

NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire

Méthode pour le comptage des bactéries et des champignons dans l'air
Method for airborne bacteria and fungi counting

Vigencia	Actualizada por NTP	Observaciones	
Válida			
ANÁLISIS			
Criterios legales		Criterios técnicos	
Derogados:	Vigentes:	Desfasados:	Operativos: SI

Redactora:

M^a del Carmen Martí Solé
Licenciada en Farmacia

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO

Esta Nota Técnica de Prevención expone la metodología correspondiente a la toma, transporte y conservación de muestras de aire para la determinación de bacterias y hongos, así como el fundamento del método analítico, su campo de aplicación y sus limitaciones.

Fundamento del método

El método se basa en el muestreo del aire problema mediante el aparato SAS (Surface Aire System) compact. De los muestreadores descritos en la NTP-203, se escogió éste por ser de fácil manejo, portátil y que permite elegir el medio de cultivo adecuado a cada requerimiento.

El aire muestreado se hace incidir sobre un medio de cultivo determinado, según se pretendan valorar bacterias u hongos. Posteriormente se procede a la incubación a una temperatura adecuada y finalmente se efectúa el contaje de colonias expresando el resultado en ufc/m³ (unidades formadoras de colonias por metro cúbico).

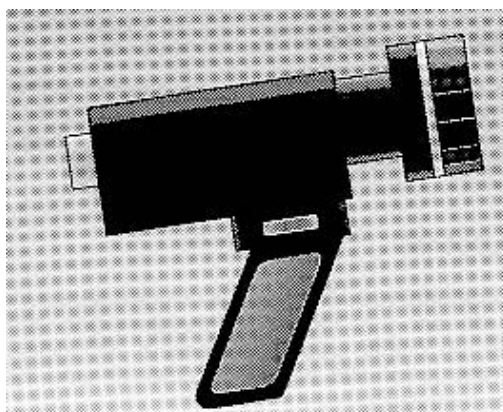


Fig. 1

Reactivos y productos

Todos los reactivos deben tener como mínimo la especificación "para análisis".

El agua utilizada ha de ser bidestilada o de calidad equivalente.

Medios de cultivo

Triptisoy Agar (TSA)

Es un medio de cultivo sólido compuesto por:

- Peptona de caseína.....15,0 g/l
- Peptona de soja.....5,0 g/l
- Cloruro sódico.....5,0 g/l
- Agar-Agar.....15,0 g/l
- pH del medio a punto de uso: 7,3 aproximadamente

Preparación del medio:

Añadir 40 g de esta mezcla a un litro de agua destilada. Dejar embeber y llevar a ebullición hasta disolver totalmente el agar. Esterilizar al autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Con esta preparación llenar las cápsulas de Petri, haciéndolo en el ambiente estéril de la cámara de bioseguridad, dejar enfriar y una vez solidificado el medio colocar las cápsulas 24 horas en la estufa de cultivo a 37°C. Pasado este tiempo se observan las placas desechando las que presenten contaminación.

Agar de sabouraud con cloranfenicol

Es un medio de cultivo sólido, específico para hongos, compuesto por:

- Peptona de caseína..... 5,0 g/l
- Peptona de carne..... 5,0 g/l
- D (+) Glucosa..... 40,0 g/l
- Cloranfenicol..... 0,5 g/l
- Agar - agar..... 15,0 g/l
- pH del medio a punto de uso: 5,6, aproximadamente

Preparación del medio:

Suspender 65,5 g de la mezcla en un litro de agua destilada y llevar a ebullición. Esterilizar al autoclave durante 10 minutos a 121°C. Evitar el sobrecalentamiento que afectaría a la gelificación. Una vez distribuido en placas de Petri hacer la prueba de esterilidad como se ha explicado en el punto anterior.

Solución de Armil al 1/1000

Se disuelve 1 ml. de Armil en 1 litro de agua.

Aparatos y material

Muestreador de aire . "SAS compact"

Tal como se describe en el punto 5 de la Nota Técnica de Prevención nº 203, existen diferentes tipos de muestreadores de aire para contaminantes biológicos. En la presente NTP se expone el procedimiento a emplear con el equipo "SAS compact" (ver la figura 1, cuyas características son las siguientes:

- El aire a examinar es aspirado a una velocidad fijada durante un tiempo variable, a través de una cubierta de protección perforada con múltiples agujeros pequeños de diseño especial.
- El flujo de aire es dirigido sobre la superficie de una cápsula de Petri del tipo "Rodac", que contiene el medio de cultivo adecuado para el examen microbiológico que se desee hacer.
- El aparato es transportable, funciona con batería recargable y el control del tiempo de funcionamiento es programable.

Placas de cultivo

Se utilizan las placas tipo "Rodac", útiles también para análisis de superficies.

Estufas de cultivo

Estufa de cultivo a 37°C de temperatura, para el cultivo de bacterias.

Estufa de cultivo a 28°C de temperatura, para el cultivo de los hongos.

Contador de colonias

Autoclave

Campana de seguridad biológica Bio - II - A

Contenedores para residuos biológicos

Procedimiento de análisis

Toma de muestra

Antes de empezar a tomar la muestra con el "SAS compact" ha de esterilizarse la cubierta del aparato. Ésta puede llevarse a cabo por medio del autoclave durante 20 minutos a 21 atmósferas. También se puede efectuar limpiando la cubierta del aparato con una solución desinfectante.

A continuación se coloca la cápsula de Petri en el lugar indicado del aparato de muestreo. Para manejar las cápsulas de Petri (conteniendo ya el medio de cultivo) y el muestreador se recomienda hacerlo con guantes estériles desechables. Después de cada bloque de toma de muestras, limpiar la cubierta del muestreador con una solución desinfectante, teniendo la precaución de que se haya secado totalmente antes de tomar una nueva muestra.

El aparato dispone de un conector de control de tiempo, dividido en unidades que van de 1 a 15, representando cada una de ellas un tiempo de 20 segundos. El volumen de aire muestreado en cada unidad es equivalente a 30 litros, lo que implica que se pueden realizar muestreos de una duración de 20 segundos hasta 5 minutos y con unos volúmenes de 30 a 450 litros de aire.

El tiempo y el volumen de muestreo dependen de la contaminación ambiental que se sospeche. Cuanto mayor sea ésta, menor es el tiempo de muestreo que se debe aplicar y viceversa.

Medios de cultivo

Triptisoy-agar

Se utiliza este medio de cultivo para efectuar el contaje de bacterias. Una vez tomada la muestra, se trasladan las cápsulas de Petri al laboratorio, dejándolas en la estufa de cultivo a 37°C durante 48 horas.

Agar-Sabouraud con cloranfenicol

Se utiliza este medio de cultivo para efectuar el contaje de hongos. Una vez tomada la muestra, se trasladan las cápsulas de Petri al laboratorio dejándolas en la estufa de cultivo a 28°C durante 5 días.

Recuento de colonias

Pasado el tiempo de incubación, se observa el crecimiento de las colonias y se procede al recuento de las mismas mediante un contador de colonias que proporciona el número de colonias formadas por placa.

Cálculos

Una vez determinado el número de colonias, y sabiendo el flujo de aire y el tiempo de muestreo que se ha aplicado, se puede calcular el número de unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire, aplicando la fórmula siguiente:

$$n^{\circ}\text{ufc}/\text{m}^3 = \frac{\text{NC} \times 1000}{30 \times \text{NU}}$$

siendo:

NC: número de colonias por placa

NU: número de unidades de tiempo empleadas en el muestreo

Las cápsulas de Petri una vez llevado a cabo el recuento se retiran del laboratorio empleando un contenedor de residuos biológicos.

Campo de aplicación

En lugares que, por el tipo de trabajo que se realiza en ellos, no precisan ser estériles, se recomienda llevar a cabo el recuento de hongos y bacterias en aire cuando exista una sintomatología en la población expuesta que sugiera una posible contaminación biológica causada por estos microorganismos.

Cuando el n° de ufc/m³ hallado sea superior a 500 se recomienda efectuar la identificación de los gérmenes existentes en el aire muestreado.

En ambientes considerados estériles el n° de ufc/m³ debe ser 0.

Bibliografía

(1) ACGIH, COMMITTEE ACTIVITIES AND REPORTS

Airborne viable microorganisms in office environments: sampling protocol and analytical procedures
Applied Industrial Hygiene 1(4) R19-R23 (1986)

(2) ACGIH, COMMITTEE ACTIVITIES AND REPORTS

Guidelines for assessment and sampling of saprophytic bioaerosol in the indoor environment

Applied Industrial Hygiene 2(5) R10-R16 (1987)

(3) ACGIH, COMMITTEE ACTIVITIES AND REPORTS

Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment

ACGIH, Cincinnati, Oh. USA, 1989.

(4) ADSA-MICRO

Manual de medios de cultivo para microbiología

ADSA, Barcelona, 1989

(5) HERNÁNDEZ A., MARTÍ MA G

Contaminantes biológicos: evaluación en ambientes laborales. NTP 203

INSHT, Barcelona, 1988

(6) MARTÍ MA. C.

Evaluación de contaminantes biológicos en aire en una oficina pública. ITB /153.89

INSHT, Barcelona, 1989

(7) MARTÍ MA. C.

Evaluación de contaminantes biológicos en aire en un laboratorio dental. ITB /27.90

INSHT. Barcelona, 1990

(8) MARTÍ MA. C.

Determinación de contaminantes biológicos en ambientes cerrados

II Conferencia Nacional de Higiene Industrial. Valencia, 16-18, Noviembre 1988

(9) PBI INTERNATIONAL

Microbiological Control of the Air and Surface Environment. SAS (Surface Air System)

pbi international, Milán, Italia 1978