

# Validación del método de recuento de microorganismos aerobios en aguas a 22°C y a 36°C según la norma ISO 6222:1999

Chávez Rodríguez, Jorge (1,\*), Herrera Rodríguez, M<sup>a</sup> Begoña (2), Martínez Pozo, David (1)

(1) Laboratorios Innoagral, Polígono P.I.S.A. Mairena del Aljarafe. Sevilla

(2) Área de Fisiología Vegetal. Dpto. de Fisiología, Anatomía y Biología Celular. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla

## Introducción

El principal objetivo de las empresas de calidad es estandarizar métodos utilizados en los laboratorios analíticos siguiendo las directrices de la Organización Internacional de Estandarización (ISO) (1).

Teniendo en cuenta que el agua es la fuente principal de vida en el planeta, es realmente importante estimar la cantidad de microorganismos que contiene para asegurar su calidad, sobre todo en aguas de consumo humano (2).

## Objetivo

El principal objetivo de este estudio es la validación de un método utilizado para la cuantificación de bacterias aerobias mesófilas en diferentes tipos de agua a 22°C y a 36°C, utilizando la técnica descrita en la norma ISO 6222:1999 (3). Esta consiste en el recuento de colonias en el medio agar de extracto de levadura (YEA) para detectar cambios en la población microbiana del agua.

## Métodos

En el proceso de validación es necesario analizar diferentes tipos de agua: agua de consumo humano, aguas continentales, como aguas de piscinas o torres de refrigeración, y agua destilada estéril. Las muestras pueden ser inoculadas, añadiendo algunas bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus subtilis* a una concentración conocida, obtenidas a partir de muestras liofilizadas. Sin embargo, parte de las muestras no deben ser inoculadas para que sea posible estudiar sus propios microorganismos y comparar así los resultados de las muestras inoculadas y no inoculadas. A continuación, se realizan diluciones seriadas de las muestras con una solución de peptona a una concentración de 10 g/L y se siembran en placas de Petri de 90 mm con YEA mediante la técnica *pour plate* descrita en la norma ISO 8199:2018 (4). Una vez se ha solidificado el medio YEA con la muestra ya sembrada, se incuban las placas a 22°C durante 68 ± 4 horas y a 36°C durante 44 ± 4 horas (Figura 1, izquierda).

En paralelo, se debe llevar a cabo la titulación de los cultivos de trabajo utilizados para asegurar su estabilidad en el crecimiento durante todo el proceso. Para ello se siembra por triplicado cada una de las cepa utilizadas en la inoculación. Se deben incubar a las mismas condiciones de trabajo que el ensayo, es decir, 3 placas a 22°C y otras 3 placas a 36°C durante 68 ± 4 horas y 44 ± 4 horas respectivamente (Figura 1, derecha).

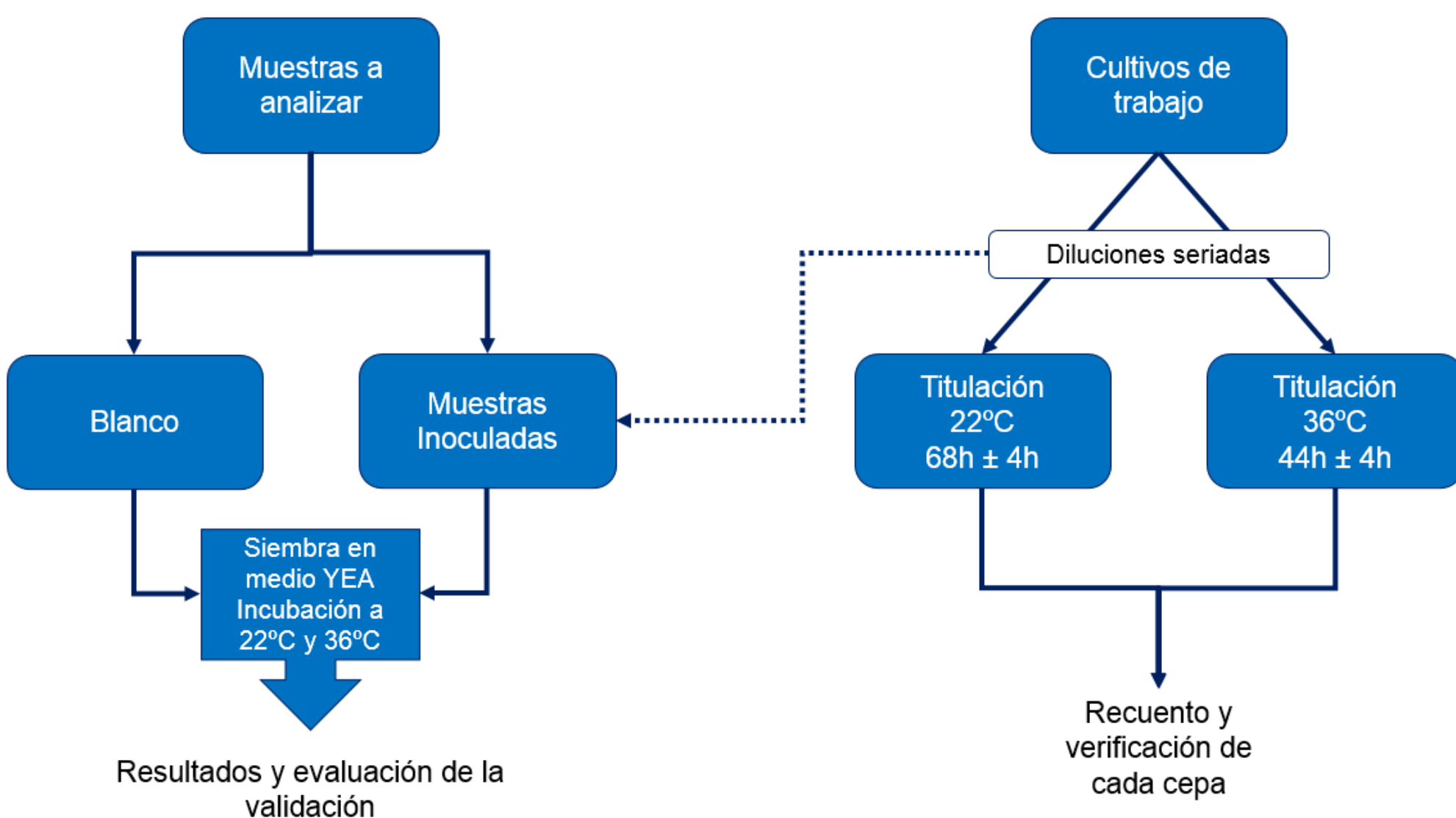


Figura 1. Esquema del procedimiento llevado a cabo para el estudio de las muestras (izquierda) y para la titulación de las cepas utilizadas (derecha).

A partir de la titulación se calcula el valor de referencia, y junto con los resultados obtenidos durante el proceso, se puede evaluar la exactitud en los ensayos. Para esta evaluación debemos conocer el logaritmo del valor de referencia además de los límites establecidos por el laboratorio en la validación. La exactitud se expresa como el porcentaje de recuperación. Por otro lado, se lleva a cabo el estudio de la precisión de los ensayos realizados. Se calcula mediante la obtención de la diferencia de los resultados del analista 1 y del analista 2. Esta diferencia debe ser menor al valor de la incertidumbre calculada en la validación (5).

## Resultados

En el caso de este estudio, todas las muestras analizadas presentaban un porcentaje de recuperación entre los límites establecidos.

Teniendo en cuenta el criterio de precisión, las muestras analizadas también lo cumplen, por lo que se puede confirmar la fiabilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio para el recuento de microorganismos aerobios a 22°C y 36°C en aguas como estipula la norma ISO 6222:1999. En la Tabla 1 se pueden observar los resultados obtenidos de algunas de las muestras utilizadas.

Muestras (36°C)	RECUPERACIÓN							PRECISIÓN		
	A1 (ufc/ml)	A2 (ufc/ml)	Log A1	Log A2	Valor Referencia	Log Valor Referencia	Evaluación (Recuperación)	Criterio	Resultado	Precisión
Agua consumo	1,70E+02	2,10E+02	2,22	2,33	2,40E+02	2,38	Cumple	0,2	0,109	Cumple
Agua continental	7,20E+04	6,70E+04	4,86	4,83	9,70E+04	4,99	Cumple	0,2	0,028	Cumple
Agua destilada estéril	8,60E+01	9,70E+01	1,93	1,98	1,00E+02	2,00	Cumple	0,2	0,05	Cumple

Muestras (22°C)	RECUPERACIÓN							PRECISIÓN		
	A1 (ufc/ml)	A2 (ufc/ml)	Log A1	Log A2	Valor Referencia	Log Valor Referencia	Evaluación (Recuperación)	Criterio	Resultado	Precisión
Agua consumo	1,5E+02	1,7E+02	2,16	2,23	2,2E+02	2,34	Cumple	0,2	0,070	Cumple
Agua continental	6,1E+04	5,0E+04	4,78	4,70	8,7E+04	4,94	Cumple	0,2	0,087	Cumple
Agua destilada estéril	8,5E+01	9,9E+01	1,93	1,99	1,0E+02	2,00	Cumple	0,2	0,067	Cumple

Tabla 1. Resultados a 22°C y 36°C de muestras representativas de cada tipo de agua

## Conclusión

Los resultados obtenidos confirman que la validación del proceso de recuento de microorganismos aerobios en aguas a 22°C y 36°C se está llevando a cabo correctamente siguiendo las directrices de la norma ISO 6222:1999. Se deben realizar verificaciones mensuales para que el laboratorio pueda acreditar este proceso por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC).

## Referencias

- ISO - International Organization for Standardization. <https://www.iso.org/home.html>.
- Cabral, J.P.S. (2010) Int J Environ Res Public Health, 7(10), 3657-3703.
- UNE-EN ISO 6222:1999. Water quality - Enumeration of culturable micro-organisms - Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
- UNE-EN ISO 8199:2018. Water quality - General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.
- Camaró-Sala ML, et al. (2014). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enferm Infecc Microbiol Clin.