

## 2

# Microbiología de agua. Conceptos básicos

*María C. Apella<sup>1,2</sup> y Paula Z. Araujo<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup>Centro de Referencia para Lactobacilos y Universidad Nacional de Tucumán. Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, Tucumán CP 4000 Argentina; <sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; <sup>3</sup>Unidad de Actividad Química, Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica. Avenida General Paz 1499. 1650 San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

### 1. Introducción

El agua, alimento esencial para los animales incluido el hombre, frecuentemente actúa como vehículo de transmisión de microorganismos entéricos. La materia fecal puede accidentalmente alcanzar una fuente de abastecimiento, siendo la forma más común el ingreso a través de los sistemas de pozo ciego a napas profundas.

El Código Alimentario Argentino (CAA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus Guías para la calidad del agua potable, la Directiva 98/83/CE<sup>1</sup> y otras normas internacionales, establecen o recomiendan requisitos de calidad para el agua de consumo humano. En general, la normativa establece que el agua es apta bacteriológicamente para consumo si se encuentra exenta de microorganismos patógenos de origen entérico y parasitario intestinal. Ellos transmiten enfermedades tales como salmonelosis (*Salmonella*), shigelosis (*Shigella*), colera (*Vibrio Cholerae*), amebiasis (*Entamoeba histolytica*), alteraciones gastrointestinales (*Aeromonas mesófilas*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*); giardiasis (*Giardia lamblia*), criptosporidiosis (*Cryptosporidium*), esquistosomiasis (*Schistosoma*), desórdenes hepáticos (virus de hepatitis), etc.

La presencia de microorganismos patógenos en el agua de bebida es un riesgo que se incrementa en las áreas marginales de mayor densidad poblacional o en zonas sin disponibilidad de agua potable. La seguridad que un agua contaminada puede ser causal de enfermedades, ha conducido a la necesidad de controlar rutinariamente la calidad microbiológica de muestras de diversos orígenes.

Los controles rutinarios de la totalidad de los microorganismos hídricos, potencialmente riesgosos para la salud, resultan difíciles de llevar a cabo debido a la gran variedad de bacterias patógenas cultivables, a la complejidad de los ensayos de aislamientos y a la presencia en baja concentración de varias especies altamente agresivas, sin que el orden detallado indique prioridad. Por esta razón, los análisis bacteriológicos apuntan a la búsqueda de microorganismos indicadores de contaminación fecal y se centralizan en la

<sup>1</sup><http://www.ine.es/normativa/leyes/incinor.htm>

cuantificación de coliformes. Este grupo está integrado por enterobacterias, siendo *Escherichia coli* el indicador universal de contaminación fecal.

## 2. Introducción al Mundo Microbiano

Para estudiar la relación que existe entre calidad de agua y salud humana, es necesario introducir el concepto de *microbiología*, y a partir de ello valorar la presencia de organismos microscópicos en agua potable, los efectos de competencia y/o sinérgicos de las distintas especies y la posibilidad de aplicar tecnologías de desinfección.

La *microbiología* es una rama de la biología que estudia seres vivientes de tamaño microscópico que existen como células aisladas o asociadas y también incluye el estudio de virus (microscópicos no celulares). En general, los microorganismos a diferencia de los macroorganismos, son capaces de llevar a cabo procesos de crecimiento, generación de energía y reproducción, independientemente de otras células sean del mismo tipo o diferentes.

Las células estudiadas en microbiología pueden pertenecer a dos grandes grupos, eucariotas y procariotas. Las eucariotas constituyen la unidad estructural de protozoarios, hongos y algas cuyo tamaño las incluye en esta especialidad. Son organismos unicelulares o multicelulares que poseen en su interior estructuras limitadas por membranas llamadas organelas (núcleo, mitocondrias y cloroplastos presentes sólo en células capaces de realizar fotosíntesis).

Las células procariotas son las bacterias, cuya estructura interna es sencilla. Etimológicamente el término procariota significa ausencia de membrana nuclear. En la tabla 1 se indican algunas diferencias y similitudes entre ambas células.

**Tabla 1.**

		<b>Procariotas</b>	<b>Eucariotas</b>
Núcleo		No verdadero	Verdadero
	Cromosomas	Único y circular	Varios y lineales
	Membrana	No	Sí
División celular		Fisión binaria <sup>1</sup>	Mitosis <sup>2</sup> / Meiosis <sup>3</sup>
Organización del citoplasma	Mitocondrias	No	Sí
	Nucleolos	No	Sí
	Retículo Endoplasmático	No	Sí
	Aparato de Golgi	No	Sí
	Ribosomas	Tipo 70S	Tipo 80S
Pared celular		Sí (peptidoglicano y lipopolisacáridos)	Sí (celulosa o quitina en hongos)
Órganos de movilidad		Flagelos	Cilias y flagelos

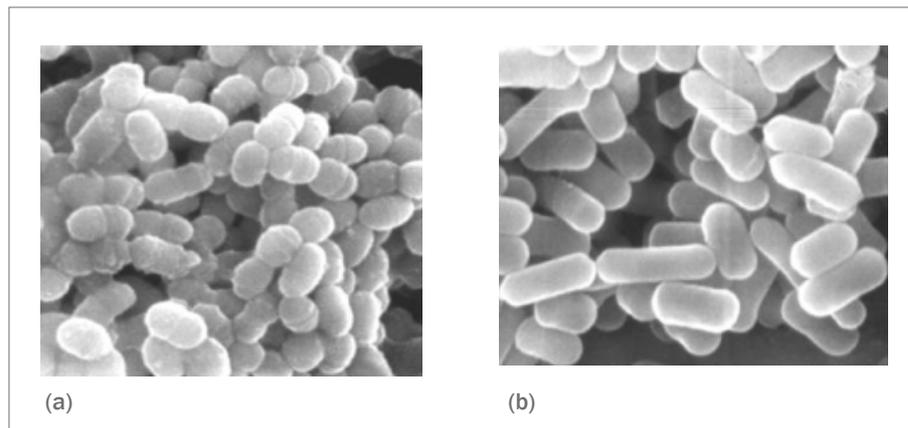
<sup>1</sup>Replicación del ADN y división de la célula en dos células idénticas; <sup>2</sup>división del núcleo; duplicación y distribución del ADN en las dos células hijas; <sup>3</sup>división celular que origina células con la mitad del número de cromosomas (haploides).

## 2.1. Morfología bacteriana

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, conocida también como bipartición. Su tamaño, por lo general es menor que el de una célula eucariota típica (por ej. *Escherichia coli*  $0,5 \times 2 \mu\text{m}$ ). Sin embargo, existe un amplio rango de tamaños según las especies que puede variar desde  $0,2 \mu\text{m}$  de diámetro como en el caso de los micoplasmas hasta  $40 \mu\text{m}$  como en la *Beggiatoa gigantea*.

La rigidez de la pared celular determina la morfología de una célula bacteriana. Los principales tipos de formas que presentan las bacterias son: esférica, bastón alargado o espiral (figura 1). Las bacterias de forma esférica se denominan *cocos* (redondeados, ovoides o elípticos); las de forma de bastón alargado se denominan *bacilos* (cilíndricos, fusiformes, etc.) y las de forma de bastón curvado se denominan *espirilos*. Aquellas bacterias cuya imagen proyectada sobre el plano tienen forma de coma, se llaman *vibrios*. Otras formas que pueden presentar las bacterias son filamentosa (ramificada o no), anillos y también estructuras con prolongaciones.

**Figura 1.** Microfotografías de cocos (a) y bacilos (b).



Si bien la mayoría de las bacterias mantienen su forma, algunas pueden presentar modificaciones y se las denomina *pleomórficas*. El pleomorfismo está relacionado a veces a la edad del cultivo y se manifiesta en bacterias sin pared celular (micoplasmas). Las *formas L* son bacterias que perdieron la pared celular por una situación de estrés (temperatura, presión osmótica, etc.) pero que son capaces de resintetizarla cuando el estrés cesa. Siendo la morfología una característica taxonómica, es importante determinar el fenómeno de pleomorfismo originado por las condiciones del cultivo, para evitar falsas identificaciones. Las células bacterianas, observadas al microscopio, pueden aparecer como células aisladas o agrupadas. Las agrupaciones de dos células de formas cocoides se denominan *diplococos*. El o los planos en los cuales tiene lugar la división celular, determina la disposición característica de especie. Así, si existe un solo plano de división se originan cadenas, por ej. *Streptococcus* (cocos en cadena). Cuando la bipartición tiene lugar en dos planos perpendiculares, se originan *tétradas*, por ej. *Pediococcus*. La división en tres o más planos ortogonales origina paquetes de 8 células o más, por ej. *Sarcina*. Finalmente si ocurre fisión binaria

en planos no perpendiculares se observa disposición de *racimos irregulares*, por ejemplo *Staphylococcus*. Los bacilos pueden presentar otras disposiciones: *en empalizada* (por giros de 180°), en forma de *letra V o L* (dos bacilos en posición angular) y varios bacilos que forman *letras chinas*.

El flagelo, una estructura celular procariota no constante, está involucrada en la motilidad bacteriana; es de naturaleza proteica (flagelina) y su composición química es diferente a la del flagelo de una célula eucariota (estructura microtubular). La disposición de los flagelos puede ser polar (localización en uno o ambos extremos de la bacteria) o peritrica (distribución alrededor de la superficie celular).

Algunos géneros de bacterias, entre ellos *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*, etc., tienen la capacidad de formar endosporas, que a diferencia de las esporas fúngicas, no son formas de reproducción sino estructuras de resistencia frente a agentes físicos y químicos. El fenómeno de esporulación bacteriana está codificado a nivel genético, y en presencia de glucosa los genes responsables se encuentran reprimidos.

Una técnica de coloración con valor taxonómico, es la *tinción diferencial de Gram* que permite dividir las bacterias en dos grandes grupos. La respuesta a los reactivos usados, que guarda estrecha relación con la ultraestructura de la pared celular (principalmente con el peptidoglicano o mureína) logra clasificarlas en Gram(+) (gruesa capa de peptidoglicano) y Gram(-) (fina capa de peptidoglicano con membrana externa de lipopolisacáridos).

## 2.2. Crecimiento microbiano

El *crecimiento celular* se define como el aumento ordenado de todos los componentes químicos que llevan a un incremento de los constituyentes y estructuras celulares.

Los *nutrientes*, a partir de los cuales los microorganismos sintetizan sus principales biomoléculas y obtienen su energía, están disueltos en agua, razón por la cual el crecimiento celular depende de la disponibilidad de agua.

Las distintas especies bacterianas tienen diferentes requerimientos nutricionales (a veces específicos) y condiciones fisicoquímicas que les permiten permanecer viables.

Los nutrientes requeridos en grandes cantidades son denominados *macronutrientes* mientras que los *micronutrientes* son necesarios en cantidades trazas. Entre los primeros se encuentran C, H, O, N (los más abundantes), P, S, K, Ca, Fe y Na, y entre los segundos podemos citar Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, W, V, Zn. Algunos organismos, además de los minerales, necesitan muy pequeñas cantidades de nutrientes de naturaleza orgánica llamados *factores de crecimiento*. Éstos son vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Los organismos que tienen tales requerimientos se denominan *auxótrofos* para diferenciarse de los *protótrofos* que son independientes de tales factores. Estos dos conceptos no son suficientes para caracterizar los distintos tipos de nutrición existentes en los microorganismos.

Dijimos que la nutrición es el proceso por el cual los seres vivos toman, del medio donde habitan, los nutrientes que necesitan para crecer. Estos nutrientes se requieren para dos fines: energéticos (reacciones de *mantenimiento*) y biosintéticos (reacciones plásticas o *anabolismo*).

Puesto que, como mencionamos, la nutrición presenta un aspecto de aprovisionamiento de energía y otro de suministro de materiales para la síntesis celular, podemos considerar dos “clasificaciones”. Desde el punto de vista de los fines del aprovisionamiento de energía, las bacterias se pueden dividir en *fotótrofas* cuando utilizan la luz como fuente de energía (algas y cianobacterias) y *quimiótrofas* si utilizan compuestos químicos como fuente de energía. Dentro de éstas, se encuentran las *quimiolitótrofas* que sólo requieren sustancias inorgánicas sencillas como  $H_2S$ ,  $S$ ,  $NH_3$ ,  $NO_2^-$ ,  $Fe^{2+}$ , etc. (*Nitrosomona*, *Nitrobacter*, *Gallionella*) y *quimiorganótrofas* que requieren compuestos orgánicos como hidratos de carbono, hidrocarburos, lípidos, proteínas, alcoholes, etc. (*Enterobacter*, la mayoría de las cultivadas en laboratorios).

Desde el punto de vista biosintético, las bacterias se pueden dividir en *autótrofas* que crecen sintetizando sus materiales a partir de sustancias inorgánicas sencillas. Usualmente el concepto de autotrofia se limita a la capacidad de utilizar el  $CO_2$  como fuente de carbono (*clorofitas*, *cianofitas*, *Thiobacillus denitrificans*, *Nitrobacter*, *Nitrosomona*). En el extremo opuesto se encuentran las *heterótrofas* cuya fuente de carbono es orgánica (*Lactobacillus*, *Serratia*, etc.). Existe una gama de situaciones intermedias con respecto a la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno. Por ejemplo, las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* utilizan compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de C, y  $NH_3$ ,  $N_2$ ,  $NO_2^-$  y  $NO_3^-$  como fuente de nitrógeno.

Como se mencionó en párrafos anteriores, el oxígeno es un macronutriente y los microorganismos se pueden dividir en cuatro grupos sobre la base del papel que juega el  $O_2$  en su nutrición. Las bacterias *aerobias* necesitan  $O_2$  para crecer; algunas de ellas requieren presiones de oxígeno inferiores a la atmosférica (2 a 10% de  $O_2$ , en lugar de 20%) y se conocen como *microaerófilas*. Las *anaerobias facultativas* pueden realizar metabolismo energético aerobio (respiración aerobia) o anaerobio (respiración anaerobia y fermentación), dependiendo del ambiente, la disponibilidad de oxígeno y la concentración de nutrientes (por ej. las enterobacterias como *E. coli*). Las bacterias *anaerobias estrictas* son aquellas para las cuales el oxígeno resulta tóxico (por ejemplo *Clostridium*). Las bacterias *anaerobias aerotolerantes* al igual que las anteriores, presentan un metabolismo energético anaerobio (fermentación), pero soportan el oxígeno debido a que poseen enzimas detoxificantes (por ej. *Streptococcus*).

El conocimiento de la nutrición microbiana permite el cultivo de los microorganismos en el laboratorio. En general, como se ha mencionado, todos los microorganismos tienen requerimientos de macro y micronutrientes semejantes, aunque la forma en que cada uno de ellos es captado y su cantidad relativa pueden variar mucho entre los diferentes géneros. En el laboratorio, el desarrollo de los microorganismos se realiza en *medios de cultivos* que son ambientes artificiales diseñados por el hombre para proporcionar todas las sustancias necesarias para el crecimiento microbiano.

Los medios de cultivo se clasifican en:

1) *Sintéticos o definidos*: Contienen concentraciones conocidas de sustancias químicas puras, de naturaleza orgánica y/o inorgánica. La composición de un medio sintético depende del microorganismo que se quiera cultivar; así un medio definido para una bacteria con gran capacidad biosintética será más simple que el de otra bacteria con menor posibilidad de biosíntesis.

2) *Complejos o indefinidos*: Están constituidos por ingredientes de alta calidad nutricional, pero de composición química desconocida ya que son el producto resultante de infusiones y extractos de sustancias naturales complejas. Se usan digeridos crudos de caseína (proteína de leche), hígado, levadura, carne, soja, sangre, etc. Sin embargo, con ellos no se tiene un control nutricional preciso.

Según la finalidad para la cual fueron formulados, los medios de cultivo se pueden clasificar en:

1) *Enriquecidos*: Son medios complejos o sintéticos con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (particularmente heterótrofos exigentes). Se adicionan al medio de cultivo sustancias nutritivas tales como azúcares, sangre, suero, extractos de tejidos de animales y plantas.

2) *Selectivos*: Son aquellos que permiten por su diseño el crecimiento específico de un determinado microorganismo o grupo de microorganismos e impiden mayoritariamente el desarrollo de los demás. Estos medios son de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos a partir de poblaciones microbianas mixtas. Se incorporan ciertas sustancias que otorgan la selectividad buscada al medio. Por ejemplo el agregado de lactosa, bilis, NaCl, azida, taurocolato, antibióticos, permite el desarrollo de un determinado grupo de microorganismos impidiendo el desarrollo de otros.

3) *Diferenciales*: Son aquellos que permiten distinguir a simple vista dos o más tipos de bacterias en función de su distinto comportamiento respecto de algún nutriente del medio. Ese comportamiento diferencial se traduce normalmente en un viraje de color de una sustancia indicadora presente en el medio. Poseen en su composición un reactivo o sustancia química que al combinarse con algún producto del metabolismo origina una coloración característica. Por ejemplo, el desarrollo de *E. coli* en medio Endo da colonias rojas ya que la fucsina decolorada con bisulfito de sodio al combinarse con los aldehídos provenientes del metabolismo bacteriano de lactosa, imprime coloración roja a la colonia.

4) *Selectivos-Diferenciales*: Representan una combinación de los dos últimos medios. Permiten el desarrollo de una bacteria o un tipo bacteriano y al mismo tiempo producen una coloración característica del organismo en estudio.

5) *Electivos*: Favorecen el desarrollo de una especie bacteriana y las restantes crecen poco y lentamente.

Cualquiera sea el tipo de medio, se pueden preparar para ser usados en estado líquido, sólido o semisólido.

Los medios de cultivo líquidos se conocen como *caldos* y a partir de ellos, por el agregado de un agente solidificante estable (agar), se preparan medios de consistencia sólida o semisólida, que se denominan medios *sólidos* o *agarizados*. El gelificante más usado es el agar-agar en una concentración de 1,5-2% y 0,7% para el *sólido* y *semisólido* respectivamente. Presenta la gran ventaja que una vez gelificado, no funde hasta cerca de los 100°C, lo que permite su uso para la mayoría de las bacterias y además son muy pocos los microorganismos que lo hidrolizan (agarolíticos) como ocurre con la gelatina.

Un medio de cultivo líquido generalmente se fracciona en tubos tapa rosca o en matraces cónicos con tapón de algodón y el desarrollo de los microorganismos se observa macroscópicamente por enturbiamiento del medio. Los medios sólidos se

disponen en cajas de Petri de vidrio o plástico con tapa, donde cada célula microbiana por divisiones sucesivas da origen a masas visibles denominadas *colonias*. Este hecho es el que permite cuantificar los microorganismos presentes en muestras, a partir de las cuales se realizan diluciones, siembras e incubaciones, basándose en la premisa que cada colonia se origina de una célula.

El medio de cultivo requiere una *esterilización*, inmediatamente después de su preparación, para eliminar los microorganismos contaminantes; esto se hace normalmente por calor húmedo a menos que en su composición, el medio contenga sustancias termolábiles. Su manipulación posterior, para mantener las condiciones de asepsia, requiere ciertas precauciones, por ejemplo trabajar en flujos laminares o cerca de llama de mecheros. La transferencia de un cultivo desde un recipiente a otro se lleva a cabo con pipeta estéril o con ansa o aguja previamente esterilizadas por incineración a la llama.

Los medios de cultivos agarizados son utilizados para el aislamiento microbiano a partir de muestras donde coexisten diferentes poblaciones, las que posteriormente se siembran en medios de cultivos líquidos adecuados para obtener un crecimiento máximo. Tanto en los medios artificiales de laboratorio como en el ambiente natural, la nutrición de la célula lleva inicialmente a un aumento de tamaño y peso que precede a la división celular. En la mayoría de los microorganismos, el crecimiento continúa hasta que la célula se divide en dos células hijas mediante el proceso de fisión binaria, el cual conduce al crecimiento de las poblaciones. Es difícil estudiar el crecimiento de la célula individual, especialmente en los microorganismos, debido a que los métodos analíticos no son lo suficientemente sensibles como para ser aplicados a estructuras tan pequeñas. Es por esto que habitualmente para evaluar el crecimiento se analiza el aumento de la población microbiana.

El crecimiento de una población tiene lugar en forma exponencial. Una célula se divide en dos células hijas y luego éstas se dividen a su vez en dos nuevas células, o sea que en cada período de división, la población se duplica por lo que la multiplicación corresponde a una progresión geométrica:  $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$ .

El intervalo de tiempo requerido para que una población se duplique se define como *tiempo de generación o tiempo de duplicación* y se representa con la letra *g*. No todas las bacterias tienen el mismo tiempo de generación. Para algunas, como *E. coli*, *g* es  $\sim 20$  min y para otras, como *Nitrosomona* y *Nitrobacter*, *g* es mucho mayor (5-10 h). El tiempo de generación depende de los nutrientes y de las condiciones fisicoquímicas del medio. A pesar que las bacterias son capaces de crecer en un amplio rango de condiciones ambientales y utilizar diversos nutrientes, el crecimiento máximo, para una dada especie, se lleva a cabo bajo condiciones óptimas de pH y temperatura.

El método más usado para determinar el tiempo de generación consiste en inocular el medio de cultivo apropiado con las células bajo estudio. Al cabo de determinados intervalos de tiempo, bajo condiciones óptimas, se toman muestras para el recuento de microorganismos.

Si se define a *g* como el cociente entre el tiempo transcurrido (*t*) y el número de divisiones (*n*) que ocurrieron en ese tiempo:

$$g = \frac{t}{n} \quad (1)$$

Teniendo en cuenta que luego de  $n$  divisiones, el número de células será:

$$x = 2^n x_0 \quad (2)$$

donde  $x$  es el número de células obtenidas en el tiempo  $t$  y  $x_0$  es el número de células iniciales.

De las ecuaciones (1) y (2), se puede calcular el tiempo de generación:

$$g = \log 2 \frac{t}{\left[ \log \frac{x}{x_0} \right]} \quad (3)$$

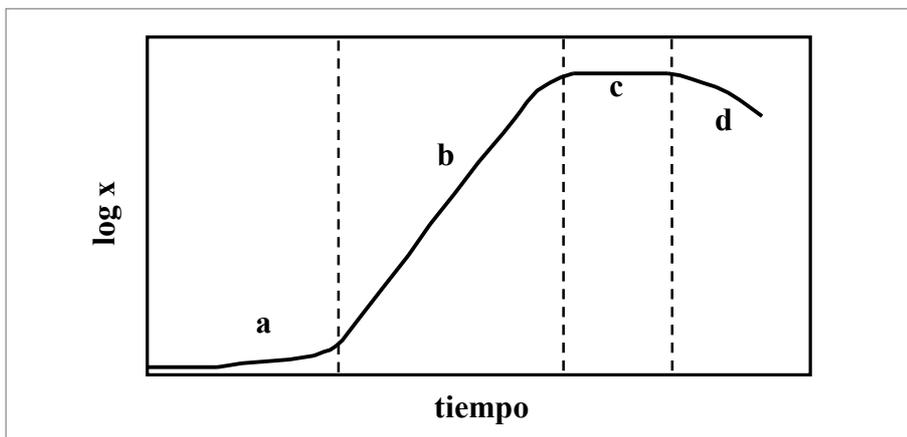
Otro parámetro que permite analizar el crecimiento exponencial es la *velocidad de crecimiento* que se representa con la letra  $k$  y se define como el número de generaciones que ocurren en un tiempo  $t$ :

$$k = \frac{n}{t} = g^{-1} = \frac{\left[ 3,3 \log \frac{x}{x_0} \right]}{t} \quad (4)$$

La velocidad de crecimiento  $k$  varía con la naturaleza y concentración de los nutrientes, pH, temperatura, fuerza iónica del medio, etc., además de factores genéticos.

El crecimiento de una población bacteriana durante un dado período de tiempo se representa gráficamente como el log del número de células en función del tiempo (figura 2).

**Figura 2.** Curva de crecimiento bacteriano.



En la figura 2 se distinguen cuatro fases: *fase de latencia o fase lag* (a); *fase exponencial o fase logarítmica* (b); *fase estacionaria* (c) y *fase de muerte* (d). Entre cada una de estas fases existe un período de transición que representa el tiempo requerido para que todas las células entren en una nueva fase.

Al inicio del crecimiento, los microorganismos requieren un período de adaptación al nuevo ambiente. Esta es la *fase de latencia* o *fase lag*. En ella, las células sintetizan enzimas involucradas en el metabolismo de los nutrientes disponibles, se incrementa la síntesis de macromoléculas como RNA y proteínas. Sin embargo, la síntesis de DNA permanece constante y las células no se dividen ( $k = 0$ ). La longitud de la fase lag depende del estado fisiológico y genético del microorganismo al ser introducido en el medio de crecimiento. Si las células provienen de un medio de cultivo diferente, o de un cultivo agotado (viejo) con acumulación de metabolitos tóxicos para las células, éstas requerirán mayor tiempo para reiniciar el crecimiento activo y presentarán una fase lag larga. En contraposición, si las células provienen de un medio idéntico y han sido obtenidas de un cultivo joven, la fase de latencia será corta o inexistente. Existen otros factores que pueden influir sobre la fase de latencia: cantidad de microorganismos sembrados (inóculo), daño que pudieron sufrir las células por la acción de radiaciones, calor, sustancias antimicrobianas, etc.

En la *fase logarítmica* o *fase exponencial*, las células se dividen regularmente según el tiempo de generación de cada especie. Por ejemplo, *E. coli* en un determinado medio de cultivo puede dividirse cada 20 min durante la fase exponencial, mientras que si el crecimiento se produce en un medio más pobre, la división puede suceder cada 30 min o más. En esta fase, y en condiciones apropiadas, la velocidad de crecimiento es constante y máxima, y de esta manera el valor de  $k$  para esta fase es el adecuado para estudiar el efecto de los factores ambientales, la utilización de distintos sustratos, etc. Durante esta fase, la población total es casi uniforme en lo que se refiere a composición química de las células, actividad metabólica y otros caracteres fisiológicos. Las células son viables y su tamaño constante.

Como consecuencia del agotamiento de nutrientes o la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, disminuye la velocidad de crecimiento hasta que llega a detenerse ( $k = 0$ ). En este punto, se dice que el cultivo está en *fase estacionaria*. La transición entre la fase log y estacionaria, implica una etapa de crecimiento desequilibrado (crecimiento no balanceado) durante el cual los componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. En consecuencia, las células en fase estacionaria tienen una composición química diferente a la de las células en fase exponencial. El número de células viables permanece constante, porque mientras algunas de ellas se dividen, otras mueren. Las células viables continúan produciendo ácidos y productos tóxicos. Algunas células muertas se lisan y liberan enzimas (proteasas, nucleasas y lipasas) que degradan las macromoléculas a moléculas más pequeñas, las que a su vez serán usadas por las células vivas. Esta fase puede extenderse desde horas hasta varios días dependiendo de la especie bacteriana.

Si la incubación del cultivo se prolonga varias horas después que la población ha alcanzado la fase estacionaria, las células alcanzarán la *fase de muerte* que se caracteriza porque  $k$  es constante, indicando que el número de células vivas decrece con el tiempo en progresión geométrica. La velocidad de muerte y la duración de esta fase varían en las distintas especies bacterianas. En ciertos casos, la muerte se acompaña de lisis celular que se manifiesta por una disminución del número de células viables y masa celular. Cuando no hay lisis, decrece el número de células viables mientras que la masa celular permanece constante.

La medición del crecimiento microbiano implica distinguir entre el número de células viables y el número de células totales. El segundo incluye células vivas y muertas, mientras el primero incluye sólo las células vivas. Para distinguir entre ambos tipos de células se utilizan métodos físicos y químicos. Frecuentemente pueden correlacionarse los datos obtenidos a partir de más de un método. Algunas de las técnicas empleadas se muestran en la tabla 2. A título informativo, se resumen dos de los métodos más empleados.

**Tabla 2.** Métodos empleados para determinar el crecimiento microbiano  
Determinación del Número de células

<b>Determinación del Número de células</b>	Vivas y Muertas	Recuento en cámara
		Recuento indirecto en portaobjetos
		Contador automático de partículas
		Nefelometría
<b>Determinación del Número de células</b>	Vivas	Recuento en medio sólido
		Filtración sobre membrana
<b>Determinación de la masa celular</b>	Directos	Determinación de peso seco
		Estimación de proteínas
	Indirectos	Turbidimetría
		Acumulación de metabolito
		Consumo de un nutriente

*Recuento en medio sólido:* El recuento de colonias es la forma más práctica para distinguir células viables y no viables en una suspensión bacteriana. Cada bacteria viable da lugar a la formación de una colonia después de la incubación en un medio agarizado apropiado. Se diluye la muestra, se toma un volumen determinado y se siembra en un medio agarizado contenido en cajas de Petri. Se incuba y una vez desarrollado el cultivo, se cuenta el número de colonias expresándose el resultado como UFC mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colonia por mL).

*Turbidimetría:* Las bacterias poseen un elevado índice de refracción que permite la dispersión de la luz que incide sobre ellas y el crecimiento queda determinado por el enturbiamiento originado en un medio líquido. Debido a los colores de los medios de cultivo, generalmente se usan longitudes de onda entre 490 y 660 nm. Esta técnica es de fácil ejecución y da resultados inmediatos, y se la conoce vulgarmente como método DO (densidad óptica).

El desarrollo de un microorganismo en un ambiente, sea éste su ambiente natural o un medio de cultivo de laboratorio, está determinado por los nutrientes disponibles y las condiciones físicoquímicas. Son muchos los factores físicoquímicos que pueden afectar el crecimiento microbiano, entre los cuales los más importantes son: temperatura, pH, biodisponibilidad de agua, presión osmótica, disponibilidad de O<sub>2</sub>, tensión superficial y radiaciones. Ellos modifican la velocidad de crecimiento de los microorganismos, provocando cambios que, a determinados valores de dichos factores

pueden llegar a ocasionar la detención del crecimiento e incluso su muerte. Ninguno de los factores ambientales actúa independientemente y un cambio en uno de ellos puede afectar la acción del otro. Así como los requerimientos nutricionales son diferentes para los distintos microorganismos, también lo son las condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo, así se explica la variada distribución de los mismos en la naturaleza. Conocer la respuesta de los microorganismos a su medio ambiente es importante para darles condiciones óptimas de desarrollo o, por el contrario, para inhibir su crecimiento. Es decir, permite ejercer un control del crecimiento microbiano.

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes por su amplia aplicación. Temperaturas extremadamente bajas y extremadamente elevadas, se utilizan de manera corriente para la conservación de microorganismos o para provocar su muerte respectivamente. La razón para ello es que a temperaturas extremadamente bajas, tanto la membrana plasmática como el citoplasma microbiano pierden fluidez disminuyendo o deteniendo completamente el transporte de nutrientes desde el medio externo y las reacciones enzimáticas propias del metabolismo que permitirían la utilización de estos nutrientes. Por el contrario, temperaturas demasiado elevadas, inactivan sistemas enzimáticos, desnaturalizan proteínas y dañan las envolturas celulares llevando a la lisis térmica. Existe, entre ambos extremos, un intervalo de temperatura de crecimiento en el cual un dado microorganismo es capaz de incorporar nutrientes del medio ambiente, conducirlos por los caminos catabólicos y anabólicos necesarios para el crecimiento y división celular, que da como resultado el crecimiento de una población. Dentro de este intervalo, se distingue una *temperatura óptima* en la que tanto el transporte como el metabolismo alcanzan la máxima velocidad en el ambiente en el que se encuentra el microorganismo. Los tres valores de temperatura, mínima, óptima y máxima, se conocen como temperaturas cardinales. En base a ellas podemos clasificar los microorganismos en grupos compuestos por organismos muy diferentes entre sí pero que presentan gran similitud en su comportamiento frente a la temperatura (tabla 3).

**Tabla 3.** Clasificación de los microorganismos según las temperaturas cardinales

Grupo	Temperatura / °C			Ejemplos
	Mínima	Óptima	Máxima	
<b>PSICRÓFILOS</b>				
<i>Obligados</i>	< 0	10-15	< 20	<i>Flavobacterium</i>
<i>Facultativos</i>	0 15-20	15-30 30-40	> 25 < 45	Bacterias de deterioro de alimentos refrigerados
<b>MESÓFILOS</b>				Mayoría de las bacterias
<b>TERMÓFILOS</b>				
<i>Facultativos</i>	35	42-45	> 50	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Estrictos</i>	45	50-75	> 80	<i>Thermoproteus</i>
<i>Extremos</i>	65	80-105	> 100	<i>Pyrolobus fumarii</i>

El efecto letal, de temperaturas superiores al *máximo* tolerado para el crecimiento, se determina calculando la *tasa de muerte térmica* o *punto de muerte térmica* que se define como la menor temperatura que mata a toda la población en 10 minutos.

Otro factor importante para el crecimiento microbiano es la concentración de iones hidrógeno. En general, los ambientes naturales tienen un pH comprendido entre 5 y 9, y la mayoría de los microorganismos crecen dentro de esos valores. Sin embargo, algunos pueden desarrollar a valores de pH inferiores o superiores a los indicados. De acuerdo al rango de pH en el que es posible su desarrollo, se los clasifica en tres grupos, como muestra la tabla 4.

**Tabla 4.** Clasificación de los microorganismos según el rango de pH de desarrollo

Tipos de microorganismos	Rango de pH	Ejemplos
ACIDÓFILOS	1-5,0	<i>Thiobacillus</i> (eubacterias) <i>Sulfolobus</i> (Archeas)
NEUTRÓFILOS	5,5-8,0	Mayoría de las bacterias
BASÓFILOS	8,5-11,5	<i>Bacillus alcalophilus</i>

Los valores de pH superiores e inferiores al rango que corresponde a un dado microorganismo son nocivos, ya que afectan la estabilidad de la membrana plasmática, inhiben enzimas, y alteran el transporte de solutos y la nutrición. Muchos nutrientes ingresan a las células atravesando la membrana plasmática por *transporte pasivo*, el que sólo puede llevarse a cabo si los nutrientes están en su forma *no ionizada*. El pH del ambiente puede tener un *efecto nocivo indirecto* sobre los microorganismos, produciendo ionización de algunos nutrientes e impidiendo su utilización.

Todos los microorganismos poseen mecanismos de regulación del pH citoplasmático que les permite mantener su valor constante. El mantenimiento de un pH constante en el citoplasma es muy importante para la supervivencia de los microorganismos ya que la acidificación o alcalinización del mismo lleva a la desnaturalización de componentes vitales de la célula (proteínas a pH bajo y ácidos nucleicos a pH elevado). Éste es el *efecto nocivo directo* del pH del ambiente.

Todos los microorganismos requieren agua para vivir; y la disponibilidad de agua se expresa como *actividad de agua* ( $a_w$ ). La actividad está dada por la presión de vapor de agua en el aire que se encuentra en equilibrio con una solución o sustancia, con relación a la presión de vapor del agua pura. Su valor varía de 0 a 1, siendo más alto cuánto más agua libre tiene el ambiente. En el ambiente en el que desarrollan los microorganismos, no toda el agua está disponible. La actividad de agua es alterada por dos efectos: el *osmótico* (interacción con solutos) y el *mátrico* (adsorción a superficies). Por ambos efectos, la disponibilidad de agua puede ser baja, y en ese caso, los microorganismos tienen dificultades para incorporar nutrientes, limitando esto su desarrollo. Según el rango de  $a_w$  al que crecen, los microorganismos se clasifican en: *normales* ( $a_w=1-0,95$ ) como *Streptococcus*, *osmotolerantes* ( $a_w=0,95-0,80$ ) como *Staphylococcus*, *osmófilos* ( $a_w=0,80-0,75$ ) y *osmófilos extremos* ( $a_w=0,75-0,63$ ). Los ambientes de alta osmolaridad contienen principalmente altas concentraciones

de cloruro de sodio o azúcares. Los microorganismos que toleran o requieren NaCl se pueden clasificar en *halotolerantes* (toleran elevadas concentraciones de ClNa pero no lo requieren, por ej. *Staphylococcus aureus*), *halófilos moderados* (suelen ser bacterias marinas que viven en concentraciones NaCl igual a 0,5 M y tienen requerimientos concretos de  $a_w$  equivalente a la de agua de mar, así como concentraciones determinadas de iones  $\text{Na}^+$ ), *halófilos extremos* o *hiperhalófilos* (por ej. *Halobacterium* y *Halococcus* que requieren concentraciones saturantes de sales, 4 a 7 M de NaCl).

La naturaleza de las paredes celulares favorece la ubicación de las bacterias en la superficie del líquido, para optimizar la energía superficial. En esas condiciones, la depleción local de nutrientes puede ocurrir rápidamente; se establecen gradientes pronunciados de nutrientes y de oxígeno, en direcciones opuestas. Para evitar estos efectos se utiliza, en los medios de cultivo, *tensoactivos* o *surfactantes* que reducen la tensión superficial y permiten el desarrollo de los microorganismos de manera uniforme en todo el medio. Al reducir la tensión superficial, el  $\text{O}_2$  difunde más fácilmente llegando hasta el fondo de los tubos con medio líquido. Los grumos o agregados que forman algunos microorganismos durante el crecimiento, también desaparecen con el uso de estos agentes, favoreciendo la nutrición. El surfactante más comúnmente usado es un detergente no-iónico, el Tween 80. En su molécula tiene un cuerpo carbonado (hidrofóbico) y una cabeza polar (hidrofilica) que recuerda a los fosfolípidos de membrana. Usados en concentración adecuada favorecen el desarrollo de los microorganismos, pero en exceso, producen daños en la membrana celular intercalándose entre los fosfolípidos.

Las radiaciones UV y las radiaciones de menor longitud de onda (ionizantes) tienen fuertes efectos sobre los sistemas biológicos, tanto mutacionales como letales. El efecto letal de estas radiaciones es dosis dependiente, relacionada con el tiempo de exposición y con las condiciones experimentales; además depende del estado del organismo (siendo más efectivas en fase exponencial que en fase lag o estacionaria) y de las condiciones ambientales durante la exposición (ver Capítulo 16).

### 3. Microorganismos Presentes en Aguas Naturales

La variabilidad microbiológica de las aguas naturales abarca numerosos organismos e incluye células eucariotas (algas, protozoarios y hongos), células procariotas (bacterias) y virus (microorganismos con capacidad de síntesis nula).

#### *Algas*

Estos microorganismos contienen necesariamente clorofila para la actividad fotosintética, sin embargo el color verde puede estar enmascarado por otros pigmentos (carotenoides) presentes. Son aerobias, y en ambientes con poco oxígeno, mueren, flotan y se descomponen produciendo mal olor. Podemos encontrar las siguientes familias de algas:

- *Chlorophyta* o algas verdes que huelen a pescado o hierba.
- *Cyanophyta* o algas verdes azuladas con olores desagradables que pueden producir sustancias tóxicas.
- *Chrysophyta* son de color amarillo verdoso y a menudo generan olores aromáticos (geranios) o huelen a pescado, por ej. *Aulococeira* y *Cyclotella*.

### **Protozoarios**

Frecuentemente en el agua contaminada con heces se encuentran dos protozoarios parásitos con incidencia en salud humana, responsables de epidemias:

- *Giardia lamblia*: es flagelado con un tamaño de 15  $\mu\text{m}$  y se transmite al hombre a través de agua contaminada con materia fecal. Las células del protozoario producen un estado de reposo denominado *quiste*. Los quistes al ser ingeridos germinan y causan *giardiasis*, enfermedad caracterizada por diarreas, calambres intestinales, flatulencia, náuseas, síntomas que pueden ser agudos o crónicos. La giardiasis es una de las enfermedades parasitarias de origen hídrico más comunes.

- *Cryptosporidium parvum*: es un parásito del hombre y animales de tamaño muy pequeño (2-5 $\mu\text{m}$ ), redondeado que crece en el interior de las células del epitelio mucoso de intestino y estómago. Los quistes infecciosos producidos por este protozoario poseen una pared muy gruesa. Los quistes de *Cryptosporidium* son mucho más resistentes a la cloración que los de *Giardia*. La *criptosporidiosis* es una infección que se caracteriza por dolores estomacales, náuseas, diarrea y deshidratación.

### **Virus**

El 87% de las enfermedades virales transmitidas por el agua son causadas por el virus de la hepatitis (adenovirus y rotavirus).

### **Bacterias**

Más del 80% de las bacterias descritas en el Manual de Bergey pueden aislarse del agua. Teniendo en cuenta la respuesta a la tinción de Gram, a continuación se mencionan y describen algunas de las más importantes.

#### *Bacterias Gram negativas*

Entre las especies que se han aislado de aguas, podemos mencionar a las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*.

Las *Pseudomonas* son las más comunes en napas freáticas debido a su versatilidad respecto a fuentes de carbono, y a sus bajos requerimientos nutricionales. Ellas son bacilos psicrófilos, presentan flagelos peritricos, producen pigmentos (verde, azul verdoso, rojo, marrón) y no forman esporas. La morfología y el hábitat de muchas *Pseudomonas* coincide con el de bacterias entéricas como *Escherichia coli* pero se diferencian en que no fermentan azúcares. Según el Manual de Bergey este grupo admite 7 especies, siendo *Pseudomonas aeruginosa* la de mayor relevancia sanitaria, es un patógeno oportunista por excelencia y el agente etiológico principal de infecciones en vías urinaria, intestino, oído y heridas. Por su relativa resistencia al cloro es considerada un indicador de eficiencia de la cloración. Su presencia en sistemas de almacenamiento, tanque, y cisternas, responde a un estado deficiente de dichas instalaciones. El control de *Pseudomonas*, al igual que el de bacterias aeróbicas, debe intensificarse en redes expuestas a contaminación o cuando se comprueba cloración deficiente.

*Flavobacterium* es un género ampliamente distribuido en aguas y suelos. No ha sido encontrado en sedimentos de acuíferos profundos pero sí en las aguas que se extraen de ellos. Por esta razón, se duda si las flavobacterias se encuentran naturalmente en un acuífero o simplemente colonizan el pozo luego de su perforación. Son bacilos que se caracterizan por falta de movilidad y producción de pigmentos de color amarillo.

Los bacilos del género *Gallionella* se caracterizan por ser quimiolitótrofas, obtienen energía por oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  y la precipitación usualmente de hidróxidos de (III), en o sobre las colonias, les otorga una coloración marrón característica. Ellas crecen en lugares donde existen mezclas de aguas aerobias y anaerobias, y donde abunda el ion  $\text{Fe}^{2+}$ . Así, en pozos donde existe una interfaz aero-anaeróbica, su desarrollo causa obstrucción por la precipitación de oxihidróxidos de hierro (III).

Las enterobacterias o *Enterobacteriaceae* son las más importantes dentro de los *anaeróbicos facultativos* y su presencia en agua está asociada a contaminación fecal. Este grupo de bacterias habita naturalmente el intestino de los animales. Son bacilos no esporulados, no móviles y si lo son es por flagelos de inserción peritrica, con requerimientos nutricionales relativamente simples. Generalmente se identifican por su capacidad para fermentar glucosa por vía glucolítica dando ácidos como producto final. *Escherichia coli*, habitante normal del intestino humano, es utilizada como indicador de contaminación fecal de aguas. Las cepas patógenas de *E. coli* causan infecciones del tracto intestinal (generalmente agudas y no presentan mayores complicaciones, excepto en niños y adultos con deficiencias nutricionales). Otros ejemplos de patógenos humanos de este grupo son *Shigella*, *Salmonella* y *Klebsiella*. *Shigella dysenteriae* es causante de la disentería bacilar, *Salmonella typhimurium* y *typhi* producen gastroenteritis y fiebre tifoidea respectivamente.

El grupo *Vibrio* está integrado por bacilos curvados, anaerobios facultativos, poseen flagelos polares aunque algunos son peritricos. Se diferencian de las *Pseudomonas* en su metabolismo no fermentativo. Están presentes en aguas dulces o marinas. *Vibrio cholerae*, especie más representativa de este género, es patógeno para humanos y responsable del cólera. Su transmisión es casi exclusivamente por vía hídrica.

Otras especies patógenas importantes para el hombre que se pueden encontrar en muestras de agua pertenecen a los géneros *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*. Los cocos del género *Neisseria*, aislados de sedimentos de acuíferos aeróbicos, son causantes de gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*) y meningitis (*Neisseria meningitidis*). Las especies de *Moraxella* y *Acinetobacter* son bacilos y se transforman en cocos solamente en la senectud, y por ello se las propone como cocobacilos. Algunas especies de *Moraxella* han sido aisladas de aguas profundas originadas de acuíferos aeróbicos y representantes del género *Acinetobacter* se encuentran frecuentemente también en aguas subterráneas aeróbicas.

#### *Bacterias Gram positivas*

No representan un grupo muy difundido en agua, sin embargo incluye algunos patógenos humanos aislados especialmente de aguas subterráneas.

Los cocos más comunes pertenecen a los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Los micrococos y estafilococos son aerobios y tolerantes a altas concentraciones salinas que permite diferenciarlos de los estreptococos. Varias especies de los dos primeros son importantes patógenos humanos; aunque no existe certeza acerca de su habitat original, la bibliografía las considera procedentes de aguas subterráneas. El género *Streptococcus* incluye a *Enterococcus faecalis*, patógeno humano que habita normalmente en el intestino de hombres y animales por lo que es un indicador de contaminación fecal de aguas.

Las bacterias esporulantes, pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Clostridium* presentan metabolismo aeróbico y anaeróbico respectivamente. A partir de suelos y acuíferos aeróbicos se aíslan especies incluidas en el género *Bacillus*; y a partir de suelos, sedimentos, aguas subterráneas anaerobias y última porción del tracto intestinal de animales se pueden encontrar especies de *Clostridium*. Algunas especies son patógenas para animales, generalmente debido a la producción de poderosas exotoxinas: la del *Bacillus anthracis*, conduce al desarrollo de *antrax*, enfermedad de animales que puede transmitirse a humanos (*zoonosis*) y la del *Clostridium tetani* que ocasiona una enfermedad en humanos caracterizada por tetanización de músculos, razón por la cual recibe el nombre de *tétano*.

#### 4. Bacterias Indicadoras de Contaminación

Las condiciones bacteriológicas del agua son fundamentales desde el punto de vista sanitario. La *norma bacteriológica de calidad* establece que el agua debe estar exenta de patógenos de origen entérico y parasitario intestinal que son los responsables de transmitir enfermedades como *salmonelosis*, *shigelosis*, *amebiasis*, etc.

Los microorganismos indicadores de contaminación deben cumplir los siguientes requisitos: fáciles de aislar y crecer en el laboratorio; ser relativamente inocuos para el hombre y animales; y presencia en agua relacionada, cuali y cuantitativamente con la de otros microorganismos patógenos de aislamiento más difícil. Tres tipos de bacterias califican a tal fin:

- Coliformes fecales: indican contaminación fecal.
- Aerobias mesófilas: determinan efectividad del tratamiento de aguas.
- Pseudomonas: señalan deterioro en la calidad del agua o una recontaminación.

Desde el punto de vista bacteriológico, para definir la potabilidad del agua, es preciso investigar bacterias aerobias mesófilas y, coliformes totales y fecales.

La gran sensibilidad de las bacterias aerobias mesófilas a los agentes de los agentes de cloración, las ubica como indicadoras de la eficacia del tratamiento de potabilización del agua.

Las bacterias coliformes habitan el tracto intestinal de mamíferos y aves, y se caracterizan por su capacidad de fermentar lactosa a 35°C. Los géneros que componen este grupo son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwardsiella*. Todas pueden existir como saprofitas independientemente, o como microorganismos intestinales, excepto el género *Escherichia* cuyo origen es sólo fecal. Esto ha llevado a distinguir entre coliformes totales (grupo que incluye a todos los coliformes de cualquier origen) y coliformes fecales (término que designa a los coliformes de origen exclusivamente intestinal) con capacidad de fermentar lactosa también a 44,5°C. La existencia de una contaminación microbiológica de origen fecal se restringe a la presencia de coliformes fecales, mientras que la presencia de coliformes totales que desarrollan a 35°C, sólo indica existencia de contaminación, sin asegurar su origen. Los enterococos fecales cuyo desarrollo ocurre a 35°C se usan como indicadores complementarios de contaminación fecal.

La validez de todo examen bacteriológico se apoya en una apropiada toma de muestra (recipiente estéril de boca ancha y metodología precisa), y en las adecuadas condiciones de transporte desde el lugar de la fuente de agua hacia el laboratorio (refrigeración, tiempo).

El sistema de conservación de la muestra debe ser confiable, y la misma analizada inmediatamente o al cabo de un corto período entre extracción y análisis.

El análisis cuantitativo de bacterias indicadoras de contaminación en una muestra de agua puede realizarse por dos metodologías diferentes:

- Recuento directo de microorganismos cultivables por siembra de la muestra sobre o en un medio de cultivo agarizado.
- Recuento indirecto (basado en cálculos estadísticos) después de sembrar diluciones seriadas de la muestra en medios de cultivos líquidos específicos. Se considera, al cabo de una incubación adecuada, los números de cultivos «positivos» y negativos». Esta metodología se denomina «*Técnica de los Tubos Múltiples*» y los resultados se expresan como número más probable (NMP) de microorganismos.

Además de otros métodos, se puede recurrir a aquellos en los que se aplica biología molecular como por ejemplo, la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) utilizando sondas marcadas en base a secuencia nucleotídica del gen 16S.

En este capítulo sólo se describirá el primer método en el cual la muestra se concentra por filtración sobre membrana, denominada «*Técnica de la Membrana Filtrante*». En ella, se procede a filtrar un volumen determinado de muestra (normalmente 100 mL) a través de membranas de ésteres de celulosa generalmente con diámetro de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  y en algunos casos de 0,22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, la membrana se deposita sobre un medio de cultivo selectivo y bajo condiciones favorables (temperatura y tiempo de incubación) y sobre la membrana desarrollan colonias aisladas con aspectos característicos que permiten la identificación y el recuento. Conociendo el volumen de muestra filtrada es posible determinar el número de UFC por unidad de volumen. La obtención de resultados confiables requiere un intercambio de nutrientes a través de los poros de la membrana, por ello se debe evitar la filtración de aguas con alto contenido de material en suspensión que pueden obstruir las membranas. Además, el número de colonias desarrolladas sobre la membrana debe ser inferior a un determinado valor (variable según los microorganismos y la composición del medio que condiciona el tamaño de las colonias) generalmente comprendido entre 80 y 100. A valores superiores, la proximidad de las colonias, puede conducir a resultados inexactos. Los medios de cultivos usados, las temperaturas y tiempos de incubación, y el color de las colonias típicas de bacterias indicadoras de contaminación se detallan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Medios de cultivo, temperaturas y tiempos de incubación, y color de las colonias de algunas bacterias indicadores de contaminación

Microorganismos	Medio de cultivo	Temperatura y tiempo de incubación	Color de las colonias
COLIFORMES TOTALES	Endo	35°C; 24 h	Rojo con brillo metálico en superficie
COLIFORMES FECALES	FC	44,5°C; 24 h	Matices de azul
<i>Enterococcus faecalis</i>	KF	41°C; 48 h	Marrón
<i>Escherichia coli</i>	EC	44,5°C; 24 h	Blanco crema
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimida	37°C; 72 h	Verde

La importancia de conocer las especies presentes en los sistemas acuosos naturales y el comportamiento en su ambiente, radica en la posibilidad de desarrollar nuevas tecnologías que logren su eliminación y de esta manera controlar enfermedades de origen hídrico.

### Referencias

- [1] APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, New York, (1992).
- [2] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, (1994).
- [3] F.H. Chapelle, Ground-Water Microbiology and Geochemistry, John Wiley, New York, (1993).
- [4] H.L. Ehrlich, Geomicrobiology, Marcel Dekker, New York, (1996).
- [5] H.J. Glynn y G.W. Heinke, Ingeniería Ambiental, Prentice Hall, México, (1999).
- [6] Guías para la Calidad del Agua Potable, Vol. 3, Publicación Científica N° 58, Organización Panamericana de la Salud, Washington, (1988).
- [7] M.T. Madigan, J.M. Martinko y Parker J. Broca, Biología de los Microorganismos, Prentice Hall, Madrid, (2004).
- [8] J. Rodier, Análisis de las aguas, Omega, Barcelona, (1989).
- [9] H.G. Schlege, General Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, (1987).
- [10] F.A. Skinner y J.M. Shewan, Aquatic Microbiology, Academic Press, New York, (1977).