



# Microbiología del agua

**Dr. Félix Daniel Andueza**  
**Facultad de Farmacia y Bioanálisis**  
**Universidad de los Andes**  
**Mérida. Venezuela**  
**Prometeo SENESCYT**  
**Escuela de Bioquímica y Farmacia**  
**ESPOCH. Riobamba. Ecuador**

**San José de Costa Rica, Octubre 2014**

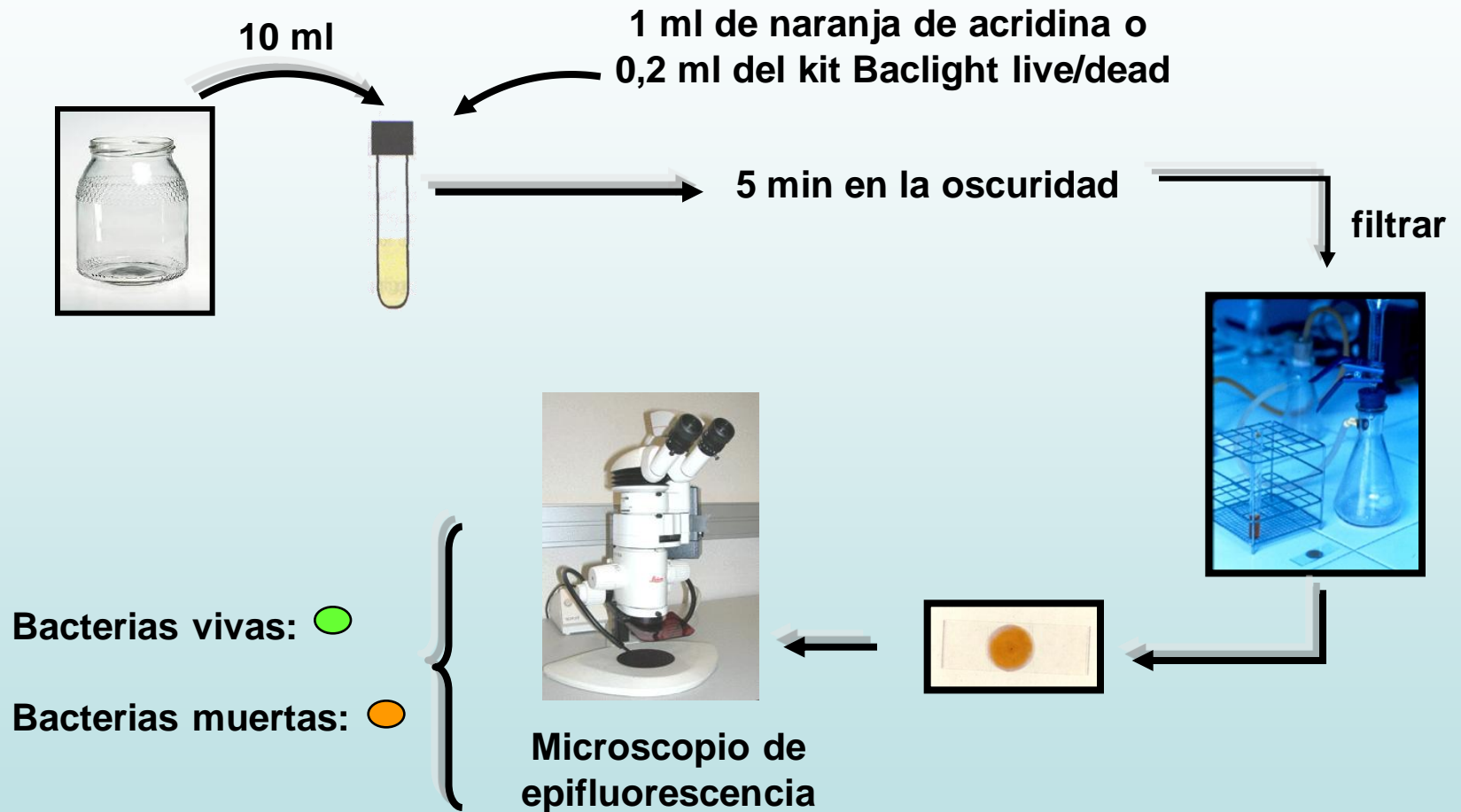
# Análisis Microbiológico



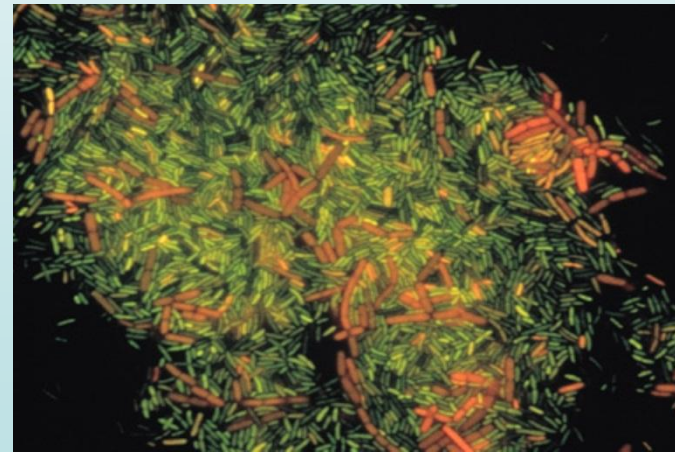
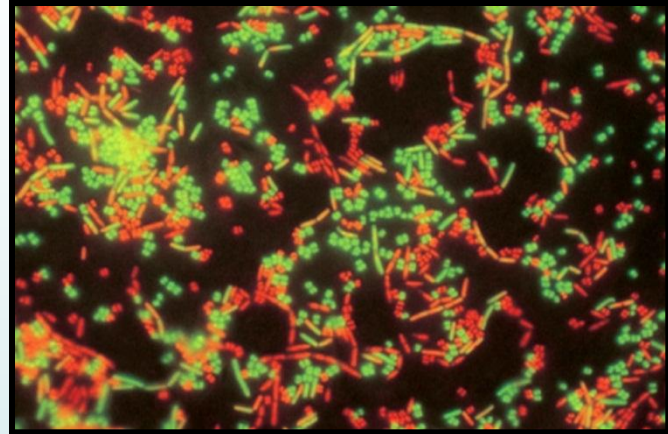
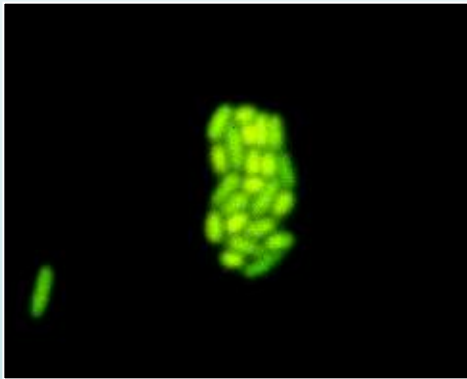
- **Métodos de determinación de microorganismos**

- Siembra en profundidad.
- Siembra por extensión.
- Métodos del número más probable (NMP).
- Método por filtración.
- Impedancia
- Biología molecular

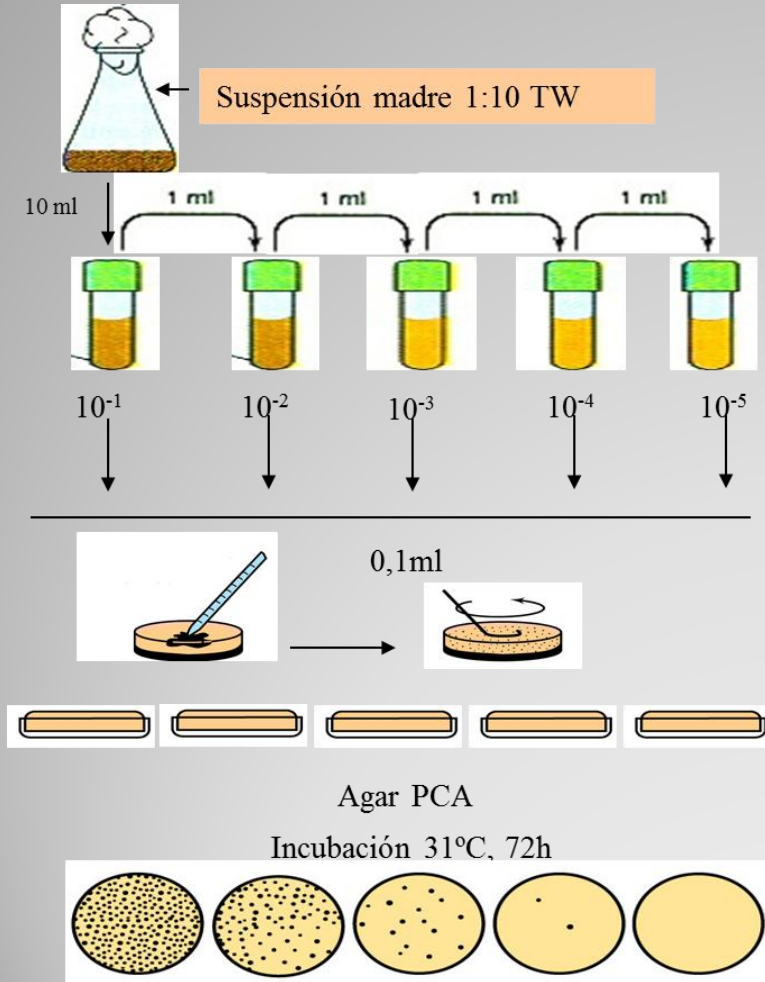
# RECUENTO DE MICROORGANISMOS TOTALES Y VIVOS



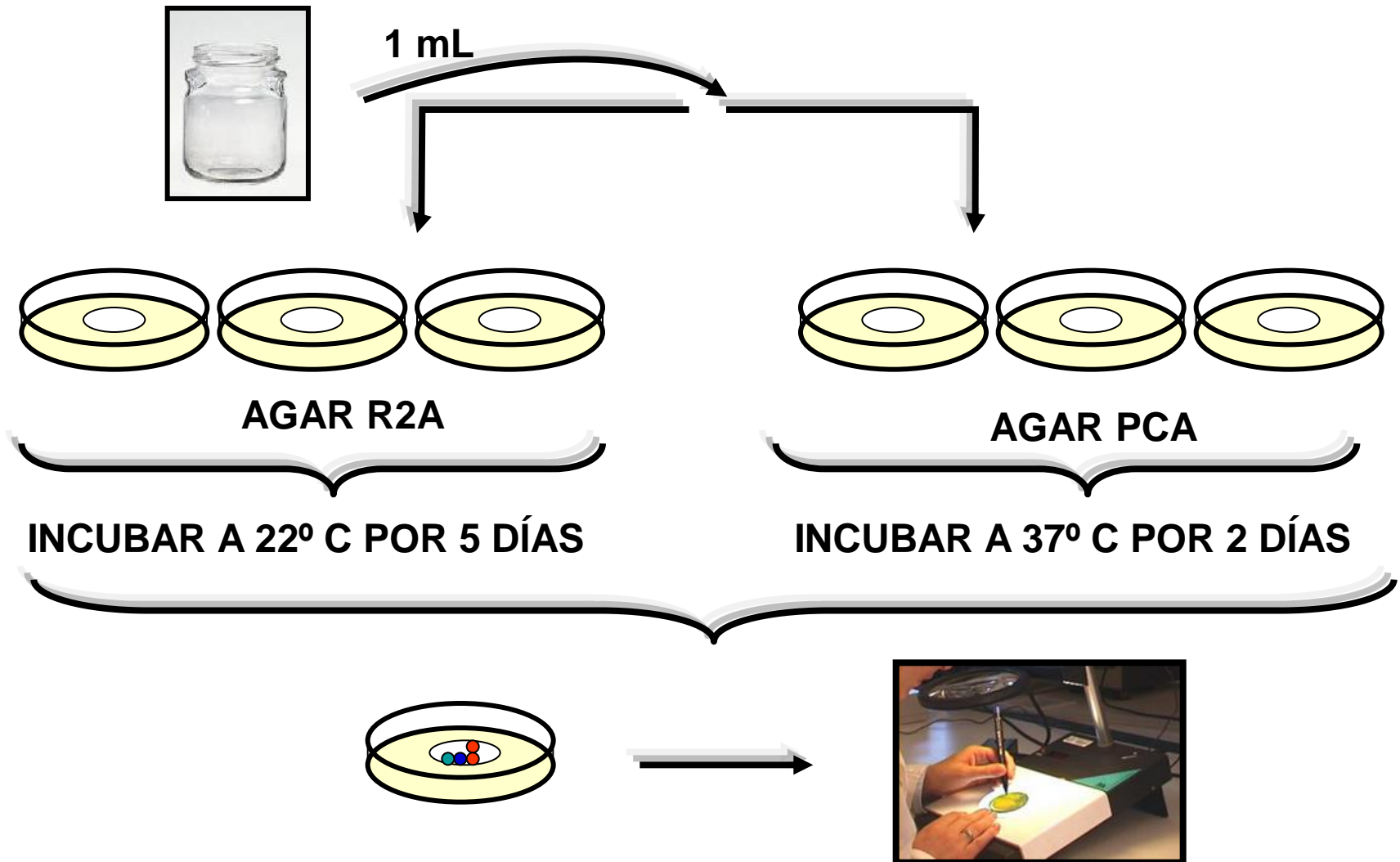
# MICROORGANISMOS TOTALES Y VIVOS



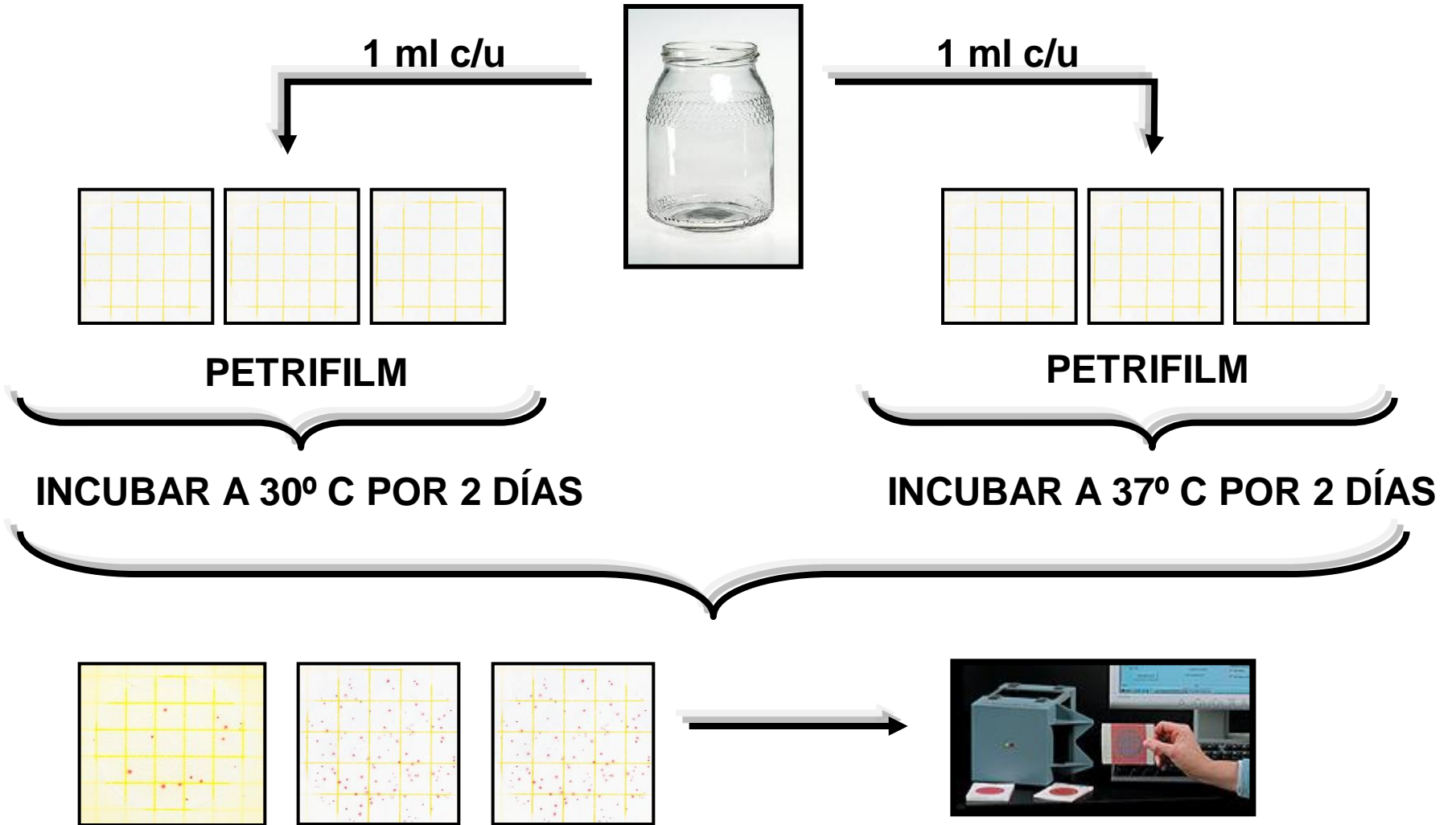
# Bacterias aerobias mesófilas



# RECuento DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS

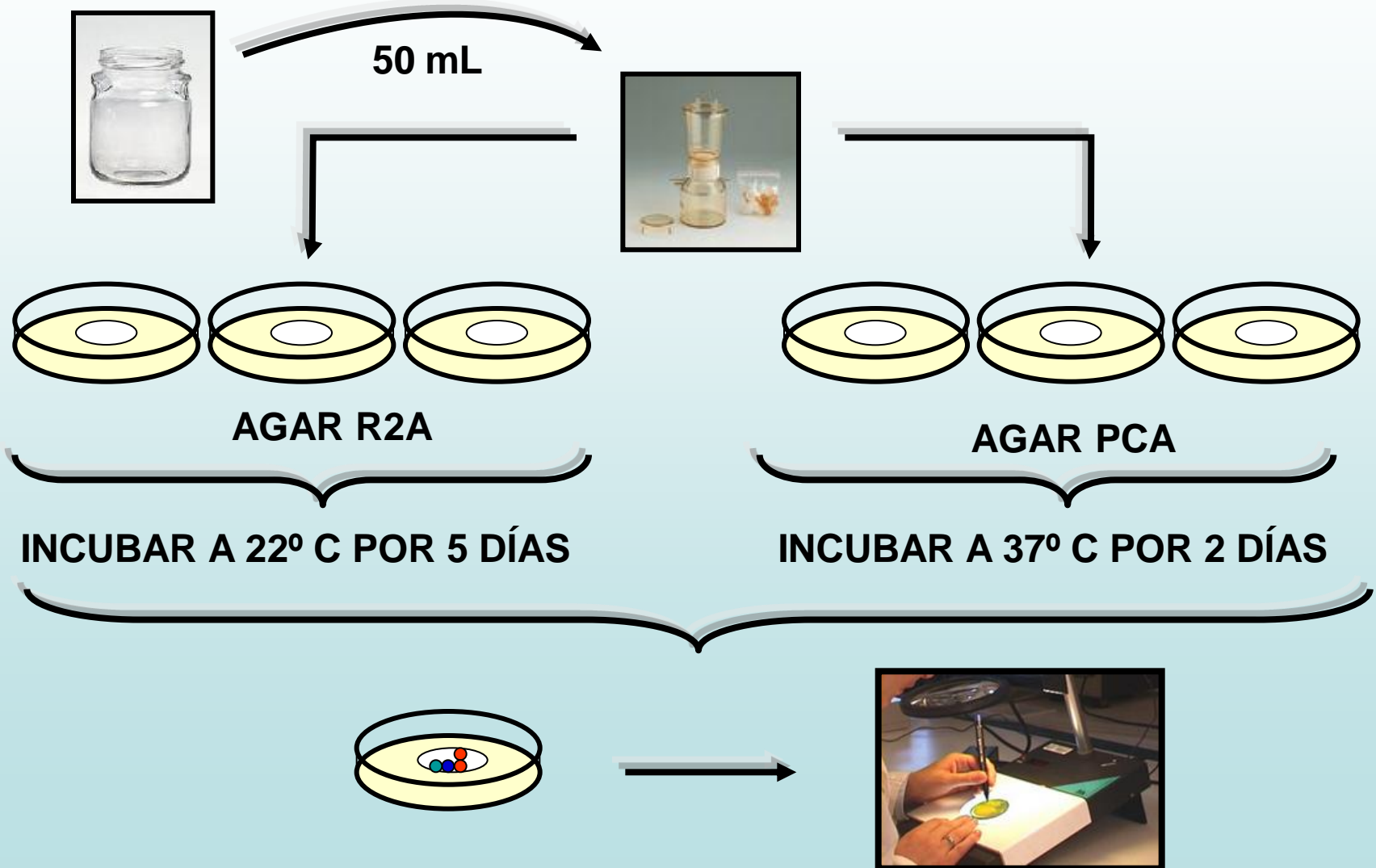


# RECuento DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS





# RECuento DE BACTERIAS HETERÓTROFAS



# RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES



250 mL



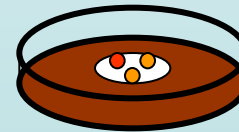
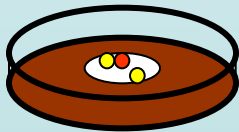
AGAR CHAPMAN-LACTOSA-  
TRIFENIL-TETRAZOLIO

INCUBAR A 30° C POR 24 - 48 h



AGAR CHAPMAN-LACTOSA-  
TRIFENIL-TETRAZOLIO

INCUBAR A 44,5° C POR 24 - 48 h

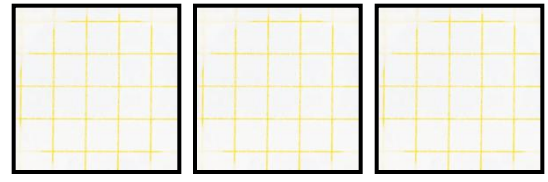


# RECuento DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES

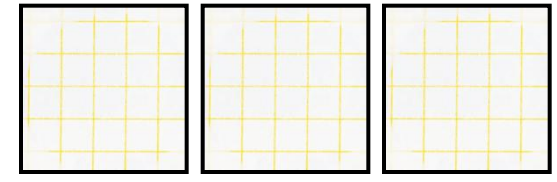
1 ml c/u



1 ml c/u



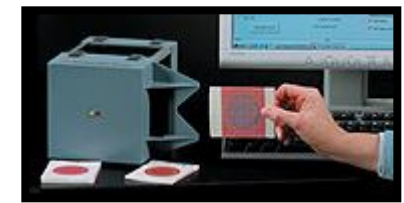
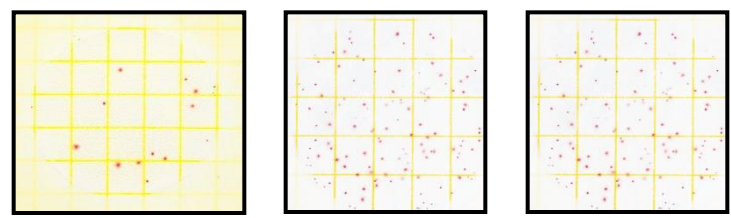
PETRIFILM



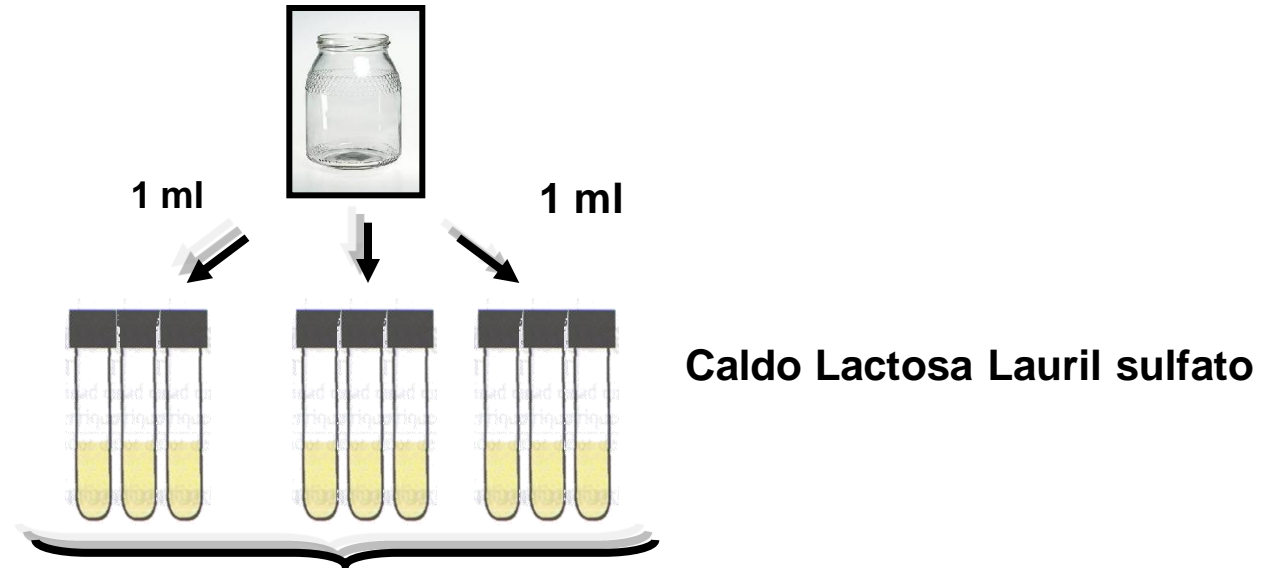
PETRIFILM

INCUBAR A 37° C POR 2 DÍAS

INCUBAR A 44° C POR 2 DÍAS



# RECuento DE COLIFORMES TOTALES POR EL METODO DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

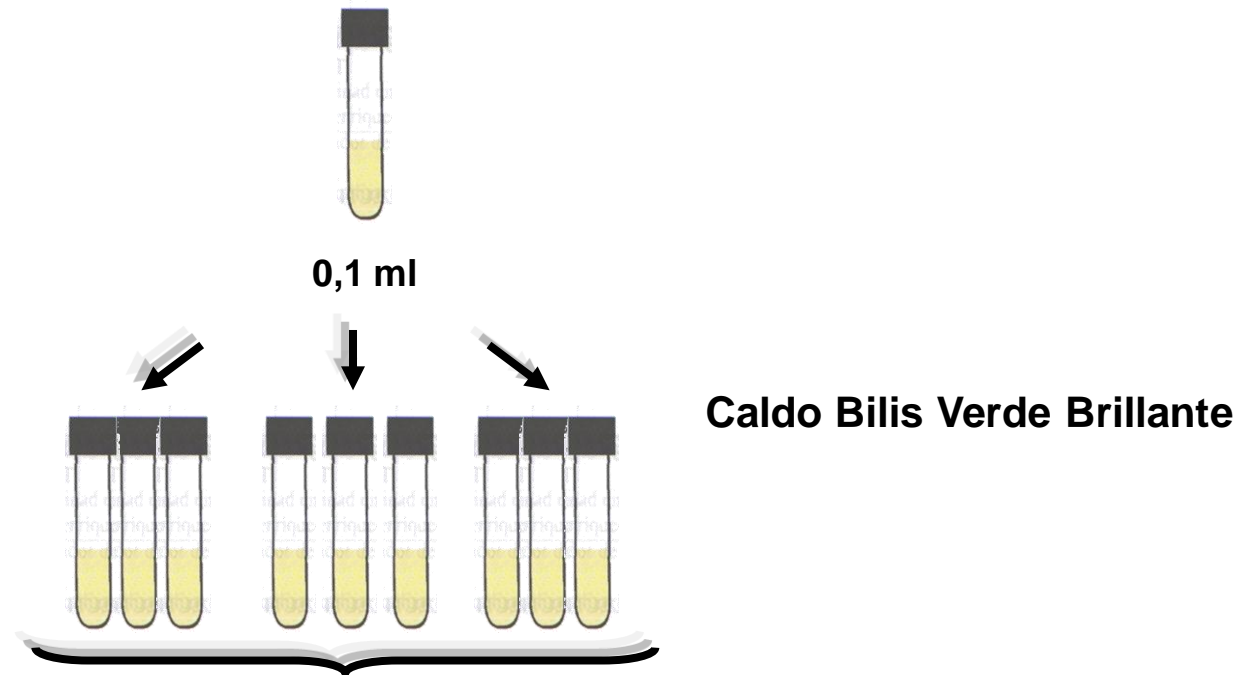


**INCUBAR A 37° C POR 24-48 horas**



**SE REALIZA EL RECuento  
DE TUBOS CON PRESENCIA  
DE GAS**

# RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES PRUEBA CONFIRMATORIA

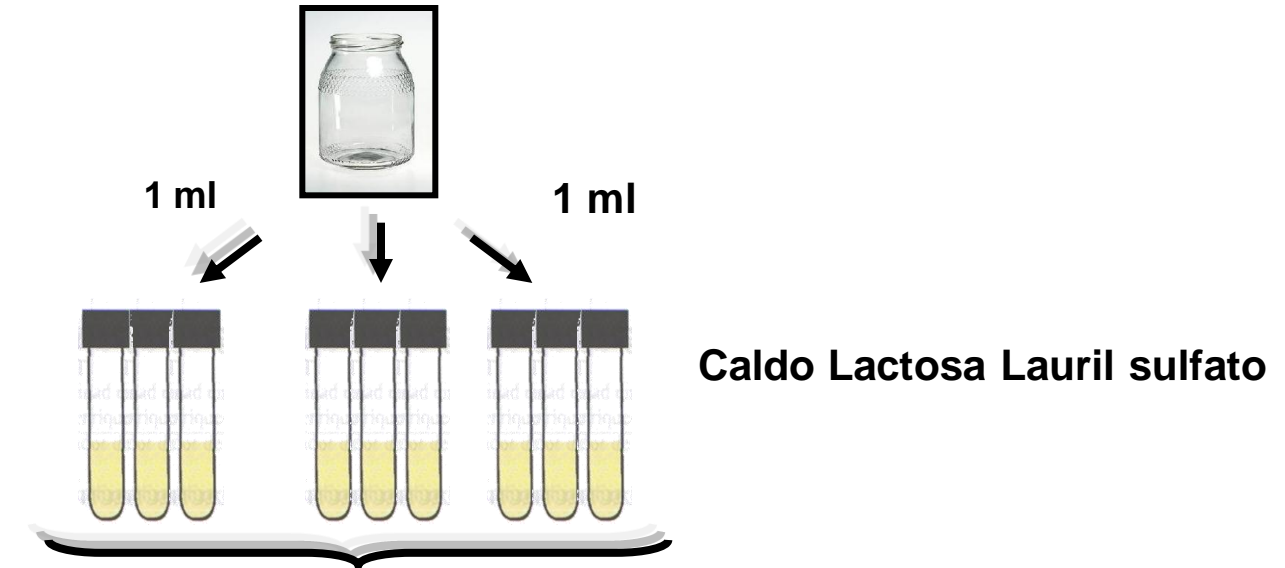


**INCUBAR A 37° C POR 24-48 horas**



**SE REALIZA EL RECUENTO  
DE TUBOS CON PRESENCIA  
DE GAS y SE BUSCA EL  
NMP EN LA TABLA**

# RECUENTO DE COLIFORMES FECALES POR EL METODO DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)



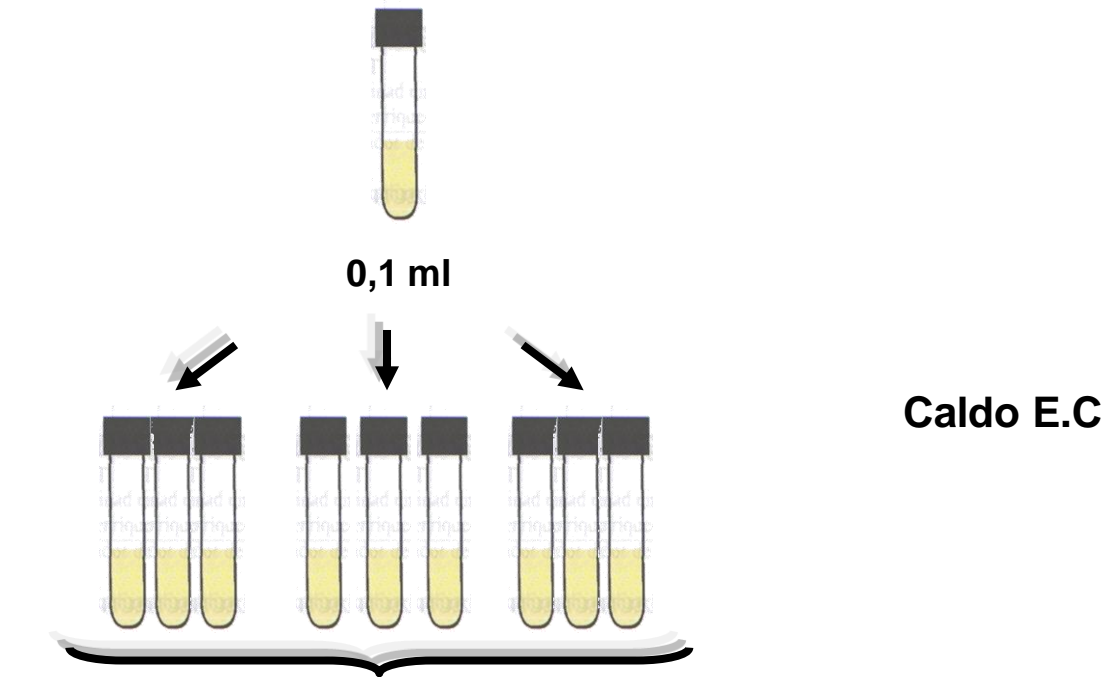
**INCUBAR A 37° C POR 24-48 horas**



**SE REALIZA EL RECUENTO  
DE TUBOS CON PRESENCIA  
DE GAS**

# RECuento DE COLIFORMES FECales

## PRUEBA CONFIRMATORIA

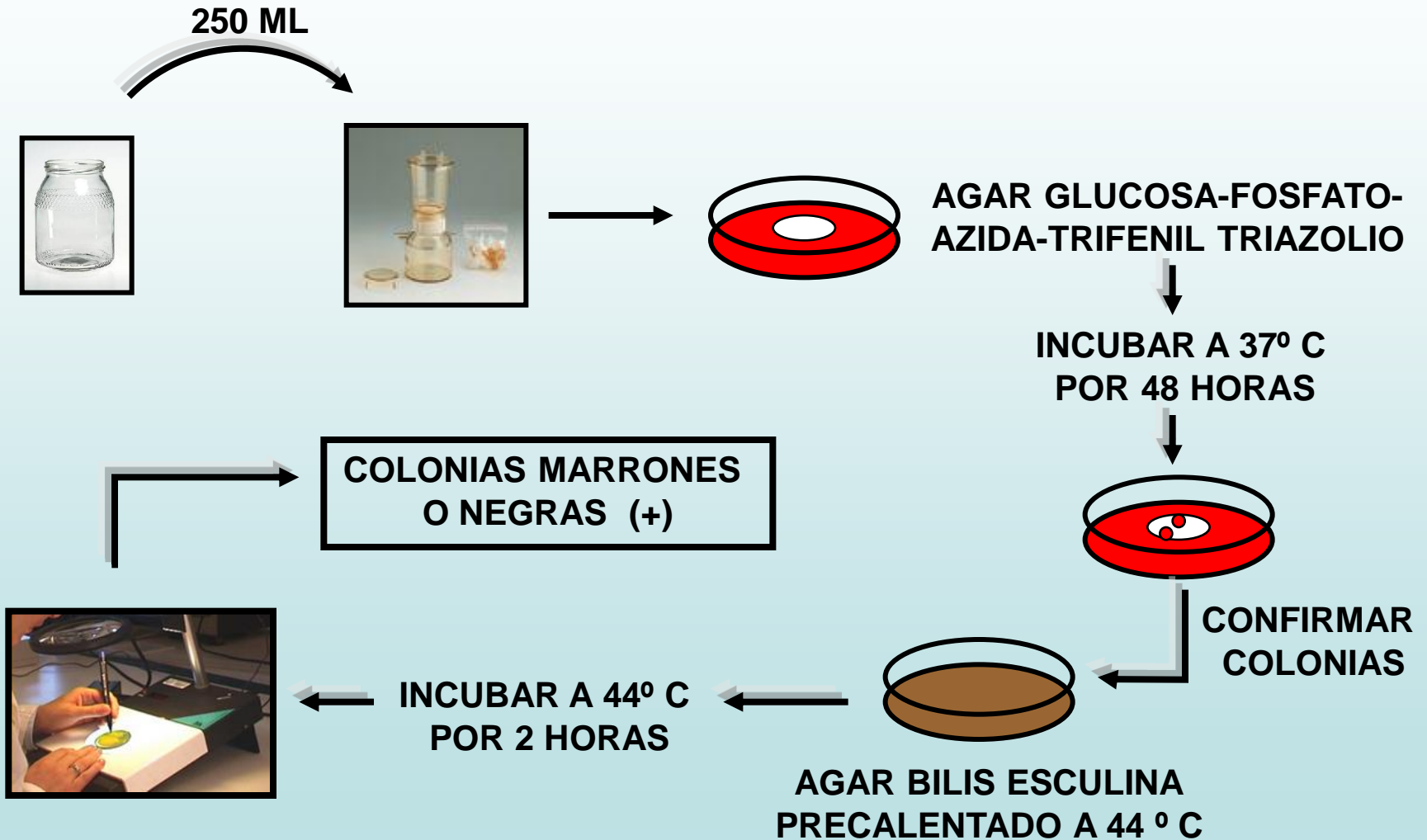


**INCUBAR A 44,5° C POR 24-48 horas**



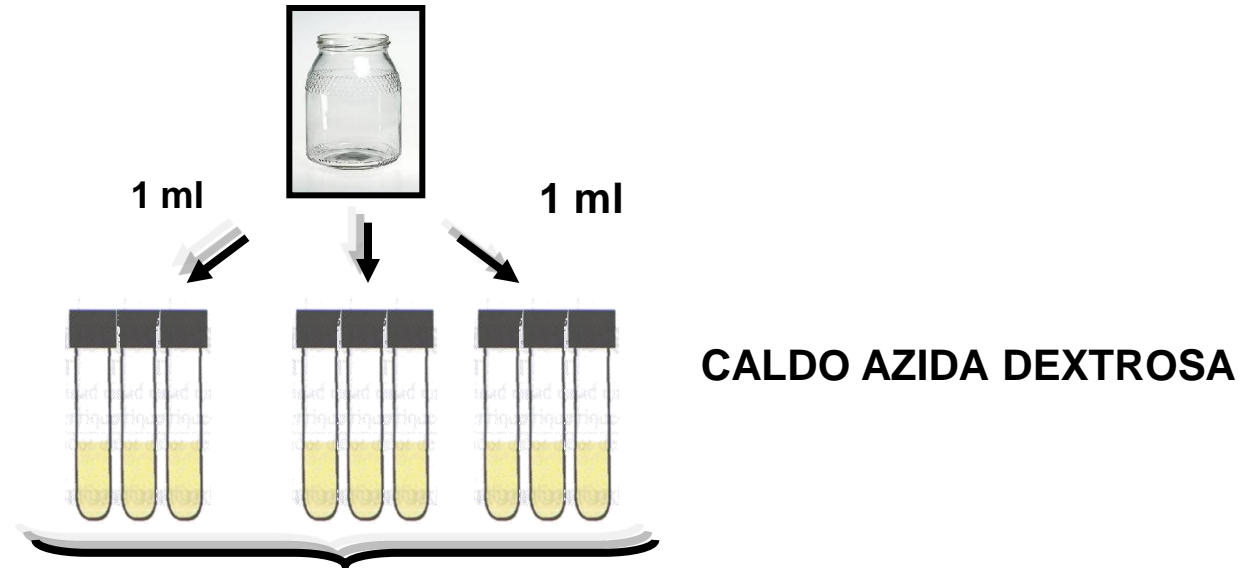
**SE REALIZA EL RECuento  
DE TUBOS CON PRESENCIA  
DE GAS y SE BUSCA EL  
NMP EN LA TABLA**

# RECUESTO DE ENTEROCOCOS





# RECUENTO DE ENTEROCOCOS POR EL METODO DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

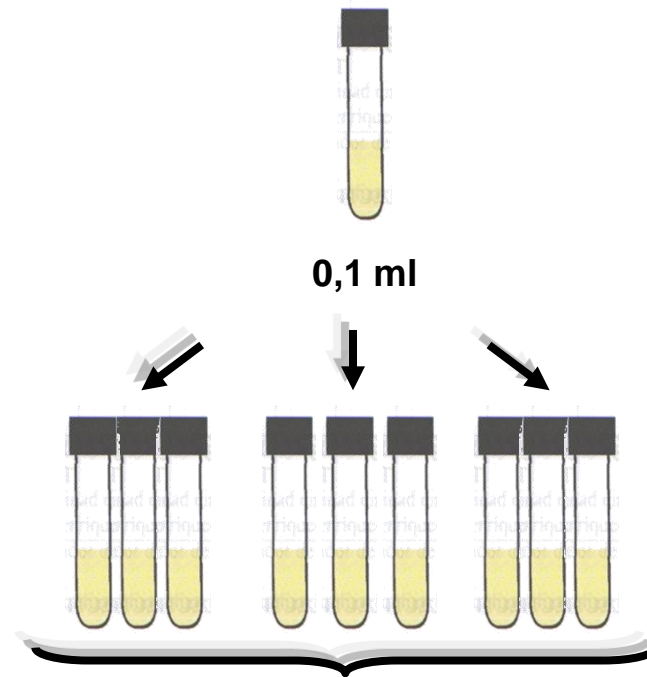


**INCUBAR A 37° C POR 24-48 horas**



**SE REALIZA EL RECUENTO  
DE TUBOS CON PRESENCIA  
DE TURBIDEZ O  
PRECIPITADO**

# RECUENTO DE ENTEROCOCOS PRUEBA CONFIRMATORIA

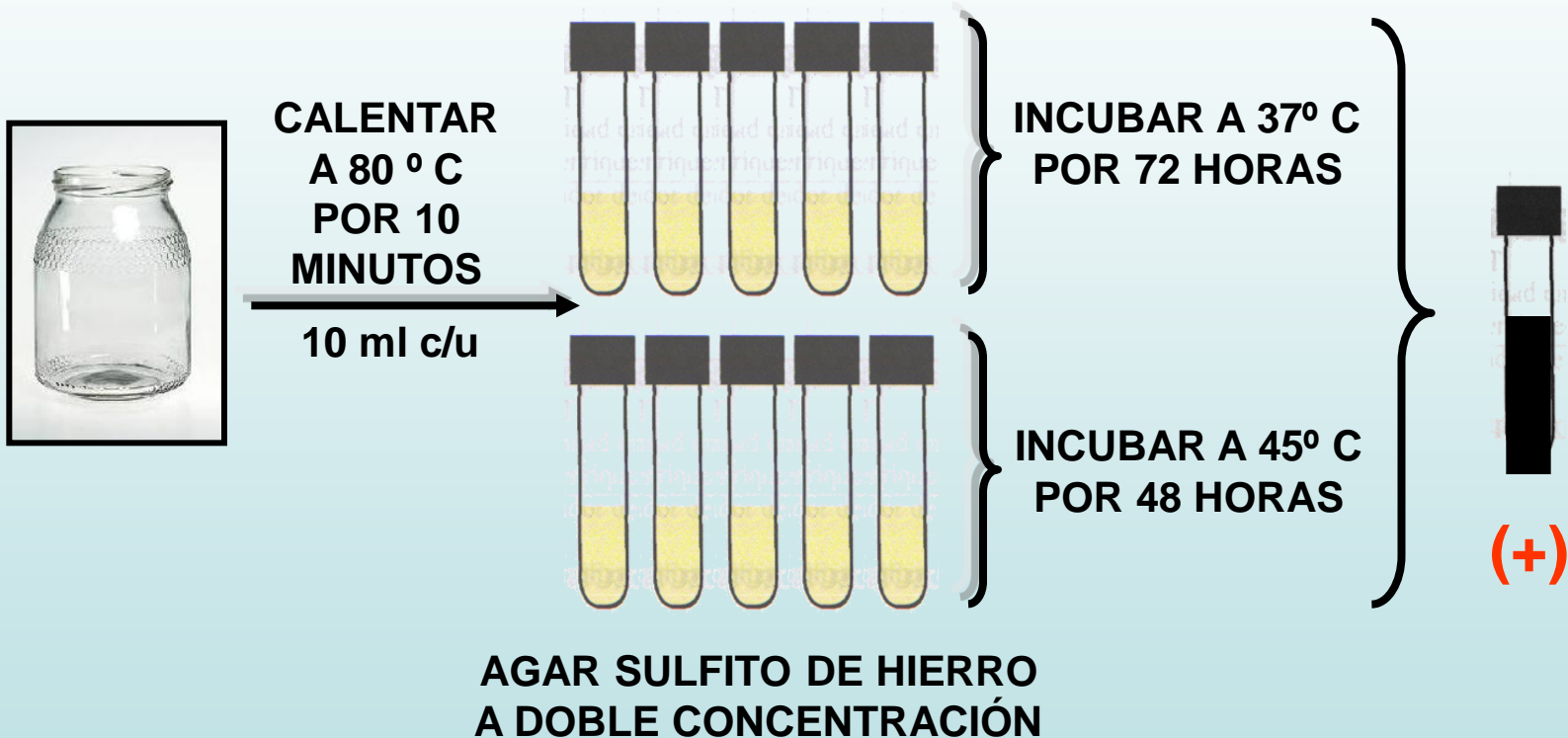


**INCUBAR A 37° C POR 24-48 horas**

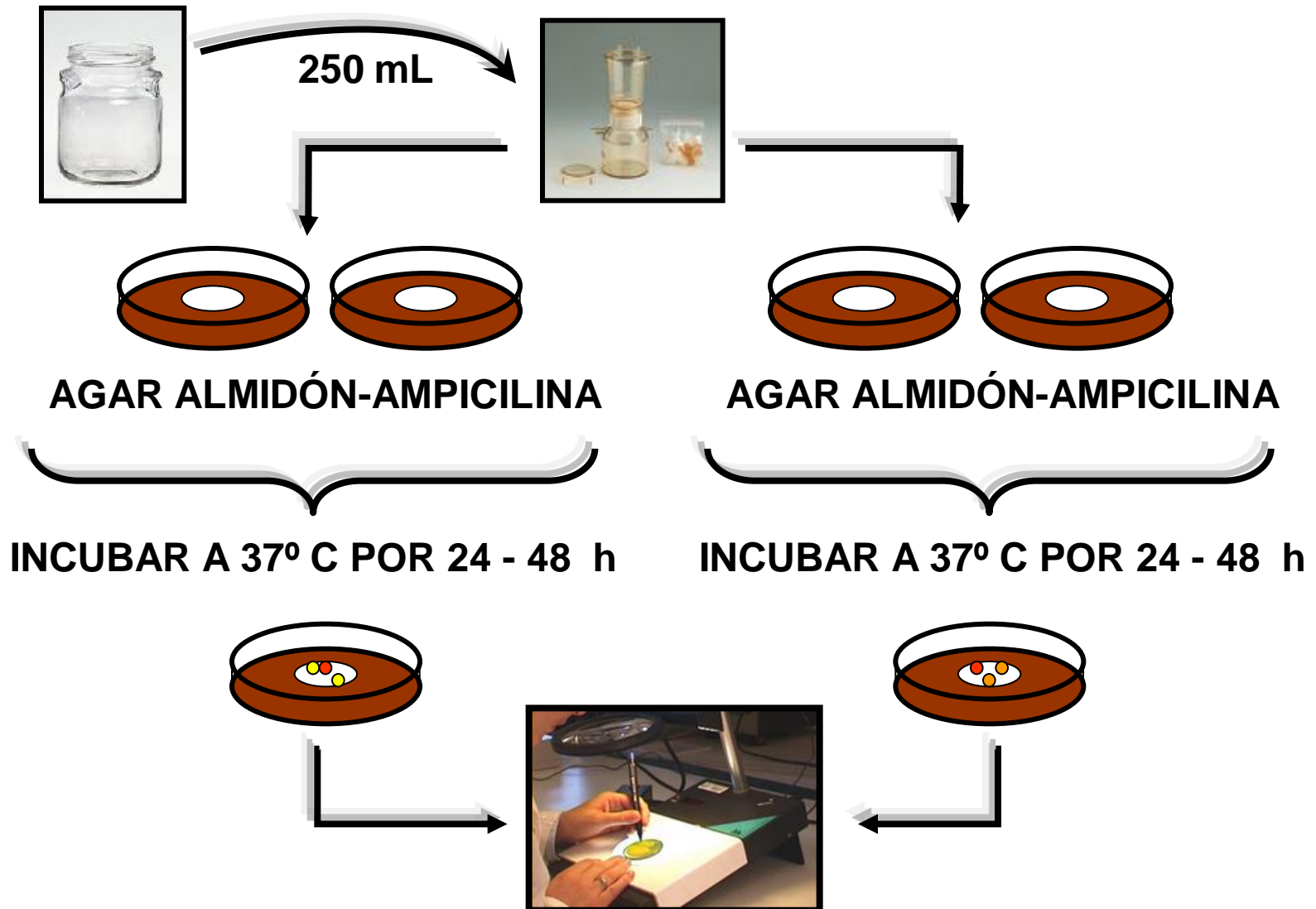


**SE REALIZA EL RECUENTO  
DE TUBOS CON PRESENCIA  
DE PRECIPITADO AZUL**

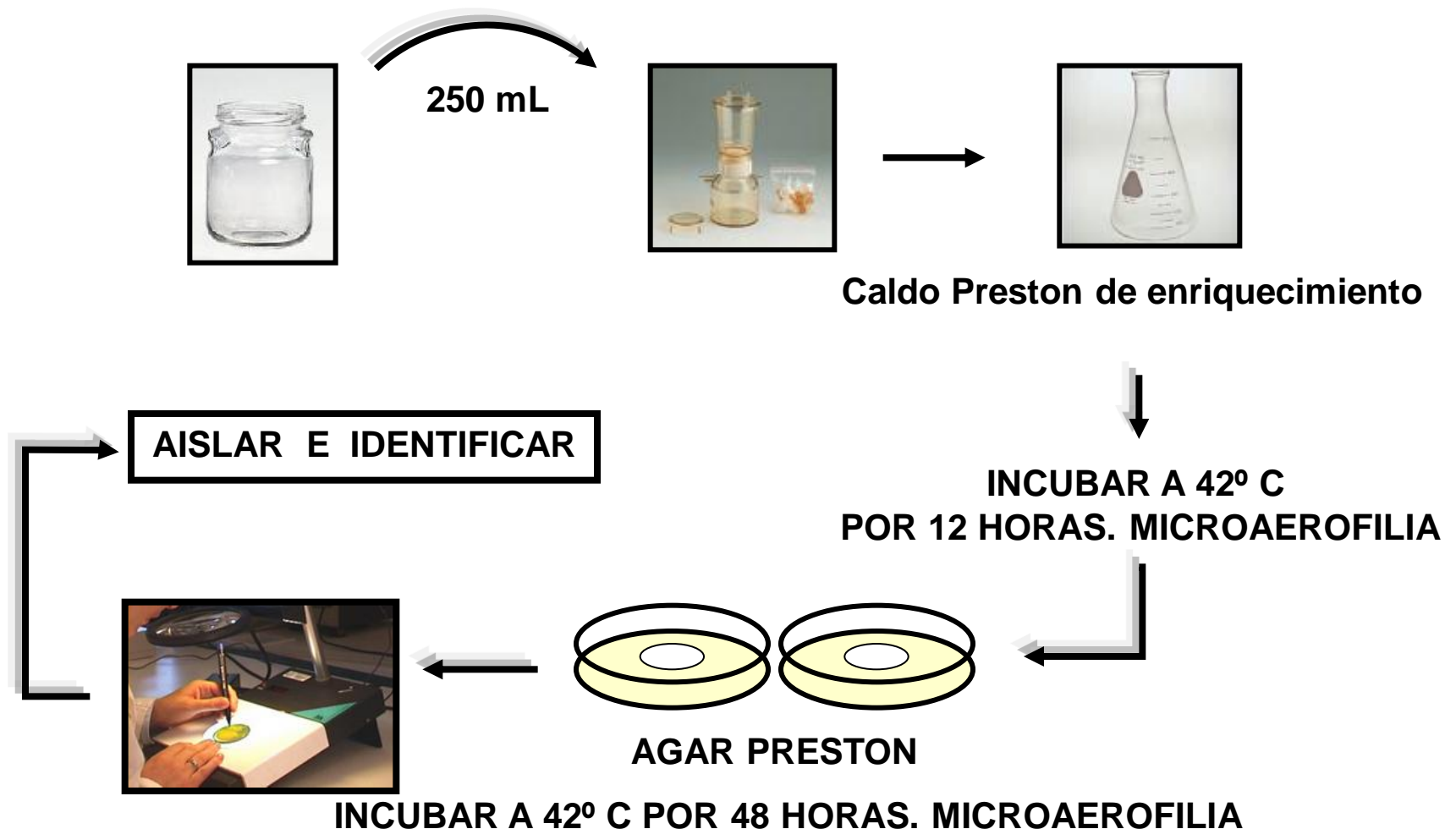
# RECUENTO DE ESPORAS DE CLOSTRIDIUM SULFITO-REDUCTORES



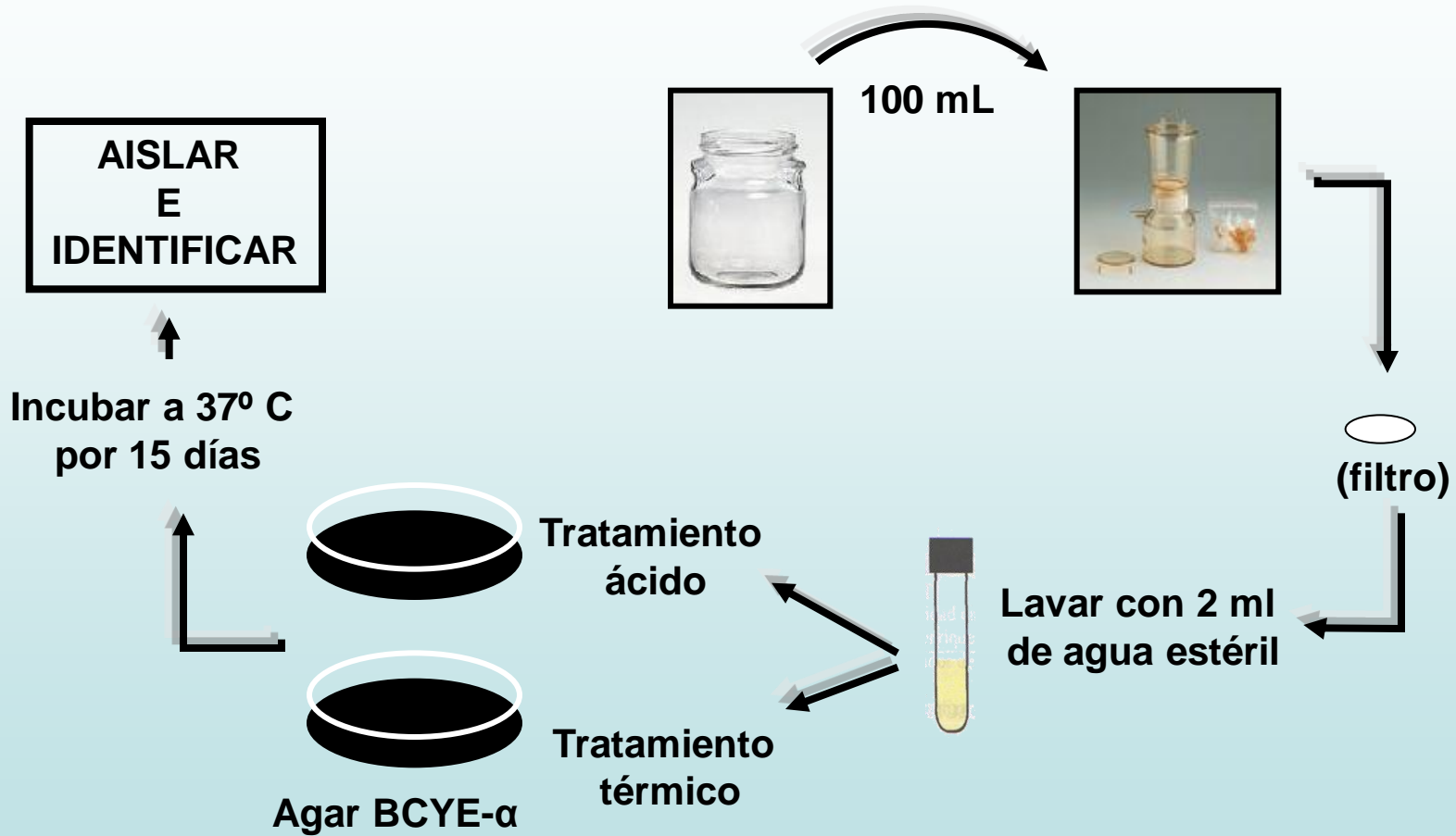
# DETECCIÓN DE AEROMONAS



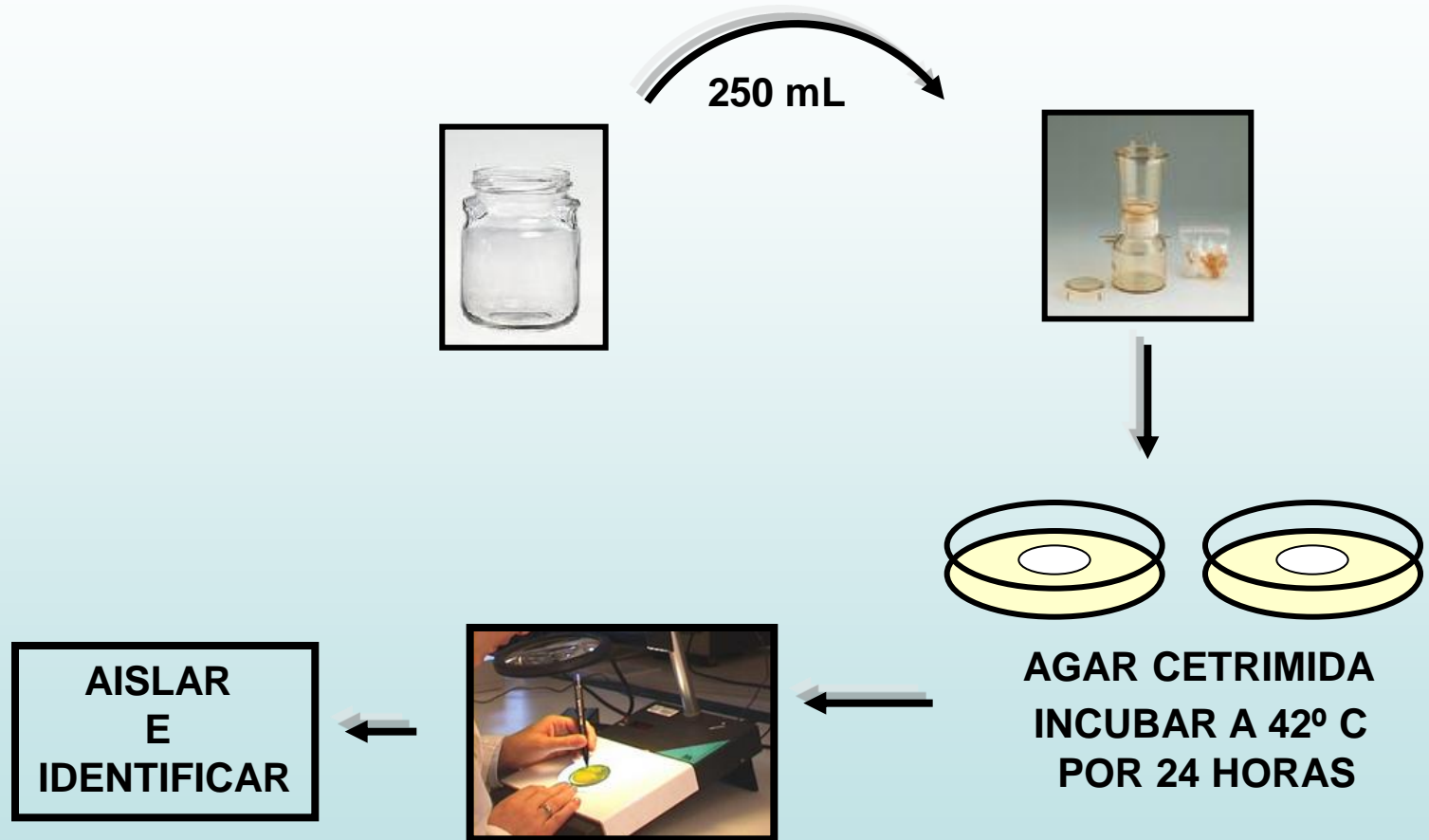
# INVESTIGACIÓN DE *Campylobacter*



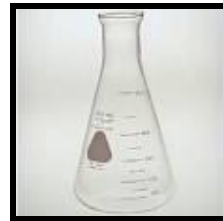
# INVESTIGACIÓN DE *Legionella pneumophila*



# INVESTIGACIÓN DE *Pseudomonas aeruginosa*



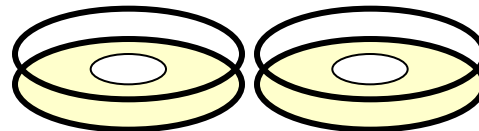
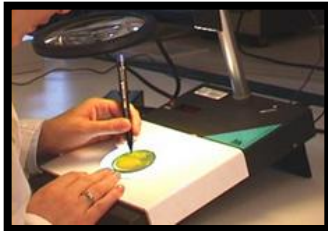
# INVESTIGACIÓN DE *Staphylococcus aureus*



muestra

1 ml de la muestra

**AISLAR E IDENTIFICAR**

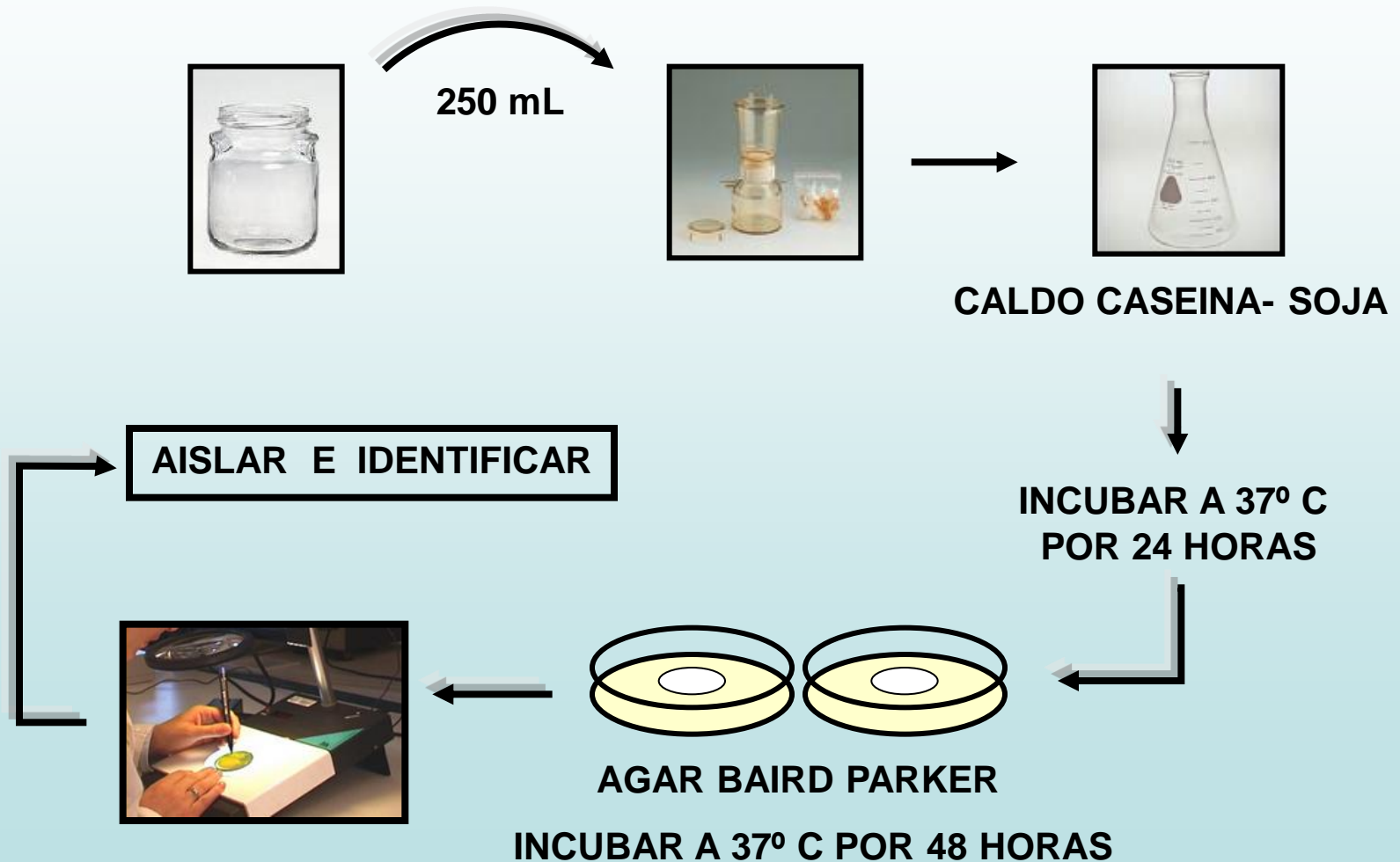


**AGAR BAIRD PARKER**

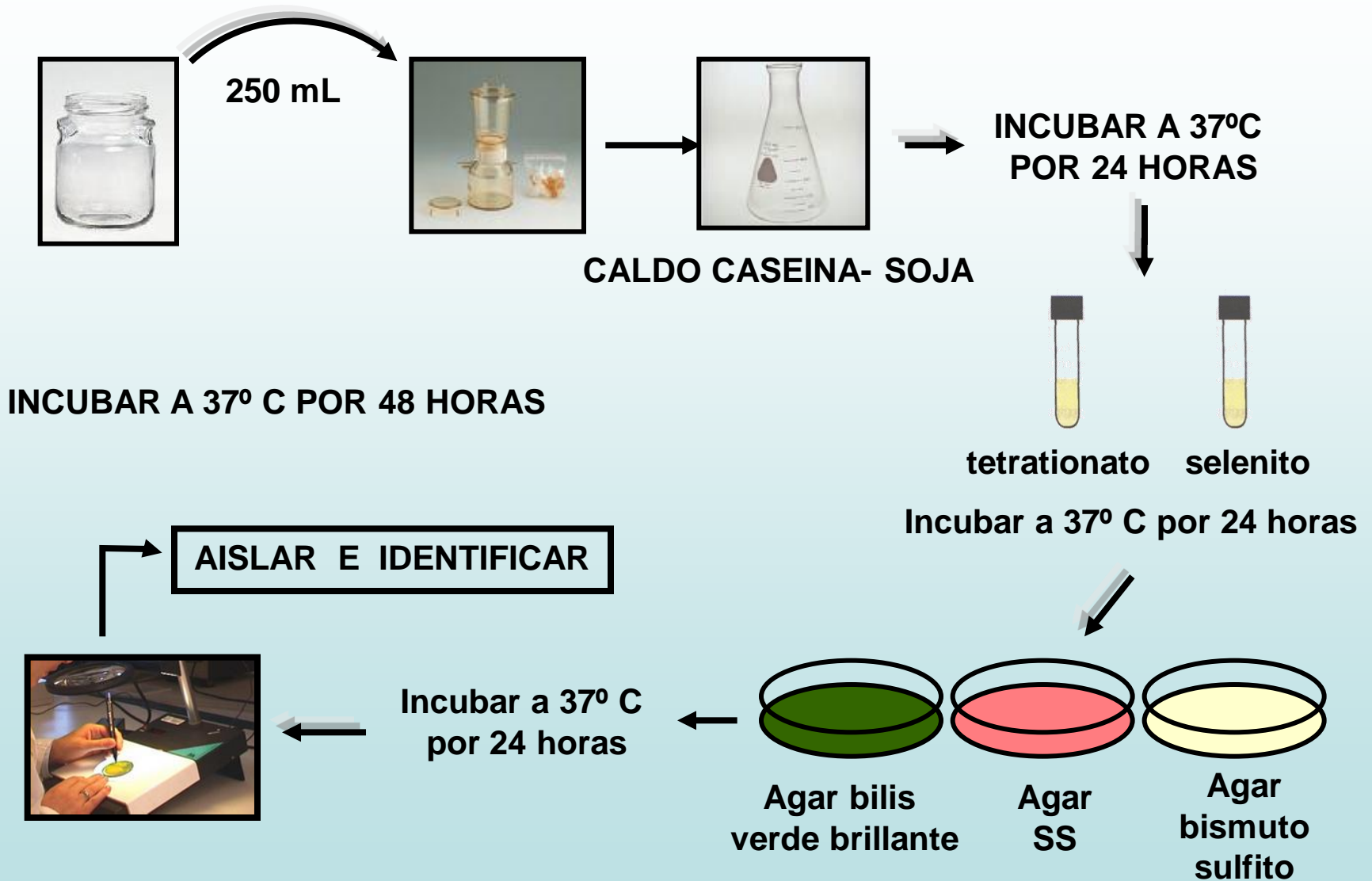
**INCUBAR A 37° C POR 48 HORAS**



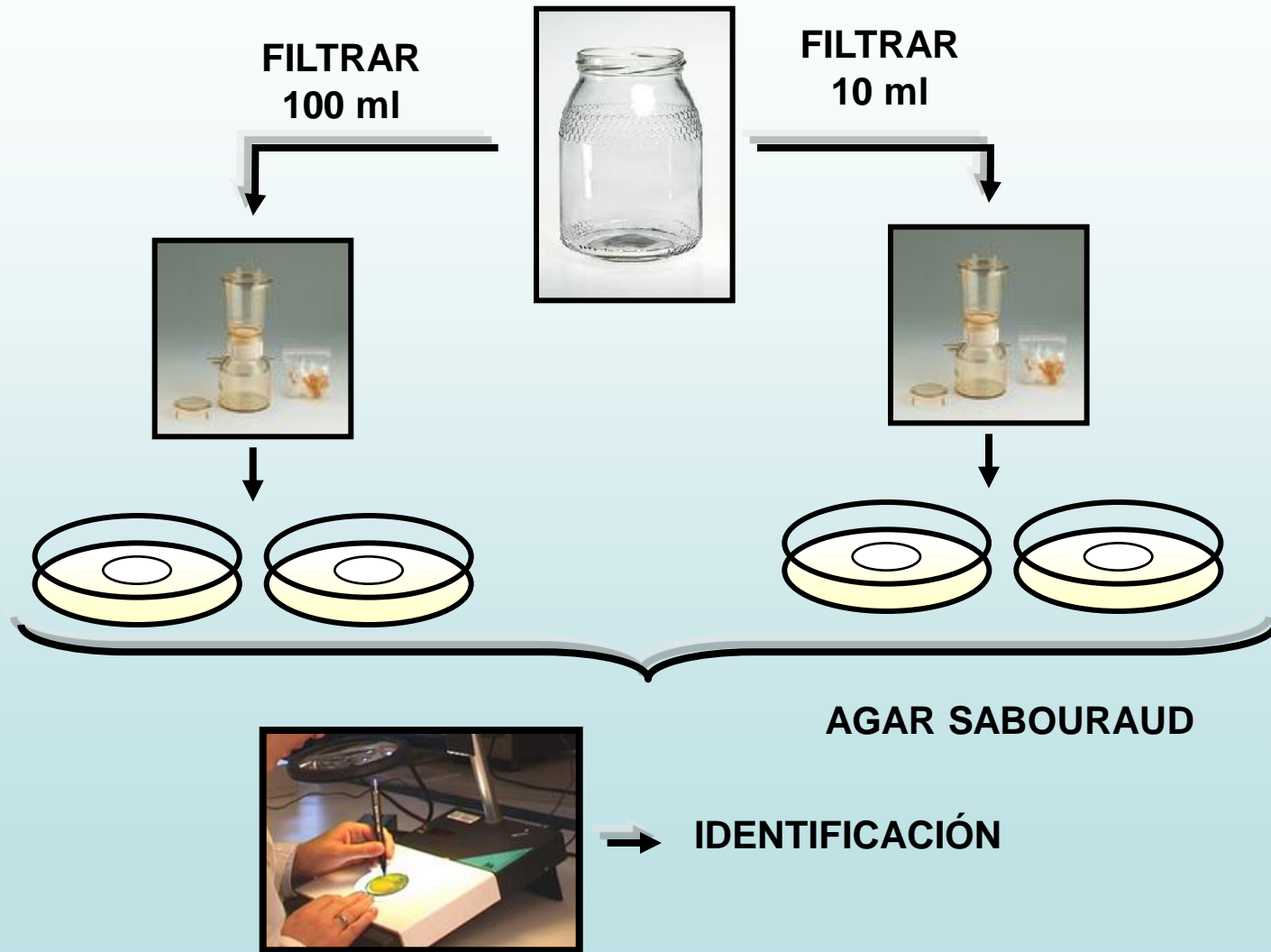
# INVESTIGACIÓN DE *Staphylococcus aureus*



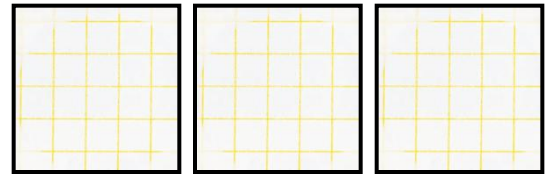
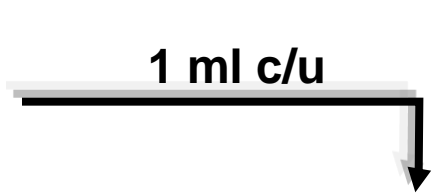
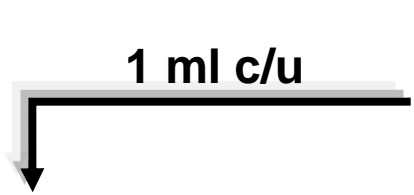
# INVESTIGACIÓN DE *Salmonella*



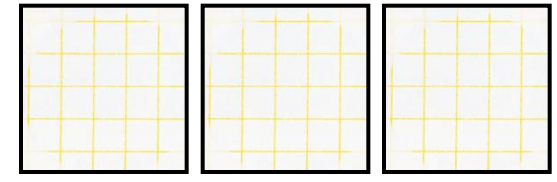
# RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS



# RECuento de Mohos y Levaduras



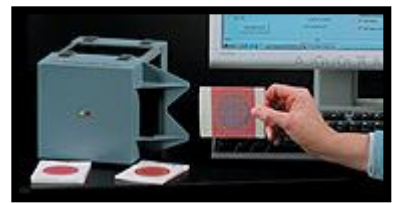
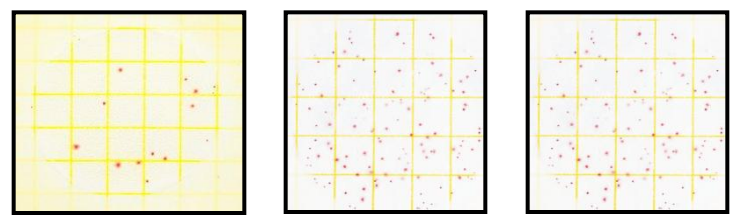
PETRIFILM MOHOS Y LEVADURAS



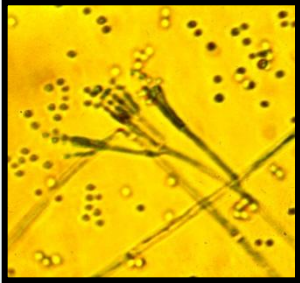
PETRIFILM MOHOS Y LEVADURAS

INCUBAR A 25° C POR 7 DIAS

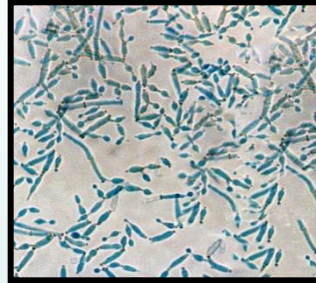
INCUBAR A 25° C POR 7 DIAS



# ESPECIES DE MOHOS ENCONTRADAS EN AGUAS



*Penicillium spp.*



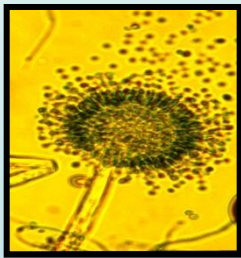
*Cladosporium spp.*



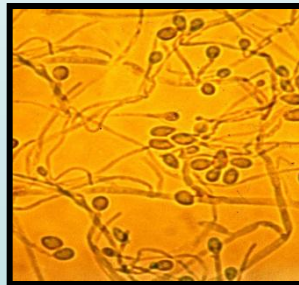
*Curvularia spp.*



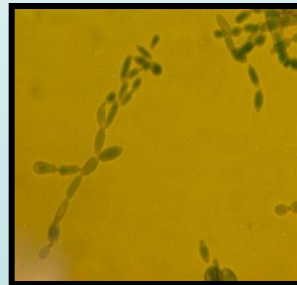
*Fusarium spp.*



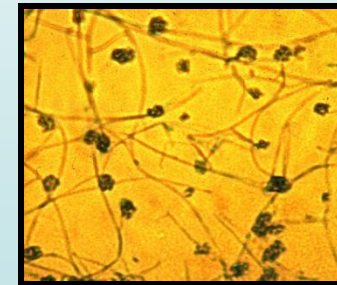
*Aspergillus spp.*



*Chrysosporium spp.*



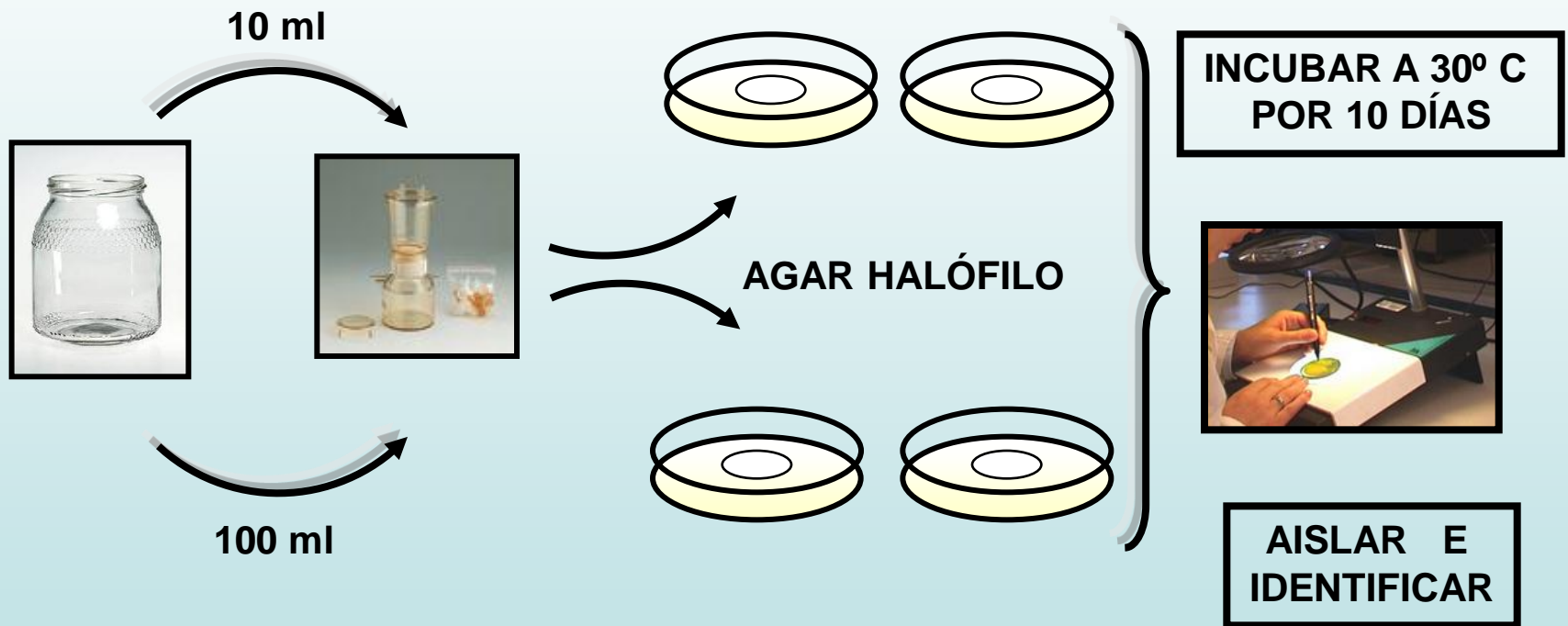
*Cladosporium spp.*



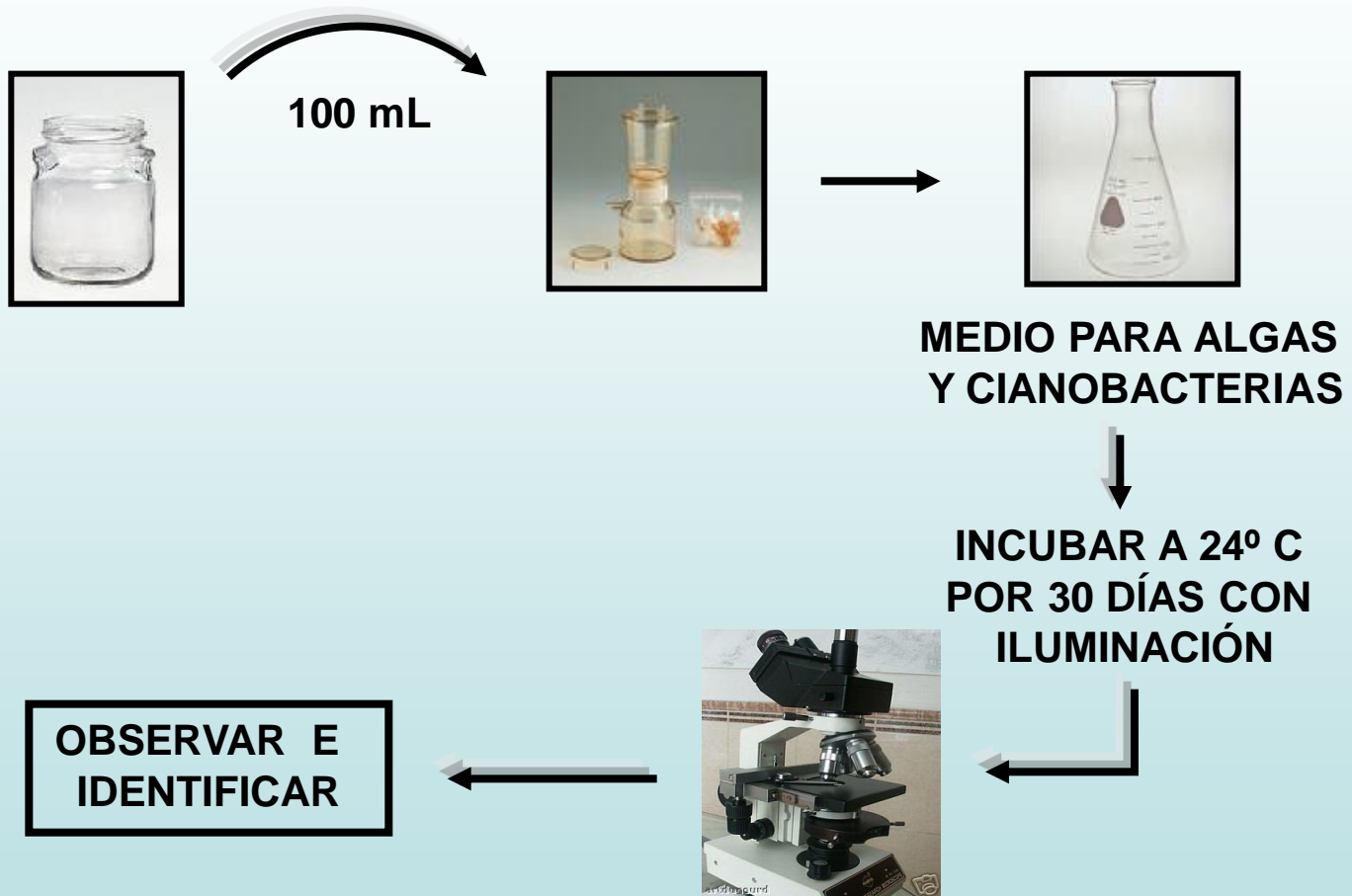
*Acremonium spp.*

Microscopio de contraste  
de fase. Objetivo 40 x

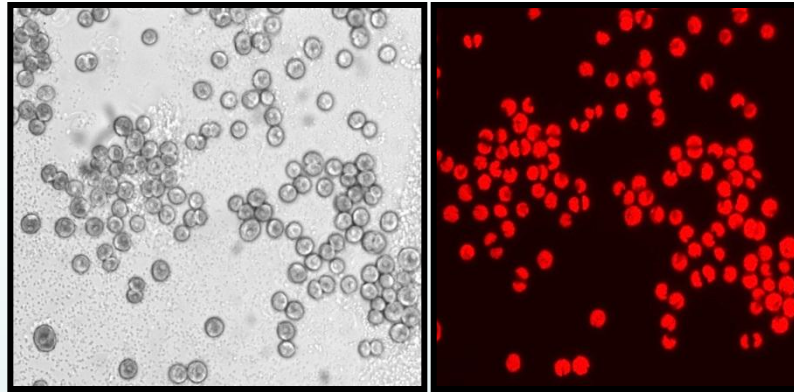
# RECuento DE MICROORGANISMOS HALÓFILOS MODERADOS



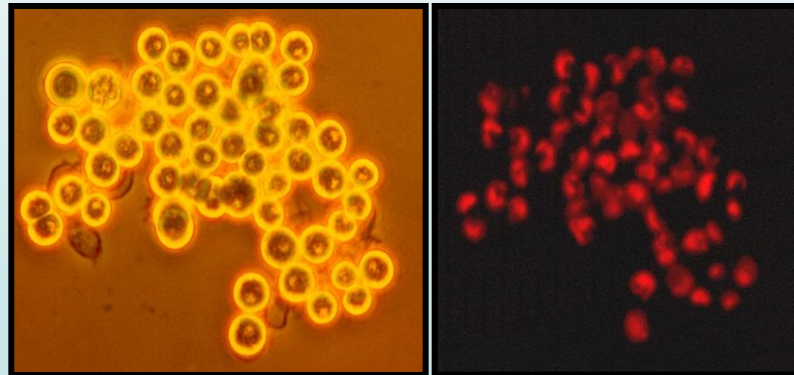
# INVESTIGACIÓN DE ALGAS Y CIANOBACTERIAS



# CIANOBACTERIAS Y ALGAS



*Synechocystis spp*



*Chlorococcum spp*

Microscopio de contraste  
de fase y de fluorescencia.  
Objetivo 40 x

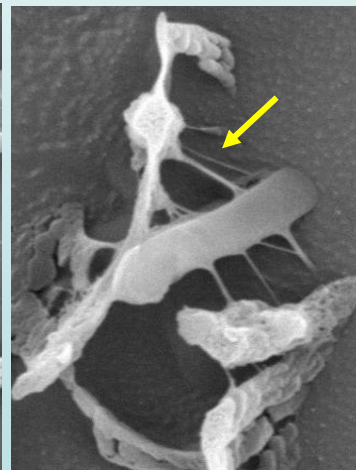
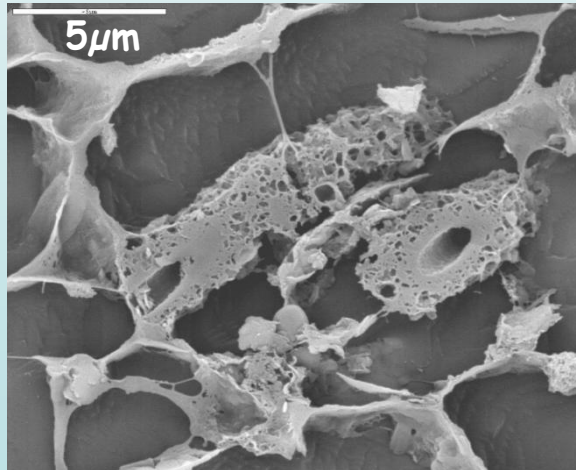
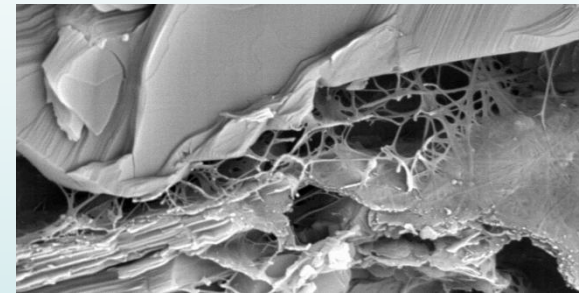
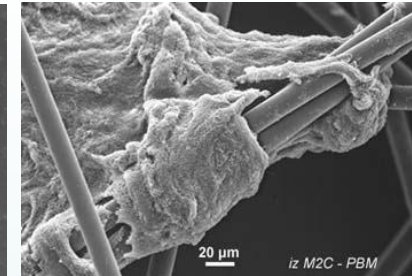
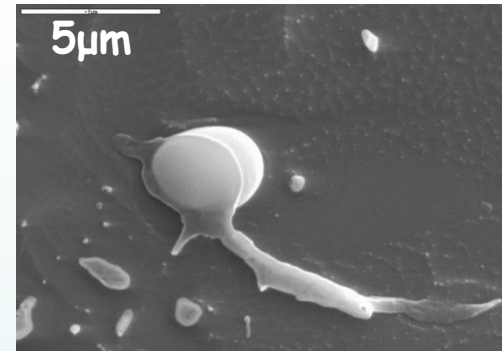
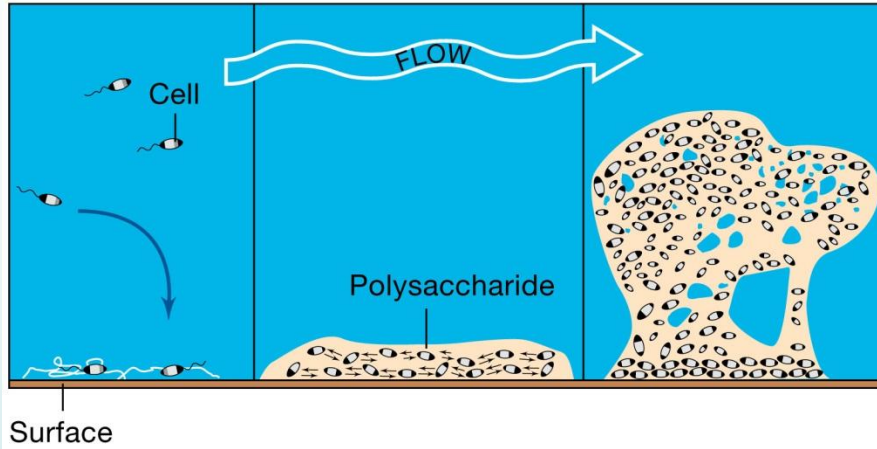


# TAPETES Y BIOFILMES

**Attachment**  
(adhesion of a few cells to a suitable solid surface)

**Colonization**  
(intercellular communication, growth and polysaccharide formation)

**Development**  
(more growth and polysaccharide)

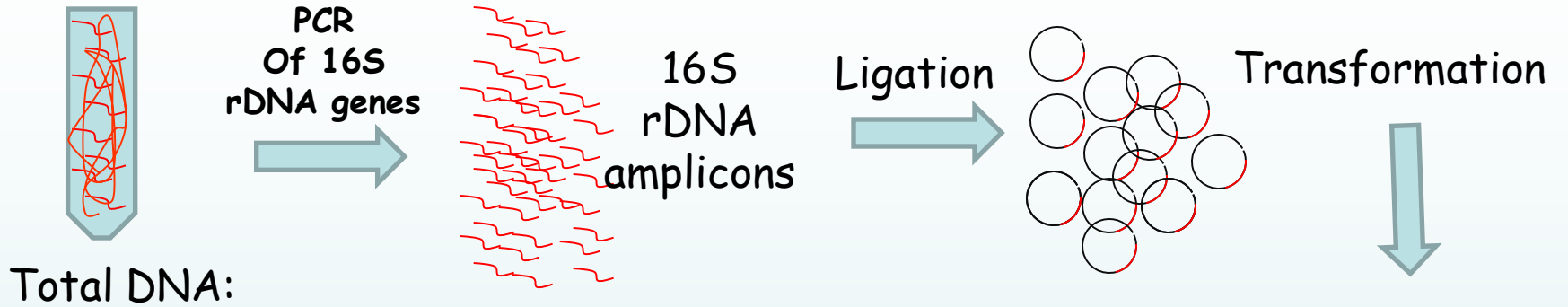


**LTSEM-BSE**, Microscopía Electronica de Barrido a Bajas Temperaturas en la modalidad de Electrones Retrodispersados

**Adaptación fisiológica inespecífica:**

- secreción exopolímeros
- ↓ capacidad de dividirse (SVNC)
- ↑ patogenicidad

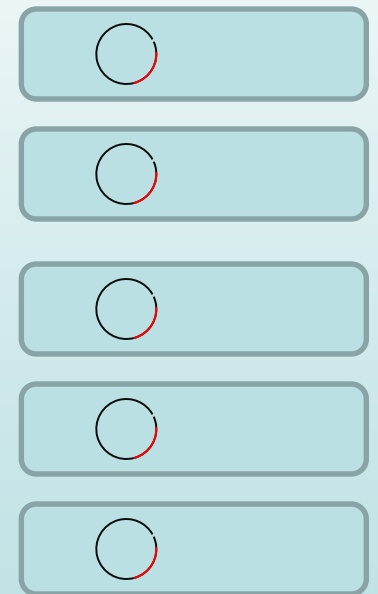
# Secuenciamiento genes ARN 16S



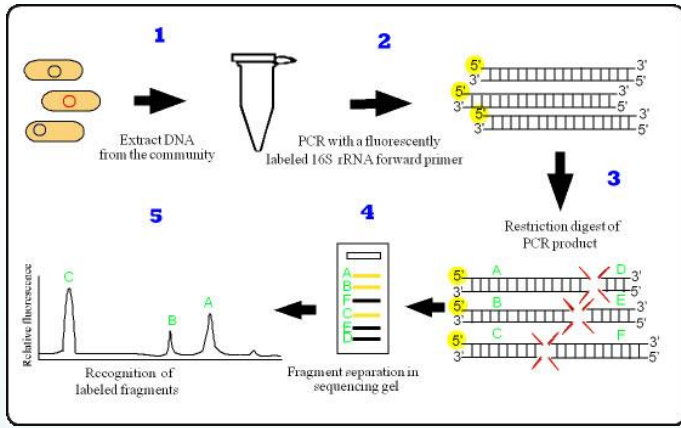
**Analysis**

**Sequencing**

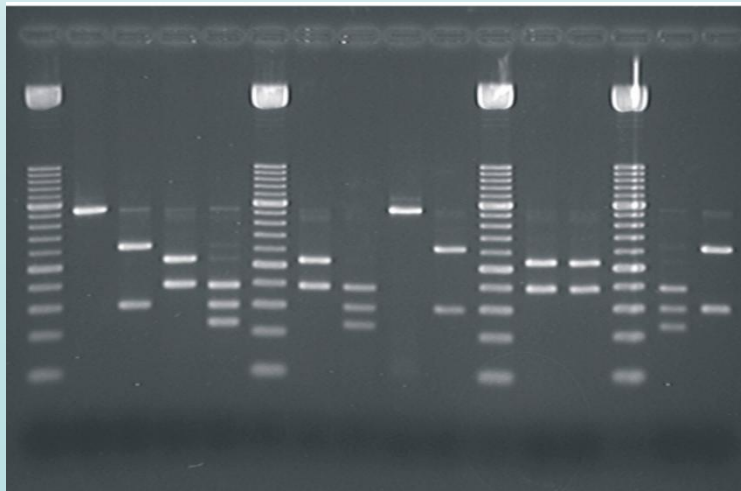
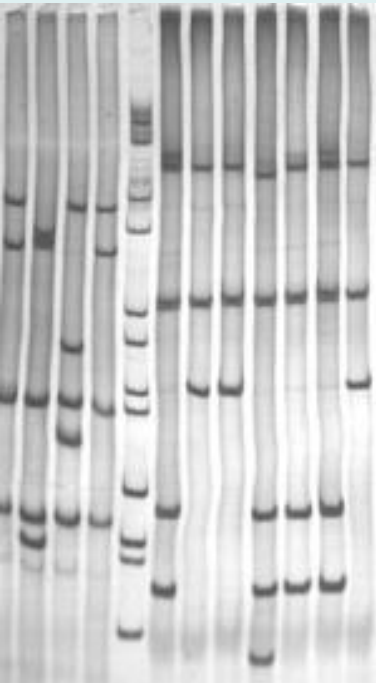
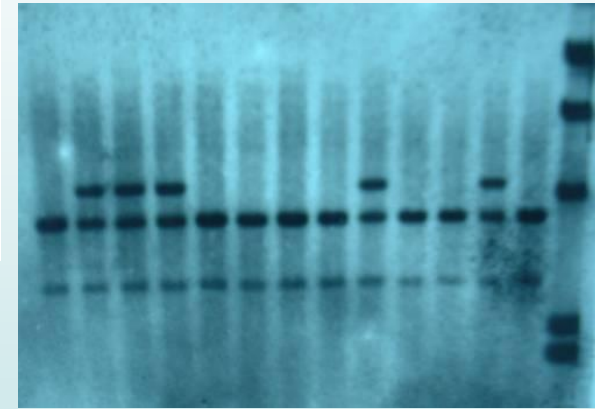
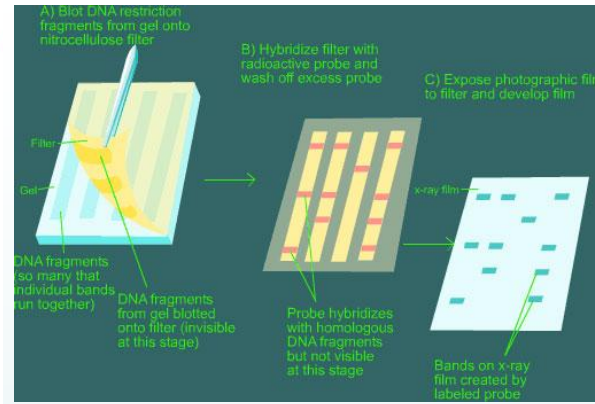
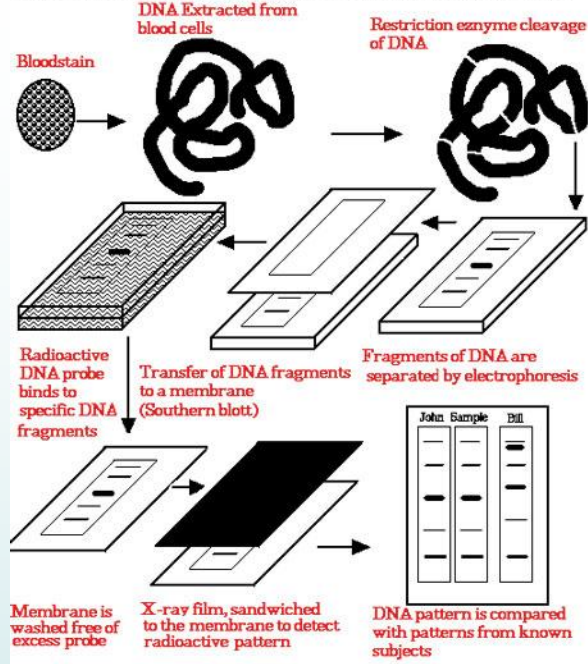
**Insert PCR**



(Giuseppe d'Auria)



### Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

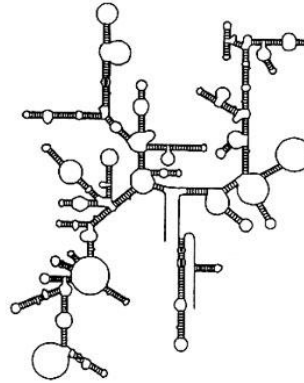


# DIVERSIDAD MICROBIANA Y ESPECIFICIDAD

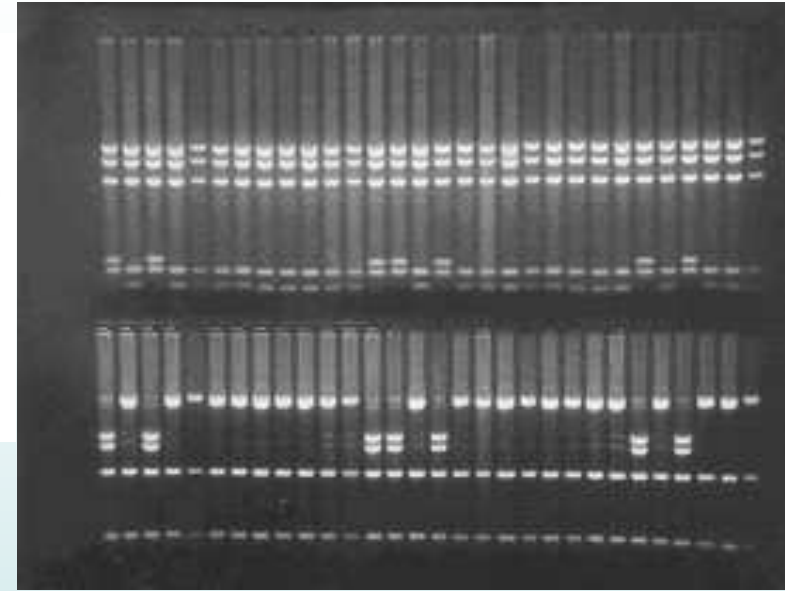
Ecosistemas de las aguas minerales muestran elevada diversidad microbiana  
fenotípica y genotípica



Microbiota autóctona de  
aguas minerales



16S rRNA



RFLP

Restriction Fragment Length Polimorphism

890 cepas: 378 ribotipos

↑nº de polimorfismos con inequívoca resolución de bandas en todos  
grupos, sp en cepas productoras pigmentos fluorescentes: 174 cepas: 72 rbt

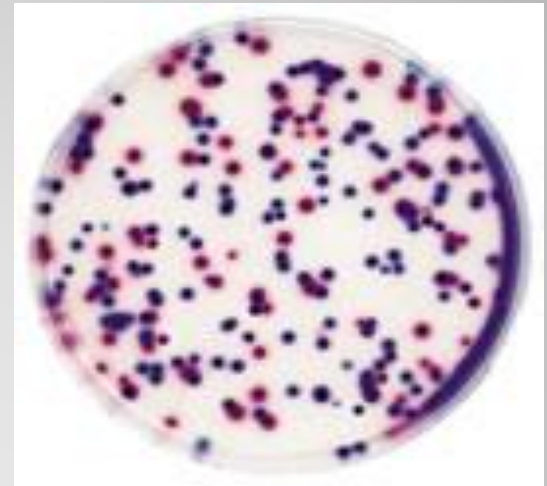
# Cabina de flujo laminar



# Identificación de cepas microbianas

- Observaciones de cultivo
- Observaciones microscópicas
- Evaluación bioquímica
- Evaluación fisiológica

# Aguas de uso farmacéutico



# Agua para uso farmacéutico

- Se basan en las farmacopeas
- Buenas prácticas de manufactura (GMP)
- Aseguramiento de la calidad



# Tipos de agua de uso farmacéutico

- Agua purificada
- Agua altamente purificada
- Agua para inyectables

# Limites microbiológicos

- Agua purificada
  - BH Menor de 100 UFC/ml (USP 30-FE-2007)
  - Endotoxina menor 0,25 EU/ml (FE-2007)
- Agua para inyectables
  - Menor de 10 UFC/ml (USP 30-FE-2007)
  - Endotoxinas menor 0,25 EU/ml (USP 30-FE-2007)
- Agua altamente purificada
  - Menor 10 UFC/ml (FE-2007)
  - Endotoxina menor 0,25 EU/ml (FE-2007)

# Pirogenos

## Pirógenos y endotoxinas

1. Cualquier compuesto que inyectado a mamíferos les de fiebre es un "Pirógeno"
2. Endotoxinas son pirogénicas, proviene de fragmentos de pared celular de bacterias gram negativas
3. Detectar endotoxinas usando un ensayo para lipopolisacáridos (*LPS*)
  - *la prueba del conejo detecta pirógenos*
  - *la prueba del LAL detecta endotoxinas*
4. Ultrafiltración, destilación, y OR pueden remover pirógenos

- Prueba del LAL
- Test de coagulación a 37° C por 1 hora
- Serie de diluciones reactivo LAL (Lymulus amebocyte lysate)
- Test Pyrosate, Combrex y Pirógeno

# Limites microbiológicos del agua en la industria farmacéutica

Localización del muestreo	Objetivo	Alerta	Acción
Agua bruta	200	300	500
Después de filtrada a través de medios múltiples	100	300	500
Después del suavizante	100	300	500
Después del filtro de carbón activado	50	300	500
Alimenta al OR	20	200	500
Permeado de OR	10	50	100
Puntos de uso	1	10	100

Ufc/ml

# Tratamiento del agua

Agua  
cruda

Cribado

Sedimentación

Cámara de  
mezcla del  
floculante

Clarificador

Canales de  
sedimentación

Cámara de  
floculación

Cloración

Almacenamiento

Distribución

# Desinfección de los sistemas de agua en la industria farmacéutica

## Desinfección (1)

### Calor

- Uno de los métodos más confiables de desinfección de los sistemas de agua

### Ozono

- Producido fácilmente
- No deja residuo

## Desinfección (2)

### UV

1. UV no “esteriliza”
2. Tasa de flujo crítica
3. Recontaminación post-irradiación podría ser un problema
4. Lámparas tienen vida finita

### Otros productos químicos

1.  $\text{XO}_2$
2. Halógenos
3. Formaldehído

# Bibliografía

- OMS (2004). Guía para la calidad del agua potable. OMS
- WHO (2005). Good manufacturing practices. Serie (Report 39)
- USP (2007). Pharmacopeia.
- European Pharmacopeia. 6th edition, 2007