiento que justifica los resultados negativos al compararlo con la filtración directa.

En el siguiente gráfico se muestra la media y desviación típica de cada tratamiento de reducción de microbiota.

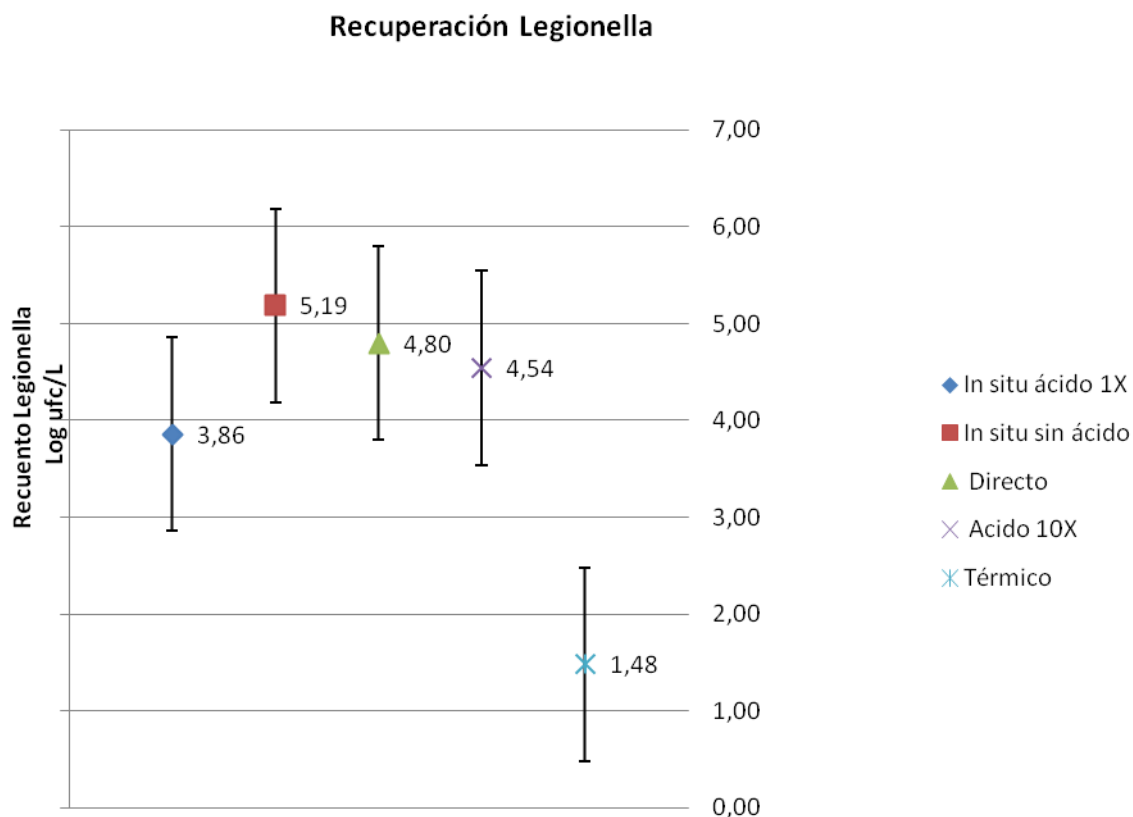


Figura 13. Recuperación de Legionella según los distintos tratamientos

Las muestras obtenidas con el tratamiento térmico han generado una menor recuperación que las de los demás tratamientos. A simple vista se puede observar que el tratamiento térmico resulta más agresivo de la parte 2 de la norma UNE- ISO 11731.

La recuperación obtenida con el ácido 10X se asemeja a la obtenida con el tratamiento directo, siendo solo de una 1 unidad de crecimiento logarítmico comparándola con el recuento inicial.

3.3.8 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos hemos llegado a siguientes conclusiones:

- El tratamiento térmico de la norma UNE-ISO 11731 resulta es más agresivo en la eliminación de microbiota acompañante en las muestras con alta densidad de

bacterias. Por lo que puede disminuir la presencia de Legionella en la muestra a analizar.

- El tratamiento ácido 10X evaluado ofrece una mayor recuperación que el tratamiento térmico, obteniéndose resultados semejantes mediante el tratamiento directo.
- Respecto al tratamiento IN SITU con ácido 1X la recuperación disminuye respecto al tratamiento con ácido 10X, aún siendo este último a una mayor concentración. El tratamiento con el ácido 1X resulta más inmediato, ya que se realiza directamente sobre el filtro y puede actuar de forma más incisiva sobre los microorganismos.
- La variación en los recuentos que se muestran en la desviación típica, puede ser debido a las dificultades de encontrar el estado fisiológico idóneo de la bacteria. El mejor estado es en el que la bacteria expresa su metabolismo y con ello su resistencia a las agresiones del ambiente, en este caso los tratamientos. Si el estado de la alícuota se encuentra en su mayoría en la fase de crecimiento, su resistencia será menor por lo que la recuperación obtenida puede ser más pequeña.

4. Valoración del aprendizaje

El periodo de prácticas realizadas ha sido una formación complementaria y esencial para completar la formación adquirida en la parte teórica del máster.

El trato en el departamento de microbiología y en general en la empresa ha sido el adecuado para la integración en el equipo de trabajo.

La ampliación en conocimientos de técnicas analíticas y su desarrollo ha sido hilo conductor de las prácticas, y a término personal me han resultado muy productivas en relación a mi experiencia previa con microorganismos.

Solamente, citar que me hubiera gustado desarrollar técnicas más específicas de identificación a nivel molecular, como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), RT-PCR o secuenciación de fragmentos de DNA. Debido a falta de tiempo y complicaciones en los análisis de la evaluación resultó imposible desarrollar estas actividades.

5. Bibliografía

Las referencias consultadas han sido:

- Real Decreto 865-2003 sobre la prevención y control de la Legionelosis
- Norma UNE ISO 11731 sobre el aislamiento de Legionella en muestras de agua
- Relación entre el coste, calidad y precio del análisis de Legionella. Miriam Monedero Boado. Universidad de Catalunya.
- Análisis de Legionella. Fundamentos de las técnicas analíticas y aplicación al control rutinario. David Tomás Fornes. Ainia.