



ADAPTares

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para
a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia

Procedimiento de trabajo

Aislamiento y recuento de *Clostridium perfringens* (incluidas las esporas) en aguas residuales y depuradas mediante filtración por membrana (Directiva Europea 12767/97; RD 140/2003)
Objetivo 2 - Actividade 2.2

Autor: Néstor Abreu

Revisado por: Gilberto Martel y Vanessa Millán

Parceiro: ITC

Fecha: octubre de 2020

Versión: 1





INDICE

1. OBJETO	2
2. ALCANCE	2
3. REFERENCIAS	2
4. DEFINICIONES	2
5. FUNDAMENTO.....	3
5.1. Filtración por membrana	3
5.2. Confirmación	3
6. MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS.....	3
6.1. Reactivos.....	3
6.2. Soluciones.....	4
6.3. Medios de cultivos.....	5
7. EQUIPAMIENTO Y MATERIAL FUNGIBLE	6
8. PROCEDIMIENTO	7
8.1. Preparación de la muestra	7
8.2. Filtración e incubación.....	8
8.3. Recuento y confirmación.....	9
8.4 Prueba de la fosfatasa ácida.....	9
9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS	9
10. OBSERVACIONES.....	10



1. OBJETO

El objetivo de este procedimiento es establecer un plan de trabajo para el aislamiento y recuento de *Clostridium perfringens* (CP) en aguas depuradas cuando el ensayo se realiza según el siguiente método.

2. ALCANCE

Este procedimiento se establece para la y aislamiento enumeración de *Clostridium perfringens* en aguas depuradas según la técnica de filtración por membrana.

3. REFERENCIAS

- Bisson JW, Cabelli VJ. 1979. Membrane Filter Enumeration Method for *Clostridium perfringens*. Appl. Environm. Microbiol., 37:1:55-68.
- European Council (1998) Directive 98/83/EC of Council of 3rd of November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Off. J. Eur. Commun., L330:32-54.
- Harmon SM, Kautter DA, Peeler JT. 1971. Comparison of media for the enumeration of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 21:922-927.
- Real Decreto 140/2003 donde se establecen los criterios sanitarios de calidad del agua de consumo humano. Directiva Europea 98/83/CE.
- Sancho Valls J, Badrís Nacente. 2001. Handbook of Microbiological Culture Media. Scharlau, Ed. nº 11., pp. 599.

4. DEFINICIONES

Clostridia: Microorganismos anaerobios sulfito-reductores que forman esporas y pertenecen a la familia Bacillaceae y al género *Clostridium*.

***Clostridium perfringens*:** Bacteria anaerobia, sulfito reductora, formadora de esporas, con forma de bastón y Gram-positiva. Las esporas de *C. perfringens* son muy resistentes a las condiciones ambientales adversas, además de que las formas vegetativas aparentemente no se multiplican en ambientes acuáticos, al contrario de otros indicadores.



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



Filtración por membrana (MF): Técnica por la que se hace pasar una muestra de agua problema a través de un filtro de membrana microporosa, en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Se utilizan membranas que suelen tener un tamaño de poro de 0,45 micras ya que la mayoría de los microorganismos tienen un tamaño superior (diámetro).

5. FUNDAMENTO

5.1. Filtración por membrana

El recuento de *C. perfringens* mediante filtración por membrana se basa en la filtración de un volumen determinado de agua, o dilución de la misma, a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro capaz de retener estas bacterias (0,45µm). El filtro se coloca sobre el medio selectivo (agar TSC) y se incuba en atmósfera anaeróbica según las especificaciones del medio.

5.2. Confirmación

Las colonias con características típicas de *C. perfringens* se siembran en agar sangre, que después de la incubación en anaerobiosis son sometidas al test de la fosfatasa ácida. Se consideran positivas si las colonias sospechosas toman un color que varía de rojo oscuro a rojo marrón.

6. MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS

6.1. Reactivos

1. Cloruro sódico (NaCl) (CAS 7647-14-5) (Scharlab Ref. SO022710500 o similar).
2. Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O) (CAS nº 10034-99-8) (Scharlab Ref. MA00850500 o similar).
3. Cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂·2H₂O) (CAS nº 10035-04-8) (Scharlab Ref. CA01940500 o similar).



4. Hidrógeno fosfato de disódio (Na_2HPO_4) (CAS nº 7558-79-4) (Scharlab Ref. SO03370500 o similar).
5. Dihidrógenofosfato de potasio (KH_2PO_4) (CAS nº 7778-77-0) (Scharlab Ref. PO02600500).
6. Sobres generadores de atmósfera anaeróbica Anaerocult A para la incubación específica de microorganismos anaerófilos (Merck 1.113829.0001 o similar).
7. Agua destilada tipo II.
8. Alcohol para quemar.
9. Reactivo de la fosfatasa ácida (Scharlab Ref. 0000TN1519)

a. Componente 1 (Buffer acetato de sodio) (10 ml):

Reactivo	Cantidad
Acetato sódico	0,04 g
Ácido acético	0,03 ml
Agua destilada	10 ml

b. Componente 2 (Colorante) (0,09 g):

Reactivo	Cantidad
Sal disódica de 1-naftilfosfato	0,03 g
Fast Blue B salt	0,06 g

6.2. Soluciones

1. Solución salina de Page.

Reactivo	Cantidad
Cloruro sódico	0,120 g



Sulfato de magnesio heptahidratado	0,004 g
Cloruro de calcio hidratado	0,004 g
Hidrógeno fosfato de disodio	0,142 g
Dihidrógenofosfato de potasio	0,136 g
Agua destilada	1000 ml

Para una preparación más precisa, se recomienda preparar un volumen de 10 l. de la solución y repartirlo en volúmenes más pequeños, según se requiera y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

6.3. Medios de cultivos

1. Agar Triptosa Sulfito Cicloserina (TSC) (Scharlab Ref. 01-578-500 o similar) al que se le debe añadir el suplemento selectivo de D-cicloserina (Scharlab Ref. 06-116LYO01 o similar).

Medio sólido para la enumeración y aislamiento de *Clostridium perfringens* en aguas.

Reactivo	Cantidad
Triptona	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
m-bisulfito sódico	1,0 g
Citrato férrico amónico	1,0 g
D-Cicloserina	400 mg



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



MAC 2014-2020
Cooperação Territorial

Interreg 
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

Agua destilada	Hasta 1000 ml
----------------	---------------

Se disuelve el liofilizado, en agua destilada según las recomendaciones del fabricante, se lleva a ebullición y se ajusta el pH a $7,6 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Una vez enfriado el medio a unos 50°C se añade el suplemento selectivo de forma aséptica y se homogeniza sin producir demasiadas burbujas. En un ambiente aséptico se vierte el medio fundido a razón de 10 ml en placas de Petri de 55 mm de diámetro, y se deja solidificar sobre una superficie nivelada. Una vez que el medio haya solidificado, las placas se pueden conservarse hasta dos semanas a $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

2. Agar Columbia sangre: (Scharlab Ref. 064-PA0004 o similar).

Medio muy rico en nutrientes, adecuado para el aislamiento de microorganismos patógenos en muestras diversas. Este medio se utiliza en su formato de placas preparadas, ya que su preparación en el laboratorio es delicada por la adicción de sangre. Las placas preparadas tienen una caducidad de 2,5 meses almacenadas entre $2-14^\circ\text{C}$.

7. EQUIPAMIENTO Y MATERIAL FUNGIBLE

1. Autoclave, capaz de mantener una temperatura de $121 \pm 3^\circ\text{C}$.
2. Balanza de precisión (0,001 g).
3. Baño de agua termostatzado capaz de mantener una temperatura de $60 \pm 2^\circ\text{C}$.
4. Equipo de filtración por membrana conforme a la Norma ISO 8199 (rampa de filtración de 3 puestos más bomba de vacío).
5. Embudos de filtración estériles desechables de 100 ml (se pueden reutilizar una vez autoclavados. Soportan varios ciclos de autoclave).
6. Filtros de membrana estériles, de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño nominal de poro y cuadrículadas.
7. Soplete de laboratorio.
8. Placas de Petri de 55 mm con agar TSC.
9. Estufa microbiológica, capaz de mantener una temperatura de $44 \pm 1^\circ\text{C}$.
10. Agitador vórtex.
11. pHmetro.
12. Refrigerador.
13. Pinzas de laboratorio de punta plana para la manipulación de los filtros de membrana.
14. Vaso de vidrio de unos 50 ml de capacidad con alcohol para quemar.



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



15. Jarra de anaerobiosis de 2,5 l. para 12 placas Petri de 90 mm (Merck Ref. 1.16387.0001 o similar).
16. Cesta para jarra de anaerobiosis para 12 placas (Merck Ref. 1.07040.0001).
17. Pipeta automática de 1000 μ l.
18. Pipeta automática de 5000 μ l.
19. Tubos de ensayo estériles de vidrio borosilicato de 13 ml con tapón.
20. Papel de filtro cualitativo.
21. Gradillas para tubos de 13 ml.
22. Mechero de gas butano o de alcohol.
23. Guantes desechables de varias tallas (S, M,L, XL).
24. Puntas estériles para pipeta automática 2-200 μ l.
25. Puntas estériles para pipeta automática 100-1000 μ l.
26. Material de vidrio para la preparación del medio de cultivo.
27. Tubos de 1,5 ml tipo Eppendorf.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación de la muestra

El volumen de agua a filtrar dependerá de la concentración bacteriana de la muestra, de tal manera que se ha de procurar filtrar la cantidad adecuada, para que el número de colonias que crezcan en el filtro quede en el intervalo recomendado para el cálculo final, que no deben ser inferiores a 20 y superior a 60 colonias típicas. En la mayoría de los casos deben prepararse diluciones en Solución Salina de Page (SSP) estéril.

1. Se preparan 3 tubos con 9 ml de SSP estéril.
2. Se añade al primer tubo 1 ml de la muestra a analizar previamente homogeneizada (dilución 1/10 o 10^{-1}), se agita en vórtex, y con una punta de pipeta nueva se toma 1 ml de esta dilución y se añade al segundo tubo con 9 ml de SSP estéril (dilución 1/100 o 10^{-2}).
3. Se agita en vórtex, y con una nueva punta se toma 1 ml de esta dilución y se añade al tercer tubo de SSP estéril (dilución 1/1000 o 10^{-3}).
4. Realizar la misma operación tantas veces como diluciones se requiera en función de la carga bacteriana estimada de la muestra. En la última dilución que se prepare, se agita en vórtex y con una nueva punta se toma 1 ml y se descarta.



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



MAC 2014-2020
Cooperação Territorial



Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



8.2. Filtración e incubación

El equipo de filtración debe estar instalado con excepción del embudo. Tanto el embudo como el soporte de filtración deben estar estériles. Se debe trabajar cerca de una fuente de calor (mechero de gas o alcohol), para crear un flujo de aire ascendente y evitar contaminaciones accidentales. Al conectar la bomba comprobar que proporciona suficiente vacío, si no sucede esto, comprobar que las llaves estén cerradas y que las conexiones no presenten fugas. Las pinzas deben estar en un lugar accesible y se deben mantener en un vaso pequeño con las puntas sumergidas en alcohol de quemar o similar.

1. Esterilizar el soporte de filtración con un soplete.
2. Con la ayuda de las pinzas previamente flameadas, colocar el filtro de membrana (0,45 μm de diámetro de poro) en el soporte de filtración, procurando que quede bien centrada y con la cuadrícula hacia arriba.
3. Colocar el embudo de filtración (100 ml) sobre el soporte con la membrana.
4. Se homogeneiza la muestra y según el volumen de agua a filtrar se pueden considerar los siguientes casos:
 - a) Si el volumen a filtrar es superior a 50 ml se puede filtrar directamente de una sola vez.
 - b) Si el volumen de agua a filtrar está entre 1 y 50 ml se introducen previamente en el embudo unos 20 ml de SPS estéril y a continuación se añade la muestra o dilución.
 - c) No se deben filtrar volúmenes de agua inferior a 1 ml. Cuando esto suceda se debe diluir la muestra como se comentó en el apartado 8.1 y hacer la filtración con el volumen de dilución igual o superior a 1 ml.
 - d) Sea cual sea el volumen utilizado, hacer el análisis por duplicado para realizar la media durante la fase de recuento y confirmación.
5. Se aplica vacío para realizar la filtración.
6. Lavar con SPS estéril (~30 ml), para arrastrar las partículas que puedan haber quedado, y volver a filtrar.
7. Retirar el embudo de filtración y, con ayuda de las pinzas, flameadas previamente y enfriadas, se retira la membrana del soporte y se coloca con la cuadrícula hacia arriba sobre una placa de Petri con agar TSC. Es importante asegurarse que no quedan burbujas de aire entre el medio y la membrana, ya que impedirían el crecimiento bacteriano.
8. Se tapan las placas y se colocan en posición invertida en una jarra de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis, siguiendo las indicaciones del fabricante.
9. Se incuba en estufa a $44\pm 1^\circ\text{C}$ durante 21 ± 3 h. (Esta temperatura debería controlarse diariamente conservando dentro de la estufa un termómetro sumergido en un frasco con agua).
10. El análisis se debe realizar por duplicado. Realizar dos filtraciones por muestra o dilución, obteniéndose como resultado final la media de los recuentos de las colonias que han crecido en las dos placas.



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



8.3. Recuento y confirmación

1. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las placas se retiran de la estufa, se sacan de la jarra de anaerobiosis y se realiza el recuento de las colonias sospechosas que presenten color negro. El recuento se debe hacer dentro de los 30 minutos siguientes de haber sacado las placas de la estufa.
2. Diez colonias sospechosas se siembran en agar Columbia con sangre y se incuban a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 31 ± 3 h. en anaerobiosis (Jarra con sobre generador de anaerobiosis).
3. Transcurrido el tiempo de incubación las colonias se transfirieren a papel de filtro para su confirmación mediante la prueba de la fosfatasa ácida.

8.4 Prueba de la fosfatasa ácida

1. Pipetear 1,5 ml del componente 1 en el vial del componente 2 con el reactivo de color y dejar reposar 1 min.
2. Mezclar usando vórtex hasta alcanzar una mezcla homogénea.
3. Proteger el vial de la luz y mantenerlo entre $2-8^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora.
4. Centrifugar el vial a 6000 rpm durante 10 min.
5. Transferir 750 μl del sobrenadante a un vial tipo Eppendorf (reactivo de la fosfatasa ácida).
6. Para detectar la fosfatasa ácida, colocar 2-3 gotas del reactivo sobre papel de filtro y frotar una colonia sospechosa. Si hay una reacción positiva, la colonia cambiará de color después de 3-4 minutos, adquiriendo un color que varía de rojo oscuro a rojo marrón.

9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Los resultados se expresan en forma de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por 100 ml.
2. En el caso de haber filtrado 1 ml de una dilución, el número medio de colonias contadas en las placas de la dilución adecuada se multiplica por dicha dilución y a continuación por 100 para obtener UFC/100 ml.
3. En el caso de haber filtrado 1 ml de muestra directamente, el número medio de colonias contadas se multiplica por 100 para obtener UFC/100 ml (no recomendable).
4. En el caso de haber filtrado 10 ml de muestra directamente, el número medio de colonias contadas se multiplica por 10 para obtener UFC/100 ml.
5. En el caso de haber filtrado 100 ml de muestra directamente, el número medio de colonias contadas será el número de UFC/100 ml.



10.OBSERVACIONES



Tinción de Gram de un cultivo de *Clostridium perfringens*



Clostridium perfringens en TSC agar