

7. MUESTREO DE AGUAS SUBTERRÁNEAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

7.1. Elección de los puntos de muestreo

7.2. Equipos de muestreo

7.3. Muestreo y conservación de las muestras

7.4. Fundamentos de los análisis microbiológicos

7.- MUESTREO DE AGUAS SUBTERRÁNEAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

El muestreo para análisis microbiológicos requiere unas técnicas y precauciones diferentes que el muestreo para análisis químicos.

En este capítulo se describirán las diferentes técnicas de muestreo y se destacarán las diferencias con el muestreo para análisis químicos.

El ITGE ha publicado una guía titulada "Guía operativa para la recogida, almacenamiento y transporte de muestras de aguas subterráneas destinadas al análisis químico y bacteriológico" en la que se trata el tema abordado en este capítulo con mas profundidad

7.1.- ELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO

En un pozo de agua, especialmente si no se bombea agua con regularidad, puede haber una flora bacteriana muy diferente a la existente en el acuífero. A modo de ejemplo citaremos algunas posibles causas:

- Las diferentes condiciones de oxigenación
- La posible decantación de partículas de materia orgánica.

- La contaminación por la boca del pozo, debido a:

* Vertidos intencionados

* Excrementos de aves que se posan en el brocal.

* Drenaje del terreno hacia el pozo.

* Pérdidas de aceite o gas-oil del grupo motobomba

- En pozos excavados abiertos, en los que el agua está expuesta a la luz solar, se produce una proliferación de algas que al morir se pudren.

Por ello, siempre que sea posible se muestrearán manantiales o pozos adecuadamente sellados y que bombeen agua regularmente. En caso contrario se aconseja extraer un volumen de agua varias veces el almacenado en el pozo (al menos tres veces) antes del muestreo

Recordemos que las aguas subterráneas se depuran por decantación, por lo que un fuerte bombeo puede provocar por removilización un aumento del contenido microbiano no representativo del acuífero.

7.2.- EQUIPOS DE MUESTREO

Si el punto a muestrear tiene un equipo de extracción que funciona con regularidad, se podrá utilizar éste para la toma de una muestra representativa

Si la instalación permanente no permite el muestreo cerca del pozo, o en estudios

específicos en los que el propio equipo de extracción puede ser fuente de contaminación (p. ej. bacterias ferroxidantes) se puede sacar la muestra con un tomamuestras o bomba de succión después de haber renovado el agua con el equipo fijo del pozo.

Existe una variedad de dispositivos de extracción para pozos no equipados. De más sencillos a más sofisticados se tienen:

- Botellas tomamuestras. No permiten renovar la columna de agua del pozo. Las hay de varios tipos; los más sencillos solo permiten tomar la muestra de la parte superior de la lámina de agua. Muchas pueden ser esterilizadas, y todas desinfectadas

- Tubo con válvula de fondo. Se coloca una válvula de no retorno en el extremo inferior de una tubería que se introduce en el sondeo, y se extrae el agua por agitación manual de esta tubería. El conjunto puede ser esterilizado y tener un diámetro reducido, pero no permite renovar la columna de agua del pozo a no ser utilizando agitadores mecánicos

- Bombas de succión. Varían desde bombas peristálticas de pequeño caudal hasta bombas centrífugas con motor de gasolina que permite renovar el agua del pozo. Solo sirven si el nivel del agua está a menos de 8 metros de profundidad. Se puede esterilizar el tubo de aspiración e intercalar una botella antes de la bomba o desinfectar el conjunto, lo que es más práctico

- Equipos de elevación por aire comprimido (air-lift). No garantizan la conservación de las condiciones redox del agua a muestrear. Permiten por el contrario

renovar la columna de agua del pozo para muestrear después por otro sistema. Se pueden desinfectar pero no esterilizar.

- Bomba de desplazamiento positivo del agua con aire comprimido: la exposición del agua al aire es menor que con "airlift" pero los caudales también. Se pueden desinfectar pero no esterilizar.

- Bombas de pistón accionado por aire. No hay contacto con el aire. Su principal inconveniente es su elevado precio.

- Bombas eléctricas sumergibles. Permiten extraer grandes volúmenes de agua. Su inconveniente es su elevado precio y poca transportabilidad.

Desde el punto de vista práctico, lo más sencillo es utilizar botellas tomamuestras. La esterilización e incluso desinfección del equipo de muestreo entre dos muestras consecutivas es una labor engorrosa, por lo que se aconseja utilizar varios tomamuestras, idealmente uno para cada punto a muestrear.

7.3.- MUESTREO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras han de recogerse siempre en envases estériles. Lo ideal son recipientes de vidrio con tapón de rosca que cierren herméticamente, que previamente se esterilizan en autoclave. Existen en el mercado recipientes de plástico estériles de un solo uso, para recogida de muestras de orina. Se pueden usar estos recipientes, pero es necesario tener en cuenta que

muchos de ellos no son perfectamente herméticos por lo que no garantizan la adecuada conservación de la muestra

En el momento del muestreo es necesario tener en cuenta que en el aire, nuestras manos y nuestro aliento hay microorganismos, por lo que las botellas han de estar abiertas el menor tiempo posible, y hay que evitar tocar su interior y los bordes de la botella con las manos o cualquier objeto. Si se investigan bacterias aerobias (es lo habitual) no es necesario llenar hasta arriba los recipientes. El análisis de anaerobios estrictos requiere precauciones especiales para evitar el contacto de la muestra con el aire

Tras el muestreo las botellas deben permanecer en posición vertical para prevenir la posible falta de estanqueidad. No se debe poner teflón o similar a la rosca puesto que se contaminaría la muestra. Es conveniente refrigerar la muestra inmediatamente a la toma, especialmente en verano. Es habitual el uso de neveras de campo con hielo o acumuladores térmicos

El tiempo transcurrido entre el muestreo y la siembra de las placas no debe ser superior a 6 horas (12 horas si las muestras están adecuadamente refrigeradas). Se recomienda que la siembra siempre se haga el mismo día que el muestreo. Esto da lugar a problemas logísticos, dado que hay laboratorios que no aceptan la entrada de muestras los jueves y viernes para no tener que trabajar el sábado y domingo (las placas hay que leerlas a las 24 y 48 horas).

7.4.- FUNDAMENTOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Existen dos técnicas básicas para determinar las bacterias existentes en una muestra de agua o suelo. La primera de ellas es la observación directa al microscopio (normalmente sobre muestras teñidas) y la segunda el cultivo en un medio adecuado en el que las bacterias proliferan formando colonias visibles a simple vista, también puede detectarse la presencia de determinadas bacterias o grupos afines mediante el cultivo en medios especiales y la observación de reacciones específicas (producción de ácido, producción de gas, empleo de sustratos de crecimiento especiales). El recuento puede hacerse directamente sobre las placas de cultivo o sembrando diluciones en tubos y contando los tubos que dan reacción positiva (NMP o técnica del número más probable).

También puede utilizarse el método de filtración en el que la muestra se pasa a través de un filtro de 0,45 micras, reteniendo los microorganismos, este filtro se deposita directamente sobre una placa con el medio de cultivo apropiado

Otras técnicas cuya aplicación no está tan generalizada evalúan el contenido en microorganismos por medidas indirectas, como análisis de enzimas, ATP, ADN, bioluminiscencia, etc, o técnicas especiales como el ensayo de *Limulus* para bacterias gram-negativas o contadores de partículas microelectrónicas.

Los métodos de análisis de aguas destinadas a consumo se basan en el cultivo en medios nutritivos. Básicamente, se añade

una cantidad de agua a un preparado nutritivo, donde proliferan las bacterias (si las hay), dando lugar a colonias visibles a simple vista. Al cabo de un cierto tiempo se cuenta el número de colonias formado, dando el resultado en unidades formadoras de colonias (UFC).

Es importante tener presente que una unidad formadora de colonias no siempre se corresponde con una bacteria (u hongo, alga, etc). Si tenemos una partícula de materia orgánica rodeada de bacterias que la emplean como fuente de energía y materia prima, dará

lugar a una única colonia, independientemente del número de bacterias. Por esta y otras razones no hay una correspondencia directa entre los análisis realizados con medios de cultivo y las observaciones al microscopio, siendo estas últimas por lo general, de varios órdenes de magnitud mayores.