

APLICACION DE UN METODO BIOLOGICO EN LA COMPROBACION DEL SISTEMA DE TRATAMIENTO DE LIQUIDOS RESIDUALES EN UN LABORATORIO DE ALTA SEGURIDAD (BL 3)

N. González Sosa y L. Regalado Alfonso.

Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Apartado 23031, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 13 de diciembre de 1996.

RESUMEN. Se desarrolló un medio bioindicador como método biológico complementario de comprobación del sistema de tratamiento de líquidos residuales que permite evaluar la efectividad del tratamiento entre 8 y 16 h de incubación de la muestra, a diferencia de otras pruebas biológicas que necesitan de un mayor período de incubación (hasta 7 d).

ABSTRACT. A bioindicator was developed as a complementary biological method for testing the system of wastewater treatment. It allows to evaluate the effectiveness of the treatment within 8-16 h of incubation of the sample, unlike other biological tests that need a greater incubation period (up to 7 d).

INTRODUCCION

La bioseguridad como especialidad afín con las ciencias biológicas ha alcanzado un desarrollo notable paralelo al propio auge de la industria médico-farmacéutica y biotecnológica, lo que ha originado la introducción de equipos e instalaciones cada vez más complejos que requieren de un eficiente sistema de comprobación de su seguridad para la protección del personal y el medio ambiente.¹⁻⁵

El tratamiento de líquidos residuales que provienen de laboratorios de máxima seguridad es un requisito inviolable en el funcionamiento de éstos y se recomienda en los laboratorios de alta seguridad donde se trabaje con microorganismos que entrañen algún riesgo para el personal, la comunidad o el medio ambiente.^{4,5} Una violación en el régimen de tratamiento o cualquier accidente que provoque la liberación del material contaminado reduce la protección de esta barrera y pone en peligro la salud del personal, de los residentes más cercanos e incluso afecta el ecosistema, por eso el tratamiento de productos residuales debe ir acompañado de métodos de comprobación que garanticen su máxima calidad y que brinden una rápida información para adoptar las medidas necesarias.⁶

Los métodos biológicos de comprobación garantizan un control más exacto del tratamiento, pero requieren de mayor tiempo para su interpretación, el que puede ser incluso hasta de siete días, cuestión que se propuso mejorar este trabajo con el desarrollo de un medio bioindicador basado en la experiencia de su empleo en pruebas de controles de auto-claves^{7,8} y otros ensayos.^{9,10}

MATERIALES Y METODOS

Cepa y condiciones de cultivo

Se empleó la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633, mantenida en cepario para las comprobaciones periódicas del sistema de tratamiento de los desechos líquidos y sólidos del laboratorio.

El microorganismo (mo) se cultivó en medio de Agar Triptosa Soya (ATS) durante 48 h y se cosechó en solución salina 0,85 % (SS). Este concentrado fue conservado durante 7 días a 4 °C para facilitar la formación de esporas.

Preparación de bioindicadores

Se prepararon dos medios indicadores de cambio de pH.

Disolución A: compuesta por púrpura bromocresol, caldo triptona soya (CTS) y sacarosa.

Disolución B: compuesta por bromotimol azul, CTS y sacarosa.

En ambos medios se utilizaron diferentes cantidades del disacárido esterilizado por filtración (1 ; 1,5 y 2 %).

El concentrado de esporas se ajustó a diferentes concentraciones ($1 \cdot 10^1$ hasta $1 \cdot 10^8$ esporas/mL) en SS estéril y en líquido residual del laboratorio una vez comprobada su esterilidad. El ajuste de la concentración se realizó aplicando el método de diluciones decuples seriadas y se comprobó por conteo de colonias en placas de ATS.

Las disoluciones A y B se distribuyeron a razón de 4,5 mL en cada tubo de ensayos [(13X100) mm] con las diferentes concentraciones de sacarosa. Posteriormente, se procedió a contaminar artificialmente los medios indicadores con la suspensión de esporas con el empleo de una suspensión inicial a la concentración de $1 \cdot 10^8$ esporas/mL, de la que se tomaron 0,5 mL para cada uno de los tubos de ensayos con las diferentes concentraciones de sacarosa y se repitió el mismo procedimiento hasta alcanzar la concentración final de $1 \cdot 10^1$ esporas/mL.

Los bioindicadores inoculados se incubaron a 37 °Cp or 48h.

Para conocer si el contenido de los líquidos residuales podía interferir con la interpretación de los resultados en el bioindicador, se utilizó líquido residual estéril que se contaminó experimentalmente. Para ello, fueron inoculados los tubos de ensayos con medio bioindicador y se procedió según se describió anteriormente.

El volumen de líquido residual se colectó del sistema de toma de muestra del tanque de tratamiento del laboratorio de contención después de haberse efectuado el proceso de esterilización (sin adicionar la suspensión de esporas del mo de prueba que habitualmente se añade antes de cada tratamiento para comprobar su posterior inactivación).

En los ensayos se utilizaron los controles siguientes:

Negativos	Positivos
SS + disolución A	Disolución de esporas ($3 \cdot 10^5$ esp/mL) + disolución A
SS + disolución B	Disolución de esporas ($3 \cdot 10^5$ esp/mL) + disolución B
Líquido residual + disolución A	
Líquido residual + disolución B	

Criterios de interpretación de la prueba

- Positiva (disolución A) — color amarillo.
- Positiva (disolución B) — color amarillo (pH $6,0 \pm 0,2$).
- Negativa (disolución A) — color azul violáceo (pH $7,0 \pm 0,1$).
- Negativa (disolución B) — color verde (pH $7,0 \pm 0,1$).
- Anulada — color azul de Prusia o púrpura intenso (pH 7,6).

Se realizaron seis ensayos con cada bioindicador y en cada uno se utilizaron tres réplicas para las concentraciones de sacarosa y las diferentes diluciones de esporas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aunque el intervalo de concentraciones de esporas del mo se estableció entre 10^1 y 10^7 esporas/mL el valor más útil en las determinaciones se ubicó en la concentración de $1 \cdot 10^5$ esporas/mL que constituye la cantidad que debe haber en el tanque de tratamiento una vez adicionada una muestra de 450 mL de SS con esporas de *B. subtilis* (10^9 esporas/mL) para la comprobación del sistema.

Tomando este valor de concentración como patrón para comparar las determinaciones de los ensayos con los medios A y B se pudo comprobar que ambos se comportaron de forma similar frente al cambio de pH por el metabolismo de la bacteria cuando contenían sacarosa al 2 %, sin embargo, en la disolución B se podía hacer más fácil la observación al mostrarse más evidente el cambio de coloración en relación con el control negativo en 8 h de incubación.

La disolución A aunque mostró un cambio de coloración en 8 h con relación al control negativo, no fue hasta las 10 h de incubación que se hizo evidente por completo, lo que se conoce como efecto de reacción retardada¹¹ (Tabla I).

Concentraciones de esporas superiores a 10^5 esporas/mL, se comportaron de igual forma en los dos medios con sacarosa al 2 %, el cambio de coloración se produjo en 8 h y no antes, mientras que concentraciones menores en la disolución B, mostraron un cambio en el indicador entre las 10 y las 14 h, y en la disolución A entre las 12 y las 16 h de incubación a 37 °C. (Tabla I).

TABLA I
Comportamiento de la disolución A frente a diferentes concentraciones de esporas

Concentración (esporas/mL)	Sacarosa (%)		
	1	5	2
Tiempo transcurrido en cambiar positivamente (h)			
10^1	18	14-16	12-16
10^2	18	14-16	12-14
10^3	16-18	14	12
10^4	16	12-14	12
10^5	12-14	12	8-10
10^6	12	12	8
10^7	10-12	10-12	8

La diferenciade comportamiento entre los dos medios con sacarosa al 2 % frente a concentraciones de esporas $\leq 10^5$ esporas/mL, se debió a la composición del indicador de pH, lo que influyó en el criterio de interpretación de la prueba, ya que en la disolución B el cambio de color verde para amarillo se hace más evidente dada la tonalidad del indicador, a diferencia de la disolución A en la que el cambio de color de azul violáceo para amarillo es más difícil de percibir debido al cambio más lento de la coloración, hecho que determinó un tiempo mayor de incubación. Con el bioindicador control positivo ocurrió una situación semejante.

Las pequeñas diferencias observadas entre las dos disoluciones, se debieron al indicador de pH utilizado y no a las características amortiguadoras del medio, ya que en am-

bas se emplearon los mismos componentes con igual valor de pH.

Los medios con sacarosa al 1 y 1,5 % tardaron más en cambiar al espectro de color positivo que con sacarosa al 2 %, lo que permitió corroborar un mejor comportamiento de las disoluciones cuando la sacarosa al 2 % resultaba degradada por el metabolismo oxidativo de la bacteria, cuestión que favorece la formación de ácido como producto final, el cual es detectado por el indicador, aspecto de importancia si se tiene en cuenta que la peptona del CTS, puede ser utilizada por el mo presente en el medio, proceso que a su vez, produce sustancias alcalinas, lo que se evita con el empleo de una doble concentración del carbohidrato que garantiza que el ácido producido predomine por encima de las sustancias alcalinas formadas por la degradación de la peptona.¹²

TABLA II
Comportamiento de la disolución B frente a diferentes concentraciones de esporas

Concentración (esporas/mL)	Sacarosa (%)		
	11	,5	2
Tiempo transcurrido en cambiar positivamente (h)			
10 ¹	16	14-16	14
10 ²	16	14	12
10 ³	14-16	12-14	12
10 ⁴	14	12-14	10
10 ⁵	12	10	8
10 ⁶	1010		8
10 ⁷	108		8

La aplicación de los dos medios en la actividad práctica de comprobación del sistema de tratamiento de líquidos residuales, no tuvo diferencias con el método tradicional¹³ (cultivo en ATS y CTS del residual colectado), a no ser en el tiempo de interpretación en el bioindicador, pues las pruebas pueden demorar cuando más 18 h (sacarosa 1 %) y en los métodos de cultivo se debe esperar hasta 7 d. No hubo interferencia del líquido residual en el bioindicador y no se anularon pruebas.

Actualmente, se estudian otras variantes de medio bioindicador en las que se analiza su comportamiento con diferentes concentraciones del indicador de pH y el caldo nutriente.

CONCLUSIONES

Se demostró la aplicabilidad y factibilidad del empleo de medios bioindicadores en la comprobación del sistema de tratamiento de líquidos residuales en un laboratorio de alta seguridad.

Se desarrolló un medio bioindicador que permite detectar la presencia del microorganismo de prueba *Bacillus subtilis* en el líquido residual en un periodo de 8-16 h de incubación.

BIBLIOGRAFIA

1. Hambleton P., Benett A.M., Leaver G. and Benbough J.E. Biosafety monitoring devices biotechnology processes. **Tibtech.**, 10, 192, 1992.

2. OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 2da Ed., Ginebra, 1992.
3. CDC-NIH. Biosafety in microbiological and biomedical laboratory. Publication No. (CDC) 88-8395, 1989.
4. Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council of Canada and Laboratory Centre for Disease Control, Health and Welfare Canada. Ministry of Supply and Services. 2nd Ed., 54-56, Ottawa, Ontario, Canada, 1996.
5. Drozdov S.G., Garin N.S. and Dzhindioian L.S. Essential Safety Precautions in Microbiological and Virological Laboratories, URSS Academy of Medical Sciences, Moscow, Meditsina, 117-147, 1987.
6. Plan de Comprobaciones a los Sistemas Técnico-Ingenieros. Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Ciudad de La Habana, Cuba, 1992.
7. Merck. Manual de medios de cultivo. Merck. Frankfurter Strasse 250, D-6100 Darmstadt 1, 178, 1982
8. United State Pharmacopeia (USP) XXIII. Chapter, Sterilization and Sterility Assurance, 1995.
9. Sterility indicator. Patent Number 5167923. N.Y., 1992.
10. Biological sterility indicator and method for making and using same. Patent Number 3585112. N.Y., 1971.
11. Cowans S.T. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press. 13, 23, 93-94, 108 and 129, 1968.
12. Jean F. Mac Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Cap. 4, 27-38, Editorial Médica Panamericana S.A., 1980.
13. Regalado L. Efectividad de los principales Sistemas Técnico-Ingenieros en un laboratorio de contención. Trabajo para optar por el título de especialista de 1er grado en Microbiología. Ciudad de La Habana, 1986.