



DETECCIÓN Y RECUENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA AGUAS CLORADAS, NTC 5594.

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá

Código: D-7.2-01

Versión: 05

Revisor: Subdirector de Planeación y O.T.

Aprobó: Director General (E).

Fecha: 09 de Julio de 2025

Fecha: 09 de Julio de 2025

Resolución: 100-03-10-23-1338-2025

Páginas: 1 de 7

1. DESCRIPCIÓN

Las *Pseudomonas* son bacilos gram negativos rectos o ligeramente curvos (0,5 - 1,0 x 1,5 – 5,0 micras) que se mueven por medio de flagelos polares, no fermentadores, que emplean relativamente pocos hidratos de carbono (glucosa, ribosa y gluconato) mediante metabolismo oxidativo. Algunas *Pseudomonas sp.* producen pigmentos difusibles (piocianina “azul”, fluoresceína “amarilla”, o piorrubina “roja- parda”). Estos microorganismos son ubicuas, encontrándose en el suelo, la materia orgánica en descomposición, la vegetación y el agua; entre otras. La amplia distribución ambiental de *Pseudomonas sp.* está favorecida por sus requerimientos simples para su crecimiento. Estos gérmenes pueden usar más de 30 sustancias orgánicas como fuente de carbono y nitrógeno y algunas cepas son capaces de crecer incluso en el agua destilada.

Es un patógeno oportunista por excelencia y el agente etiológico principal de infecciones en vías urinarias, intestino, oído y heridas. Por su relativa resistencia al cloro es considerado un indicador de eficiencia de la cloración en agua tratada, por lo que su presencia en sistemas de almacenamiento, tanques, y cisternas, responde a un estado deficiente de dichas instalaciones. El control de *Pseudomonas sp.*, al igual que el de bacterias aeróbicas, debe intensificarse en redes expuestas a contaminación o cuando se comprueba cloración deficiente.

2. ALCANCE

Este método permite el aislamiento y el recuento de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de agua embotellada, mediante la técnica de filtración por membrana. Además es aplicable a otros tipos de aguas con una flora subyacente más baja, tales como: aguas de piscina y aguas destinadas al consumo humano.

3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

3.1 Principio

Este método se fundamenta en determinar el número de microorganismos de la especie *Pseudomonas aeruginosa* presentes en una muestra de agua, por medio de la filtración de la misma a través de una membrana filtrante con poros de tamaño adecuado (0,45µm de diámetro), la consiguiente retención de los microorganismos sobre dicha membrana y el cultivo de los mismos en el medio y temperatura apropiados.

El Agar cetrimide es un medio de cultivo selectivo y diferenciador en la detección de *Pseudomonas aeruginosa*. Este medio cuenta con la sal cuaternaria Bromuro de Cetiltrimetilamonio – cetrimide, que actúa como inhibidor de flora acompañante como *Klebsiella*, *Proteus* y *Providencia spp.* Además de suplementos de cloruro de

magnesio y el sulfato de potasio que mejoran la producción de piocianina un pigmento diferenciador producida por la especie de *P. aeruginosa*.

3.2 Interferencias

La interferencia para esta prueba consiste en que la flora acompañante de las *Pseudomonas sp.* puede limitar la correcta recuperación del microorganismo de interés, pero esta se subsana con el medio de cultivo que está diseñado para inhibir flora acompañante.

4. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

La muestra es tomada en frasco schott estéril con tiosulfato de sodio al 10% para piscinas y 3% para aguas de consumo con capacidad de volumen de 250 a 500 mL y debe ser analizada las siguientes 24 horas después de la toma, su conservación se hace guardándose en nevera a temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$, refrigerada mas no congelada. Filtrar de 100 a 200 ml para aguas de consumo y 500 ml para aguas de piscina, o una dilución de la misma de 1 mL en 99 mL de solución tampón.

5. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

- Manifold para filtración.
- Bomba de vacío.
- Papel kraft.
- Autoclave.
- Membranas de 0,45 micras estériles.
- Pinzas estériles.
- Incubadora.
- Cuenta colonias.
- Horno de esterilización.
- Asa de aro.

6. REACTIVOS

- Agar Cetrimide.
- Ácido Nalidíxico.
- Glicerina.
- Agar Milk.
- Agar M-PA-C.

7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Agar Cetrimide: Agar selectivo para el aislamiento y diferenciación de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de diversos materiales, el Cetrimide sirve para la inhibición de la flora acompañante. Para aumentar el efecto inhibidor de la flora

acompañante, se recomiendan añadir 15 µg/mL de Ácido Nalidíxico.

Preparación: Disolver 44,5 g/litro, añadir 10 mL/Litro de glicerina, esterilizar en autoclave (15 min. a 121°C) y verté en placas. Las placas con medio de cultivo son turbias y ligeramente amarillas. pH 7,2 +/- 0,2.

Agar Milk:

Mezcla A: Leche desnatada instantánea 100 g en 500 mL de agua grado reactivo.

Mezcla B: 12,5 g de caldo nutritivo, 2,5 g de cloruro de sodio, 15 g de agar en 500 mL de agua grado reactivo.

Preparar y esterilizar separadamente las mezclas, enfriar rápidamente a 55 °C y combinarlas en condiciones asépticas. Dispensar en cajas de Petri de 20 a 25 mL.

Agar M-PA-C BBL: Suspender 35 g de medio deshidratado en 1 L de agua purificada. Mezclar bien, calentar y agitar vigorosamente hirviendo la solución durante 1 min. Este medio no se autoclava y se debe usar 7 días posterior a la preparación. Ajustar el pH a 7,1± 0,2.

8. PROCEDIMIENTO

- Filtrar de 100 a 200 ml para aguas de consumo y 500 ml para aguas de piscina, o una dilución de la misma de 1 mL en 99 mL de solución tampón (Agua peptonada tamponada), a través de una membrana de 0,45 micras.
- Colocar cada membrana sobre agar Cetrimide-Nalidíxico (CN) vertido en la placa de tal forma que no haya aire entre la membrana y la superficie del agar.
- Invertir los platos e incubar a 35 °C por 48 a 72 horas, pues a esta temperatura crecen escasamente muchos de los gérmenes que forman la flora acompañante. Típicamente las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* tienen un diámetro entre 0,8-2,2 µm, son de apariencia plana con forma de llantas y de color azul-verde, al igual de producir fluorescencia cuando son expuestas a luz UV. Algunas colonias de *Pseudomonas aeruginosa* pueden presentar una coloración marrón-rojizo o ser fluorescentes sin presentar color verde-azul en el medio CN, en este tipo de casos se requiere realizar pruebas confirmatorias para descartar la presencia de este microorganismo.
- En caso de usar agar M-PA-C, invierta las placas e incube a temperatura de 41,5±0,5°C durante 72 horas. En agar M-PA-C, por lo general, las colonias de *P. aeruginosa* tienen un diámetro de 0,8 mm a 2,2 mm y su apariencia es plana con anillos externos y centros de color marrón a negro verdoso. Se deben contar las colonias típicas, de preferencia las provenientes de filtros que contengan de 20 a 80 UFC.

Confirmación:

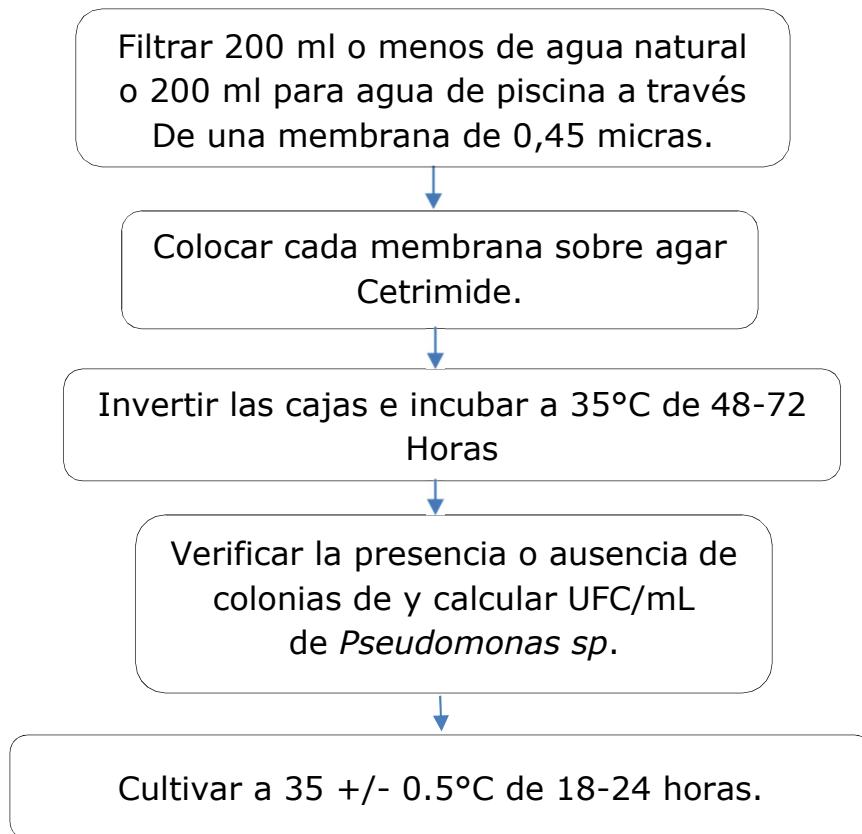
- Para la confirmación de colonias atípicas, se hace resiembra de estas en agar

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.2-01	Versión: 05	Página: 3 de 7

nutritivo y se incuba durante 22 ± 2 horas a 36 ± 2 °C. Se verifica la pureza de los subcultivos y se realiza el ensayo de reacción de oxidasa sobre aquellas colonias que inicialmente presentan una coloración marrón – rojiza o fluorescencia al ser expuestas a luz UV.

- De igual forma se utiliza agar Milk para confirmar las colonias presuntivas; para esto, las colonias aisladas son sembradas sobre este medio e incubadas a 35 ± 1 °C durante 24 horas. Las *Pseudomonas aeruginosa* hidrolizan la caseína y producen un pigmento de color amarillento a verde.
- El número estimado de *Pseudomonas aeruginosa* se obtiene mediante el recuento de la cantidad de colonias características formadas sobre el filtro de membrana después de su incubación, es decir, aquellas colonias capaces de producir piocianina o aquellas colonias oxidasa positiva, que presente fluorescencia bajo radiación UV y son capaces de hidrolizar la caseína.

9. ALGORITMO



10. CÁLCULOS Y RESULTADOS

El reporte se realiza en unidades de UFC/mL.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\# \text{ de colonias positivas contadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen de siembra}}$$

11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

Con el fin de descartar cualquier contaminación externa, se realiza un control negativo que garantice una correcta esterilidad en el proceso de preparación y montaje del método.

Control Negativo: Corresponde al control del medio de cultivo sin inocular (Agar Cetrimide, Agar M-PA-C, Agar Milk). Se realiza por lote de medio preparado.

Control Positivo: Se realiza por lote de medio preparado con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, para esto 100 mL de agua estéril son inoculados con una concentración de 10 a 100 bacterias/mL, esperando obtener colonias verde-azules en agar Cetrimide – Nalidíxico y colonias de color marrón a negro verdoso en agar M-PA-C.

Control especie - especificidad: como microorganismos interferentes se utilizan, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 que son los microorganismos comúnmente encontrados en sistemas de aguas cloradas. Se realiza por lote de medio preparado.

Se realiza un duplicado de muestra por día; tomando una muestra al azar.

Ánálisis de Efecto matriz: se realiza mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de una muestra de agua añadida con una concentración de 10-100 bacterias/mL de *Pseudomonas aeruginosa*.

$$\%R = (\bar{x} \text{ muestra inoculada}) / (\bar{x} \text{ cepa} + \bar{x} \text{ muestra}) \times 100$$

Dónde:

$\%R$ = Porcentaje de recuperación.

\bar{x} = Promedio de la concentración.

El efecto matriz es analizado cada vez que ingresa una matriz diferente de agua recreacional para análisis de *Pseudomonas*.

Todo el control de calidad realizado se registra en el formato “R-7.4-19: CAPTURA DE DATOS *Pseudomonas aeruginosa*” en orden cronológico.

12. MANTENIMIENTO

El mantenimiento de las incubadoras se realiza entre 12 a 18 meses de acuerdo a lo evaluado por el laboratorio.

13. BIBLIOGRAFÍA

- NTC 5594, 2008. Calidad del Agua, Detección y recuento de *Pseudomonas aeruginosa* por el método de filtración por membrana.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps Wc, Braunt-Howland Eb, Baxter Te. Eds. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 24th Ed. Washington Dc: APHA PRESS;2023.
- MERCK. 1994. Manual de medios de cultivo. Agar Cetrimide. Pág 73-74.

14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
12/12/2014	300-03-10-23-1864	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-01: MÉTODO ANALÍTICO DETERMINACIÓN DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA POR FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA AGUAS CLORADAS, SM 9213 B.
05/10/2016	300-03-10-23-1303	02	Se actualiza el logo corporativo.
15/08/2018	300-03-10-23-1436	03	Se cambia el método de referencia SM empleado para la realización de la detección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por la norma NTC 5594 de 2008 para la detección y el recuento de <i>P. aeruginosa</i> por filtración por membrana. De acuerdo al Standard Methods Ed.23 de 2017 y a la NTC 5594 de 2008 se especifican los siguientes cambios: En la sección de TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO se ajusta la concentración de tiosulfato usado para declarar muestras de agua de consumo, además se cambia la temperatura de transporte y almacenamiento de acuerdo al SM y se mencionan volúmenes de trabajo de acuerdo a la naturaleza de la muestra a procesar. En la sección de REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE REACTIVOS se adicionan el Agar Milk y el Agar M-PA-C. Se ajusta el PROCEDIMIENTO y el ALGORITMO de acuerdo a los lineamientos consignados en la NTC 5594/2008. La sección de SEGUIMIENTO Y CONTROL se reestructura de acuerdo a los requerimientos dados desde el SM y la NTC guías, indicando: Control Negativo, Control Positivo, Control especie-especificidad y Análisis de efecto matriz.
19/11/2019	300-03-10-23-1429	04	Se elimina la subsección 3.2 - Definición y se unifica con el criterio de descripción de la sección 1. Por otro lado, se adiciona dentro de la estructura del método la sección 2 – ALCANCE, así: “Este método permite el aislamiento y el recuento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en muestras de agua embotellada, mediante la técnica de filtración por membrana. Además, es aplicable a otros tipos de aguas con una flora subyacente más baja, tales como: aguas de piscina y aguas destinadas al consumo humano”. También se incluye la sección 12 -

			<p>MANTENIMIENTO relacionado con el método. Se cambia la codificación del documento pasando de D-5.4-01 a D-7.2-01 de acuerdo a la nueva versión de la Norma – ISO/IEC 17025:2017, así como también se modifica el respectivo formato de captura de datos referenciado en éste.</p>
09/07/2025	100-03-10-23-1338	05	<p>Se actualizó el ítem 13 Bibliografía, edición 24 th de Standard Methods (2023).</p>

Última línea-----última línea-----última línea