



*Tema 7. Análisis microbiológico:
Método de filtración por membrana*

Filtración por membrana

- Se basa en el crecimiento, la identificación y el recuento de las colonias de los microorganismos retenidos en la superficie de un filtro, a través del cual se ha filtrado un volumen conocido de muestra de agua. Incubada en un medio de cultivo durante un tiempo y a una temperatura adecuadas.
- Se ha convertido en el método más común y preferido para evaluar las características microbiológicas del agua.

Principio básico del método

- En esencia, el método consiste en:
 - Pasar una muestra de agua a través de un filtro de membrana (0,45 μ tamaño de poro y 47 mm de diámetro).
 - Transferir el filtro con las bacterias atrapadas a la superficie de un medio sólido (con agar) o a un soporte absorbente, conteniendo el medio líquido deseado (sin agar).
 - El uso del medio apropiado permite la detección rápida de los CT, CF y EF.

Ventajas de la filtración por membrana

- Las ventajas de usar la filtración a través de membranas para evaluar la calidad microbiológica del agua, son:
 - Buena reproducibilidad.
 - Con frecuencia se obtienen resultados en un solo paso.
 - Los filtros pueden intercambiarse entre medios diferentes.
 - Pueden procesarse grandes volúmenes de agua, para aumentar la sensibilidad del ensayo.
 - Ahorro de tiempo considerable.
 - Posibilidad de realizar la filtración *in situ*.
 - El coste es bajo en comparación con el método NMP.

Inconvenientes de la filtración por membrana

- Los inconvenientes son:
 - El agua con mucha turbidez puede limitar el volumen de las muestras.
 - Poblaciones numerosas de bacterias ocasionan una formación excesiva de colonias, incontables.
 - Los metales y los fenoles pueden adsorberse en los filtros e inhibir el crecimiento.

Volumen de agua a filtrar

- Los volúmenes iniciales de agua recomendados para su filtración directa son: 100, 25 (20) y 5 ml.
- También se recomiendan los intervalos de colonias que se pueden contar sobre un filtro que son los de la tabla siguiente:

Microorganismo indicador	Número de colonias	
	mínimo	máximo
Coliformes totales	20	80
Coliformes fecales	20	60
Estreptococos fecales	20	100

Cuando se tenga que filtrar volúmenes inferiores a 1 ml, se recomienda diluir la muestra original y filtrar, a continuación, un volumen superior a 1 ml. La tabla muestra los factores de proporcionalidad para la dilución progresiva de una muestra inicial de agua, en función del tipo de microorganismo analizado

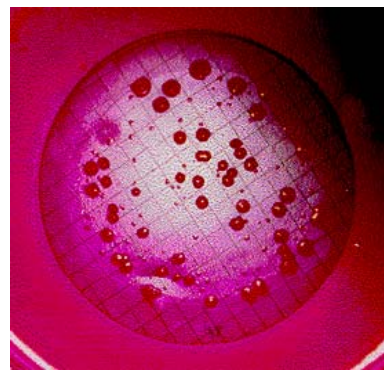
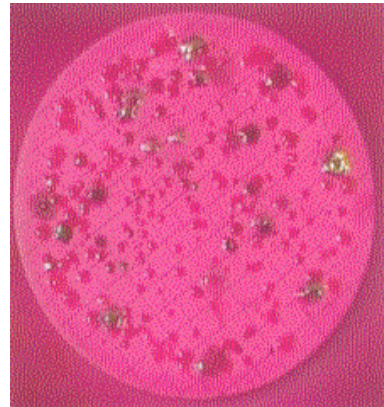
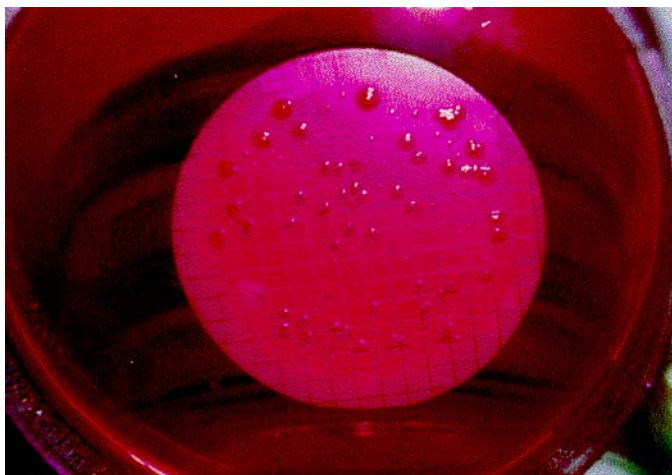
Microorganismo	Factor de proporcionalidad
Coliformes totales	4
Coliformes fecales	3
Estreptococos fecales	5

Pautas de la filtración



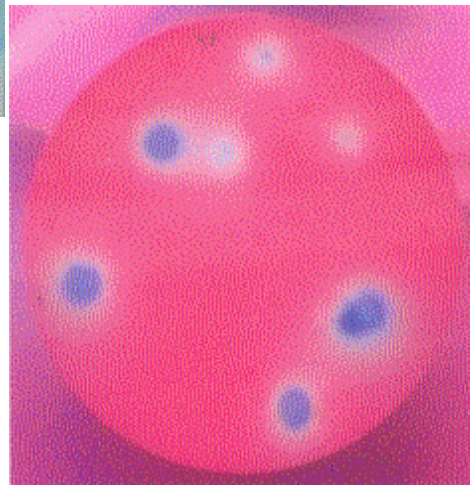
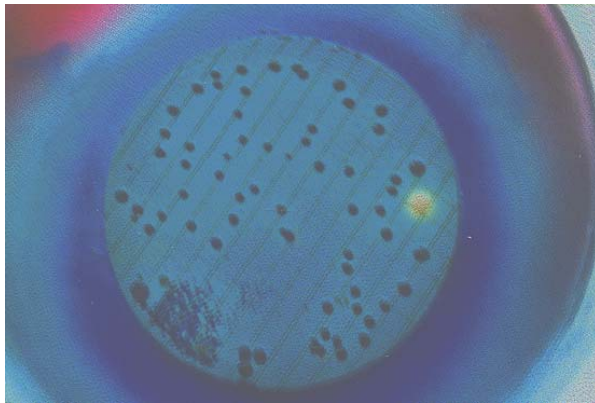
Coliformes totales

Medio de cultivo	Temperatura	Duración Horas	Identificación de colonias
Agar Chapman TTC	$37 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$	24	<i>Klebsiella</i> : color rojo ladrillo o naranja. <i>Enterobacter</i> : color rojo ladrillo o amarillo con centro naranja. <i>Escherichia</i> i <i>Citrobacter</i> : color amarillo con centro naranja. Todas estas colonias forman un halo amarillo en el agar subyacente.
M-Endo . Caldo o agar	$37 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$	22-24	Color rosa a rojo oscuro con brillantez metálica, a menudo de aspecto verdoso. Volumen variable. La brillantez metálica puede cubrir completamente la colonia o concentrarse en el centro.



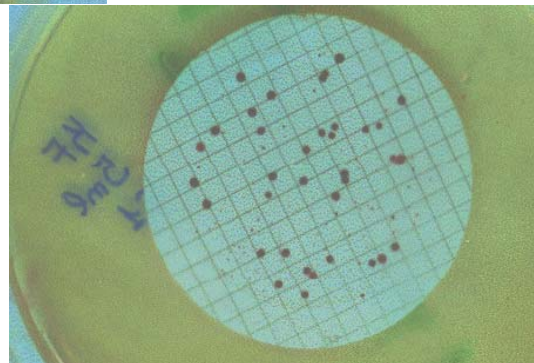
Coliformes fecales

Medio de cultivo	Temperatura	Duración Horas	Identificación de colonias
Agar Chapman	44,5 ± 0,2 °C	24	<i>Escherichia coli</i> : color amarillo con centro anaranjado y halo amarillo.
M-FC	44,5 ± 0,2 °C	22-24	<i>Coliformes fecales</i> : color azul característico.



Streptococcus fecales

Medio de cultivo	Temperatura	Duración Horas	Identificación de colonias
KF- <i>Streptococcus</i> agar	37 ± 0,5 °C	48	<ol style="list-style-type: none">1. Color: rosa pálido a rojo oscuro con bordes rosados.2. Tamaño: 0,5-2,0 mm de diámetro.3. Cada colonia es considerada como un estreptococo fecal, aunque estos organismos existen normalmente en cadenas de dos o más miembros.



Cálculo de la concentración

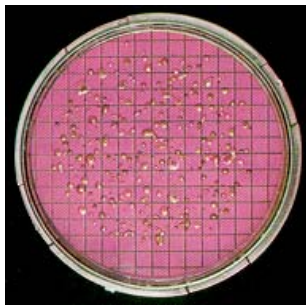
Se obtiene usando la fórmula:

$$N^{\circ} \mu\text{O}/100 \text{ ml} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias}}{\text{Volumen muestra original filtrada}} \times 100$$

Se debe calcular, a partir de las diluciones realizadas y el volumen de agua filtrada, el volumen de la muestra original de agua (V_{mo}).

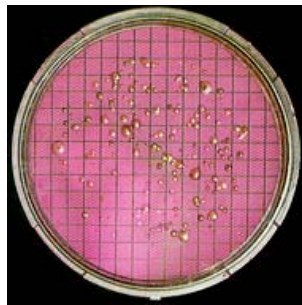
- Ejemplo: 10 ml de agua original se diluyeron con 140 ml de agua tamponada (dilución: 10/150). 25 ml de esta dilución se diluyen con 80 ml de agua tamponada (dilución 25/105). De esta última dilución se usaron 40 ml en la filtración.
- Luego, $V_{mo} = (10/150) \times (25/105) \times 40 = 0,635 \text{ ml}$.

Identificación de problemas



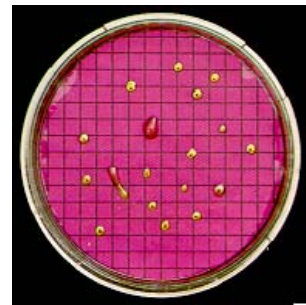
Demasiada contaminación bacteriana de fondo.

Causa: Condiciones de filtración no estériles o insuficiente dilución de una muestra que contenía bacterias no coliformes. El número total de bacterias no debe exceder de 200 para evitar que interfieran en el crecimiento de los coliformes.



Zona seca en la cual no se ha producido crecimiento.

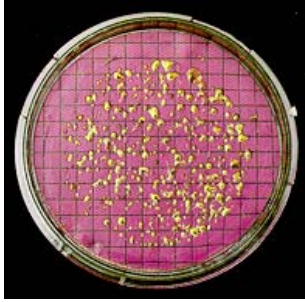
Causa: El filtro no descansaba sobre la superficie del medio de cultivo. También se puede deber a una lim-pieza insuficiente de la base del portafiltro.



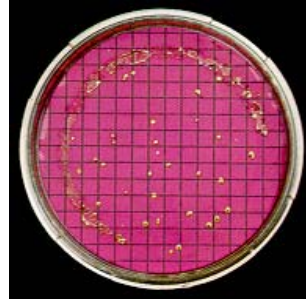
Colonias ocluidas o alargadas.

Causa: Presencia de fibras en la muestra de agua. El crecimiento de la colonia se produce a lo largo de la fibra.

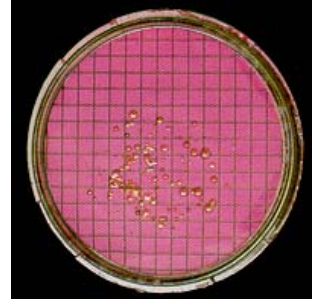
Identificación de problemas



Demasiadas colonias con aspecto de coliformes, incontables.
Causa. Insuficiente dilución de la muestra.



Crecimiento a lo largo del borde de cierre del filtro.
Causa: El portafiltros no hace buen cierre o no está bien limpio.



Distribución de colonias no uniforme.
Causa. Pipetear una muestra pequeña directamente sobre el filtro seco; no agitar la muestra durante la filtración; no lavar el embudo después de la filtración.