



TÍTULO: **DETERMINACIÓN DE ESCHERICHIA COLI Y COLIFORMES TOTALES
EN AGUA POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EN
AGAR CHROMOCULT**

CÓDIGO: **TP0314**

VERSIÓN: **03**

COPIA N°: _____

ELABORADO POR: _____
MARIA OLGA NAVARRO ROA
Bacterióloga

REVISADO POR: _____
STELLA GAITÁN,
Ingeniera de Alimentos

APROBADO POR: _____
MARTHA ELENA DUQUE SOLANO
COORDINADORA GLCA

Este documento debe ser revisado por lo menos cada **dos** años.



1. Introducción

La presencia de *Escherichia coli* indica contaminación fecal en agua, ya que este microorganismo es habitante normal del tracto digestivo de animales de sangre caliente y rara vez se encuentra en agua o suelo que no haya sufrido algún tipo de contaminación fecal, por ello se considera como indicador universal. Este microorganismo genera una alerta a cualquier sistema de suministro de agua ya que su presencia por sí sola puede generar gastroenteritis y causar la muerte como el caso de la cepa *E coli O157:H7* o puede sugerir la presencia de otros microorganismos altamente patógenos como son la *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Listeria* etc.

La identificación de Coliformes totales es más difícil ya que estos pueden provenir de suelo, y de superficies de agua dulce por lo que no siempre son intestinales. La presencia de Coliformes sugiere fallas en la eficacia del tratamiento y la integridad del sistema de distribución. La identificación de las cepas aisladas puede a veces dar una indicación sobre el origen.

La filtración por membrana es el mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de la membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro 0.45 μm , esto gracias a que una bomba eléctrica ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua haciendo que se filtre. Los contaminantes de tamaño menor que el específico del poro atraviesan la membrana o se quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego está es llevada a un medio de enriquecimiento selectivo, en el IDEAM se utiliza el medio de cultivo Chromocult el cual promueve el crecimiento y la identificación.

El medio de cultivo contiene el sustrato Salmon GAL – 6 cloro – 3 indol y βD galactopiranosido es un sustrato cromogénico que es usado para la detección de la enzima galactosidasa de colonias bacterianas en un ensayo colorimétrico; que da como resultado el cambio de la colonia a un color rojo salmón. Esta reacción se observa cuando hay coliformes totales.

Para diferenciar la *E. coli* de los coliformes totales se hace por medio del sustrato cromogénico X-Glucorósido, que reacciona con la enzima glucoronidasa pero estas también reaccionan con el Sustrato Salmón- GAL produciendo un color azul - violeta en la colonia.

El método es aplicable a aguas superficiales y residuales en el IDEAM en un rango de 1 a 200000 UFC/100mL. Según el Decreto número 1575 de 2007 “Por el cual se expiden normas técnicas de calidad de agua potable”. ARTICULO 25. El agua para consumo humano debe cumplir con los siguientes valores admisibles desde el punto de vista microbiológico. FILTRACION POR MEMBRANA: Coliformes totales. 0 UFC/100mL y *E. coli*, 0 UFC/100mL



2. Definiciones

Coliformes Totales: Bacterias gram negativas, no esporoformadoras, oxidasa negativa, con capacidad de crecimiento aeróbico y facultativamente anaeróbico en presencia de sales biliares, que a temperatura especificada de 35°C +/- 2°C causan fermentación de lactosa con producción de gas. Poseen la enzima B-galactosidasa.

E. coli: Escherichia coli: Bacilo gram negativo, capaz de desarrollarse en presencia de sales biliares u otros agentes (tensoactivos) que tengan propiedades similares e inhibitorias del crecimiento y que son capaces de fermentar la lactosa a temperaturas de 35°C +/- 2°C, con producción de ácido, gas y aldehído en un lapso de 18 a 48 horas. Oxidasa negativa, no esporógena y reduce el nitrato a nitrito. También es capaz de producir indol a partir de triptofano a una temperatura de 44°C +/- 05 en un tiempo de 21 +/- 3 horas. Poseen la enzima B-glucoronidasa, la cual es detectada por medios cromógenos o fluorógenos.

Medio de Cultivo Selectivo: Medio que promueve el crecimiento de microorganismos específicos, al tiempo que inhibe, total o parcialmente, el crecimiento de otros microorganismos. Como es este medio de cultivo

UFC/100mL: Unidades formadoras de colonias por 100 mililitro
mL: mililitros.

LDM: Limite de Detección del Método

Salmon-GAL: Sustrato cromogénico que reacciona con la enzima galactosidasa y las colonias toman color rojo salmón

X-glucoronide: Sustrato cromogénico que reacciona con la glucoronidasa y produce color azul en las colonias.

3. ASPECTOS DE SALUD Y SEGURIDAD LABORAL

En el laboratorio de microbiología se debe tener en cuenta que los profesionales y auxiliares, están en contacto permanente con microorganismos potencialmente peligrosos capaces de producir enfermedad, por lo tanto, debe haber una manipulación con la debida responsabilidad y cuidado.

El riesgo de infección por agentes microbianos se produce por: inhalación, ingestión, contacto directo, a través de cortes de piel y a través de la conjuntiva.

Las manipulaciones de mayor riesgo de accidentes en el laboratorio son: pipeteado, apertura de envases que contienen microorganismos patógenos, aerosoles, homogenizadores, centrifugas, asas, cajas de petri, y ruptura de tubos.

El personal del laboratorio debe estar entrenado contra los peligros potenciales relacionados con su trabajo



- Inhalación de aerosoles.
- Autoinoculación. Ingestión de suspensiones bacterianas.
- Contacto de suspensiones bacterianas sobre la piel y los ojos.
- Manipulación de desechos y material de vidrio contaminado.
- Lesiones por acción de la luz ultravioleta.
- Manipulación de formaldehidos, sales de benzalconio (desinfectantes).

Las medidas de seguridad en el área de microbiología para las actividades de Análisis y Lectura son:

- Hacer las resiembras de las cepas con mucho cuidado, manipúlelas con todos los elementos de seguridad del caso.
- Realizar todos los procedimientos evitando al máximo la formación de aerosoles. Cubrir las zonas de trabajo con papel absorbente, siempre que exista riesgo de derrame de material peligroso
- En caso de derrame de algún material, cubrir la zona con un desinfectante (hipoclorito de sodio al 2%) de 15 a 30 minutos antes de limpiar.
- Evitar abrir las cajas de petri, incluso las de mesófilos si no se tiene tapabocas, pueden provocar infección por inhalación.
- Evitar movimientos bruscos o innecesarios ya que puede ocasionar derrame infeccioso
- Evitar tener contacto con superficies no estériles cuando se esté sembrando o cuando se tengan guantes.
- Mantener cerradas las puertas del área de microbiología mientras se esta sembrando.
- Evitar el paso de personal ajeno por el área de microbiología mientras se siembra.

Los siguientes son los elementos de protección que cumple el personal que labora en el laboratorio de análisis microbiológico:

- Bata de laboratorio manga larga
- Tapabocas
- Monogafas
- Guantes de latex
- Zapatos antideslizantes

La mayoría de medios de cultivo están clasificados como **SUSTANCIAS NOCIVAS**. La incorporación de estas sustancias en el organismo, puede producir efectos nocivos de menor trascendencia, que deben ser evitados.

4. Limitaciones e Interferencias

Las interferencias en análisis microbiológico se refieren a posibles falsos positivos o negativos, que se pueden presentar por las siguientes causas:



SUBDIRECCIÓN DE HIDROLOGIA – GRUPO LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL

Código: TP0314

Fecha: 30/08/2007

Versión: 03

Página: 5 de 17

COLIFORMES TOTALES Y E. COLI POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EN AGAR CHROMOCULT

- Lavado de material ineficiente.
- Fallas en el proceso de esterilización de material.
- Ambientes contaminados que afecten las muestras.
- Procedimientos inadecuados de la siembra.
- Fallas en la toma y transporte de la muestra.

Estas interferencias se eliminan con procedimientos de calidad como son:

- Estandarizando las operaciones, y dando el entrenamiento necesario al personal que realiza los análisis y operaciones en el área de microbiología.
- Garantizando el ambiente de trabajo con equipos y técnicas adecuadas.
- Llevando un estricto programa de control de calidad analítico el cual incluye el análisis de blancos, blancos de reactivos, controles con cepas certificadas y duplicados de muestras.

5. RESULTADOS DE VALIDACIÓN:

NOMBRE DEL METODO:		FILTRACION POR MEMBRANA AGAR CHROMOCULT.	
CÓDIGO DEL PSO:		TP0314	
FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN:		30-07-06	
PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACION
LIMITE DE DETECCION	1	UFC / mL	Corresponde al límite de cuantificación.
PRECISION EN TÉRMINOS DE %CV	27,1	%	Nivel de Concentración bajo 18 UFC/mL
	4,5	%	Nivel de Concentración alto 180 UFC/mL
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	-38,5	%	Nivel de Concentración bajo 18 UFC/mL
	-3,2	%	Nivel de Concentración alto 180 UFC/100 mL
RANGO DE TRABAJO (Lectura Directa)	1 - 200	UFC/ 100mL	Sin dilución de la muestra
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO	1 - 200000	UFC/ 100mL	Con la mayor dilución posible o aceptable 10 ⁻⁸
RECUPERACION EXPRESADO COMO %	111	%	Nivel de Concentración bajo 10 UFC/100mL
	94,43	%	Nivel de Concentración alto 150 UFC/100 mL

	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial - República de Colombia			
	SUBDIRECCIÓN DE HIDROLOGIA – GRUPO LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL			
	Código: TP0314	Fecha: 30/08/2007	Versión: 03	Página: 6 de 17
COLIFORMES TOTALES Y E. COLI POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EN AGAR CHROMOCULT				

6. TOMA Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

Recipiente y volumen de muestra: El recipiente requerido es botellas de vidrio, esterilizables con capacidad no menor a 100 mL con preservante (tiosulfato de sodio y/o EDTA) si lo requiere. El volumen mínimo para análisis microbiológico es de 100 mL.

Consideraciones para la preservación de muestras microbiológicas:

Declaración: Se debe añadir un agente reductor a los recipientes en los que se vaya a recolectar agua con residuos de cloro u otros halógenos desinfectantes. El tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) es un buen agente declorante que neutraliza todos los residuos halógenos e impide el mantenimiento de la acción bactericida durante el transporte de muestra. El posterior estudio de esta indicará por tanto de forma más exacta el verdadero contenido microbiano del agua en el momento de realizarse la toma.

La cantidad del declorante que debe adicionar a las muestras de **agua potable** es 0.63 mL de la solución de tiosulfato de sodio al 0.025 N para un volumen de muestra de 500 mL, este podrá neutralizar hasta 5 mg/L de cloro residual. En **muestras residuales tratadas con cloro** la cantidad es de 0,1 mg/L de una solución de tiosulfato de sodio al 10% para un volumen de muestra de 120 mL, esta cantidad podrá neutralizar hasta 15 mg/L de cloro residual. Esterilizar las botellas de muestras más tiosulfato de sodio a 121° C por 15 minutos a 15 psi.

Agente quelante: En muestras de agua de alto contenido de cobre o zinc o níquel mayor a 0.1 mg/L se debe utilizar un agente quelante como el EDTA (ácido etilendiamino tetracético) que reduzca la toxicidad del metal, la cantidad debe ser de 0.3 mL de EDTA al 15% para un volumen de muestra de 120 mL, esto es especialmente importante cuando el tiempo de transporte de las muestras es mayor a 4 horas.

Toma de muestra: Para análisis bacteriológico se toma la muestra directamente sin realizar purga del recipiente, teniendo en cuenta **no** llenar el recipiente completamente, con la precaución de dejar una cámara de aire dentro de él; el recipiente bacteriológico y su tapa, no deben tocar ninguna superficie contaminada, ya que esto podría alterar el resultado. Se llena el recipiente hasta la cantidad deseada, se tapa y se coloca el material protector de la tapa (papel o tela) ajustado con la pita.

Cuando se hagan tomas de ríos, corrientes, lagos, pantanos, fuentes o pozos se obtendrán muestras representativas, no es conveniente tomar muestras demasiado cerca de la orilla o demasiado lejos del punto de extracción ni a una profundidad superior o inferior a la de dicho punto, en estos puntos se puede hacer uso de una cuerda o un nylon que se amarre a la botella y se descargue con la boca hacia abajo.

Preservación y Transporte: La preservación de muestras es relativamente limitada y son generalmente para retardar la acción biológica, retardar la hidrólisis de compuestos



químicos y complejos, y reducir la volatilidad de sus constituyentes. La mejor técnica de preservación es únicamente el retardar los cambios químicos y biológicos inevitables después de la recolección de las muestras. La conservación de las muestras depende de sus características, el análisis a realizar y las condiciones de almacenamiento.

Después de recolectadas las muestras deben ser llevadas al laboratorio lo más rápido posible. Si no es posible el análisis en el lapso de **24** horas después del muestreo, se debe refrigerar a una temperatura entre **2°C**. Se reduce al mínimo la posibilidad de cambio durante el almacenamiento y transporte de las muestras. Se evita la exposición a la luz solar directa. Es conveniente asegurar que los recipientes se mantengan en posición vertical y que el líquido de muestra no se derrame, igualmente el instrumento que se emplea como refrigerante no debe entrar en contacto con la muestra para evitar su posible contaminación. La nevera de transporte debe contener hielos que mantengan la temperatura de refrigeración, estas deben estar limpias y en lo posible desinfectadas para evitar una fuente de contaminación.

7. Aparatos, Materiales y Materiales

7.1 Aparatos

- Incubadora. Marca: JENCONS. Inventario 4971.
- Balanza. Marca: METTLER TOLEDO. Modelo AG 204. Con aproximación de 0.0001 g.
- Incubadora Marca: Binder. Modelo Digital. Serial BD53- ul 03-46606
- Plancha Marca: Cimarec 2 Modelo: Termolyne.
- Autoclave Electrico. Marca All American. Modelo: 50X. Sarial: 0000-200. Calibrado en temperatura, presión y tiempo.
- Bomba de vacío. Marca: GAST. Modelo Mufflers–Gast. Serial: 1181-LR39793
- Equipo completo de filtración por membrana que incluye: Bomba de vacío (115/60), soporte para embudo, embudo, portafiltros, trampas para vacío y base manifold de 6 puestos.

Modo de empleo:

- Coloque el portafiltro estéril sobre la base del manifold (parte metálica), poniendo primero la goma de caucho de color azul luego va la friza, la membrana y por último el embudo el cual debe ser bien enroscado para no se salga la muestra cuando la introduzca.
- Con mucho cuidado coloque el embudo sobre la friza fíjelo.
- Llene el embudo con los 100mL de de la dilución escogida según el cuando para diluciones de aguas.
- Aplique vacío parcial mediante la bomba conectada al manifold y agite bien mientras filtra.
- Cuando haya paso todo el líquido adicione más agua de peptona para hacer un enjuague de las paredes del embudo y aplique vacío de nuevo.



- Cuando termine de filtrar cierre las llaves del manifold, apague la bomba de vacío, retire el embudo, tome la membrana con las pinzas estériles y colóquela sobre una caja de petri que haya marcado con anterioridad (código de la muestra, y la dilución correspondiente).
- Incube la caja en posición invertida y déjela 24 horas a 36°C al cabo de este tiempo lea el número de colonias resultantes.

7.2 Materiales

- Probeta graduada de 100, 500 y 1000 mL.
- Vasos de 100, 250, 500 mL
- Balón de 1 litro de fondo plano
- Varilla de vidrio.
- Cajas de Petri 45 mm de diámetro en vidrio.
- Frascos para toma de muestra en vidrio autoclavables con tapa de rosca.
- Pipetas de 1, 5, y 10 mL.
- Micropipetas de 0.1 y 0.5. µL
- Puntas azules y puntas amarillas
- Pipeta de 100 mL clase A
- Mechero de Alcohol
- Papel kraft
- Vinipel
- Cuenta colonias Inventario 2157
- Pinzas de disección
- Filtros de membrana estériles de acetato de celulosa de 0.45 µm de poro, con cuadrícula.
- Frascos con capacidad de 1 litro esterilizables.
- Frascos Schott de 250 mL, esterilizables.
- Asa de platino redondeada (bacteriológica)
- Gradillas.
- Pita
- Tubos de ensayo 18x125mm
- Espátula y Guantes de carnaza

7.3 Reactivos

Solicite los reactivos diligenciando el formato AF0041.

- E.DTA al 15 %.(Acido etilendiamino tetracético)
- Preparación : Pesar 15 gramos de EDTA 0.1 M, disolver en 100mL de agua destilada. Esterilizar a 121°C por 15 min a 15 psi.Tiosulfato de sodio al 0.025 N.
- Preparación: Pesar 6.205 de Na₂S₂O₃.5H₂O y disolver en 1000 mL agua destilada



- Esterilizar a 121° C por 15 minutos a 15 psi.
- Alcohol Antiséptico y alcohol industrial
- Agua ultrapura, obtenida en la pistola del purificador Labconco Water Pro PS y esterilizada a 121 °C por 20 minutos a 15 psi
- Agar Chromocult con fecha de vencimiento vigente.

Preparación:

Disuelva 26.5 g en 1L (1000mL) de agua destilada estéril, coloque la cantidad de medio de cultivo en un vaso de 100 mL al cual le va agregando agua y con la varilla de vidrio lo va mezclando, esta solución la transfiere al balón hasta disolver todo el medio de cultivo, déjelo 10 minutos en reposo

Coloque este balón en una plancha eléctrica con la temperatura en medio, siga agitando. Coja el balón por el cuello con guante de carnaza, coloque nuevamente el balón en la plancha realice esto hasta que el medio de cultivo este disuelto completamente, es decir que se observe transparente. **No deje sobrecalentar (hervir) ni se puede autoclavar.**

Retirar y permitir que enfríe hasta temperatura de 42 a 50°C. Servir en las cajas de petri pequeñas, aproximadamente un volumen de 10 mL.

Para servir debemos colocar los mecheros encendidos alrededor, y esterilizar toda el área.

Deje que se solidifique, envuelva en vinipel por grupos de 4 cajas, coloque el rotulo, realice el control de calidad por lote y los demás llévelos a la nevera a 4 °C.

- Agua de Peptona tamponada al 1%. Con fecha de vencimiento vigente.

Preparación:

Disolver 1.0 g en 100 mL de agua destilada estéril. Realice el procedimiento anterior pero cuando esté disuelto completamente déjelo enfriar, esterilice a 121°C por 15 minutos a 15 psi.

Cuando el tiempo de esterilización ha transcurrido, el suministro de vapor debe apagarse y permitir que la presión disminuya lentamente. Sacarlos del autoclave cuando la presión este en cero.

Cuando este de nuevo frío coloque 100 mL, mézclalos con pipeta de 100mL clase A, y envasarlo en frascos para dilución Schott, colocar los mecheros y el área estéril, envuelva en grupo de 4 frascos en vinipel y coloque el rotulo y realice el control de calidad. Los demás frascos llévelos a la nevera a 4°C.

El rotulo de identificación debe llevar además la fecha de vencimiento lo cual es exigido por la reglamentación vigente de la FDA.



- Nombre del medio.
- Lote No.
- Fecha de preparación.
- Fecha de vencimiento.
- Nombre quien lo preparó.

8. Procedimiento de limpieza del material de vidrio

Ver el procedimiento de lavado y limpieza del material utilizado en microbiología. Ver TP0426

8.1 Procedimiento para material sucio.

Ver el procedimiento de lavado y limpieza del material utilizado en microbiología. Ver TP0426

8.2 Procedimiento para material usado.

El material utilizado: bolsas, tubos, frasco, etc., se deben esterilizar en el autoclave No. 2 colocando una ampolla de Sterikon para verificar el funcionamiento del autoclave. Esta ampolla contiene nutrientes, indicador de pH y esporas de *Bacillus stearothermophilus* que son resistentes a altas temperaturas, pero no resisten una temperatura de 121°C por 15 minutos después de este tiempo se inactivan.

Dicha ampolla se coloca dentro del autoclave sobre una caja de petri, esta tiene inicialmente un color violeta, después de la esterilización debe conservar su color, se lleva a incubar a 60°C por 48 horas, aún debe conservar su color si la esterilización es completa, de lo contrario vira a un color amarillo y se observa producción de gas lo que indica que la esterilización no es aceptable.

Transcurrido este tiempo apague el autoclave, espere a que la aguja del manómetro llegue a cero deje que el material se encuentre frío para que lo lleve al área de lavado donde le debe retirar los residuos de agar y material sólido para desechar los cuales se recogen en bolsa plástica de color rojo, se sella muy bien y llévela al cuarto de máquinas, se les avisa a la persona encargada de sacar la basura, que la llevará al lugar de los desechos biológicos.

Cuando el material es líquido lo debe dejar con un poco de desinfectante (hipoclorito al 2%) por unas horas ya lo podemos desechar por el desagüe del alcantarillado.

El material está listo para ser lavado con solución jabonosa de agua con Extrán neutro al 5% y un poco de hipoclorito, se frota con una esponja suave luego lo enjuagamos con abundante agua para quitar el jabón lo pasamos a un recipiente que contenga solución jabonosa caliente e hipoclorito lo deja de 1 a 2 horas luego enjuagarlo con abundante agua de grifo para luego enjuagarlo con agua destilada.

Secar en el horno a 60 °C por 2 horas. Llevarlo para que se realice el control de calidad esto es anotándolo en el FT0042

Las bolsas escúrralas muy bien colóquelas en la bolsa plástica roja directamente

- Cajas de Petri:

	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial - República de Colombia			
	SUBDIRECCIÓN DE HIDROLOGIA – GRUPO LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL			
	Código: TP0314	Fecha: 30/08/2007	Versión: 03	Página: 11 de 17
COLIFORMES TOTALES Y E. COLI POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EN AGAR CHROMOCULT				

Envuelva en papel kraft por grupo de 4 cajas de petri y séllelas con cinta de enmascarar y coloque un trozo de cinta indicadora de esterilidad sobre el papel kraft. Así haga con las demás cajas.

- Tubos:

Tome unos 6 tubos colóquelo la tapa pero sin dejarla muy sella y envuélvalos en papel Kraft séllelos con cinta de enmascarar y coloque un trozo de cinta indicadora de esterilidad, haga esto don todos los demás tubos.

Coloque en autoclave, esterilícelo a 121°C por 15 minutos a 15 psi. Deje enfriar y colóquelo en el estante designado para guarda este.

NOTA: La cinta indicadora contiene esporas de *Bacillus stearothermophilus* en sus canales diagonales los cuales tienen un indicador de color que al momento de la esterilización satisfactoria vira a negro.

8.3 Instrucciones para el manejo del el Autoclave

Llenar con agua del grifo el espacio de la base de la autoclave y la rejilla.

Colocar el recipiente (olla) dentro de la Autoclave, haciendo que este quede en el centro del autoclave, de modo que el compartimento adherido, quede a la derecha para que pueda coincidir con el tubo metálico el cual se introduce por este para que pueda salir el vapor de agua que se produce y cuando se baje la tapa quede el manómetro frente al analista.

Las tuercas deben hacerse coincidir con las muescas de el autoclave y el espacio entre el autoclave y la tapa se determina dejando el espacio igual de una tuerca y el espacio de la tuerca contraria y se debe ajustar una tuerca con la tuerca contraria al mismo tiempo, se dice que se debe hacer como cuando se coloca una llanta de un carro.

Levante la válvula de control para que salga el vapor de agua, cuando empieza a pitar baje la válvula (posición horizontal), espere a que el manómetro suba a 121°C y manténgalo ahí por 15 o 20 minutos teniendo en cuenta lo que se va a esterilizar.

Cuando pase este tiempo apague deje que baje a 0 la aguja del manómetro para que pueda sacar el material. Deje la autoclave limpio y **seco**. Saque el material y llévelo a donde corresponda. Observe la cinta de control de esterilización si en material limpio y si es material sucio observe la ampolleta y llévela a incubar.

9. Procedimiento para el mantenimiento de las cepas certificadas (Repique)

Las cepas que se utilizan para el control de calidad de los medios de cultivo y la verificación de la respuesta de los mismos son:

E.coli ATTC : 25922

Citrobacter freundii: ATCC 8090

Peudomona aeruginosa: ATTC 27853

Staphylococcus aerogenes: ATTC 25923

9.1 Preparación del medio:



El mantenimiento de las mismas mediante repique quincenal se realiza en Medio de cultivo Agar Plate count

Disolver 22.5 g en Litro (1000 mL) de agua destilada estéril. Mezclar y colocar en la plancha de calentamiento a temperatura media hasta disolver completamente, esterilice a 121°C por 15 minutos 15 psi. Cuando el tiempo de esterilización ha transcurrido, el suministro de vapor debe cortarse (apagar) y permitir que la presión disminuya lentamente. Sacarlos del autoclave cuando la presión este en cero. Dejar enfriar a 45 – 50 °C y servir en las cajas de petri, dejar solidificar y llevar a la nevera a 4°C. Este medio puede conservarse por un tiempo máximo de 1 mes, realizar comprobación antes de uso si está próximo a vencer.

9.2 Repique

Esterilice el área de siembra, desinfectando con hipoclorito de sodio al 2 % y realice todo el procedimiento colocando los mecheros encendidos.

Marcar 4 tubos con los nombres de las cepas y agregar 3 a 5 mL de agua de peptona tamponada en cada uno.

Tome más o menos 5 colonias, observe que estas tengan las características propias de la cepa que se va a repicar (No tomar las colonias “contaminadas”) haga una solución de esta y el agua de peptona, mezcle y lleve a la incubadora por 2 a 3 horas a 36 °C.

Pasado este tiempo tomar una asada con el asa bacteriológica (redonda), hacer la siembra en superficie en toda la caja de petri, con medio de cultivo Plate Count que se ha preparado y se le a realizado el control de calidad.

Realizada la siembra de cada una de las cepas llevar a la incubadora por 24 horas a 36° C.

Dejar a temperatura ambiente y luego pásela a la nevera la nevera a 4°C. Las cepas están listas para ser utilizadas. Las cepas envejecidas se deben autoclavar a 121°C por 20 minutos 15 psi.

Colocar los residuos en bolsa plástica de color rojo, bien selladas, llevarla al cuarto de máquinas y comunicarle al encargado de recolectar la basura, para que la transporte al deposito de residuos biológicos.

10. Control de calidad para los medios de cultivo empleados

Los controles de calidad para microbiología es un control cualitativo y se debe realiza realizar a cada lote de medio de cultivo preparado para verificar esterilidad, especificidad y vigencia.

10.1 Agar Chromocult

Preparación de la cepa para control de calidad

Tome 3 tubos de ensayo y márquelos con el nombre de las cepas.

Agregue 3 mL agua de peptona Tamponada al 1% a cada uno.



De la caja de petri donde se encuentre la cepa tome con el asa bacteriológica (redonda) 5 colonias más o menos de las mismas características y hacer una suspensión en los 3 mL de agua de peptona tamponada, la cual debe estar a temperatura ambiente, mezcle suavemente lleve a la incubadora por 3 – 4 horas hasta que se observe crecimiento (turbiedad).

Tome 4 cajas de petri con medio de cultivo Chromocult para realizar el control.

10.1.1 En la primera caja realizamos el control de esterilidad Agregue a un frasco de dilución 100 mL agua de peptona tamponada estéril, filtre a través de la membrana y cuando pase a través del filtro todo el volumen realice un enjuague con un poco de agua de peptona, siga aplicando vacío por unos 30 segundos quite el embudo, coja con las pinzas el borde de la membrana, pásela a la caja de petri, identifique e incube a 36 °C por 24 horas. No deber tener crecimiento. Quiere decir que la membrana está estéril. En la segunda caja se realiza el control de esterilidad del medio de cultivo tome la caja de petri, colóquela en la incubadora a 36 °C por 24 horas. No debe haber crecimiento.

10.1.2- En la tercera caja realizamos el control Negativo. Se demuestra que no va a crecer otro microorganismo diferente a Coliformes totales o a E. coli, que son lactosa positivos, este control negativo se realiza con la Pseudomona aeruginosa, no fermenta lactosa por eso no debe haber crecimiento.

Siembra: tomar del tubo donde se encuentra la cepa de Pseudomoma aeruginosa 0.1 mL llevar a 99.9 mL de agua de peptona tamponada, se realiza en un frasco de dilución, debidamente marcado, esta concentración es de 10^{-3} , mezclar muy bien, de esta dilución sacar 0.1 mL llevar a 99.9 mL de peptona tamponada y mezclar, la concentración es 10^{-6} de esta dilución se toma 0.1 mL llevar a 99.9 mL de peptona tamponada, este última dilución se filtra a través de la membrana, en forma similar a la descrita arriba, transferir la membrana a la caja de petri e incube a 36 °C por 24 horas. No debe haber crecimiento.

10.1.3 - Control Positivo. Se realiza con las cepas de Citrobacter freundii lactosa positivo se observa que van a crecer coliformes totales, con la cepa de E. coli se identifica el crecimiento de esta.

Realice diluciones similares que para Pseudomona filtre y transfiera la membrana a la caja restante.

10.2 Control de calidad para Agua de peptona tamponada.

Control de esterilidad, tome 5 mL de Agua peptonada tamponada en tubo estéril y colóquelo en la incubadora a 36 °C por 24 horas. No debe haber crecimiento o sea turbiedad.

10.3 Control de calidad para el medio de cultivo Plate count



10.3.1 Esterilidad. Tome una caja del medio de cultivo llévelo a incubar 24 horas a 36 °C. No debe haber crecimiento.

10.3.2 Control positivo. Se realiza con la cepa de E. coli y Staphylococcus aureus con las mismas diluciones planteadas en 10.1.2 y realice la siembra en la caja en superficie.

10.4 - Duplicados

Cada veinte muestras se debe realizar un duplicado para verificar repetibilidad.

11. PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

11.1 Fase Pre-analítica:

- Se prepara una cantidad de agua peptonada al 1% dependiendo del volumen que se va a utilizar (ver 7.3)
- Se esterilizan los frascos Schott y las cajas de petri 121°C por 15 minutos y 15 psi
- Se esterilizan embudos, frizas, pinzas a 121°C por 15 minutos.
- Se prepara el medio de cultivo Chromocult. (ver 7.3)

11.2 Fase Analítica

Desinfectar completamente el área de trabajo.

Verificar que todo el material a utilizar este completamente estéril.

Coloque el portafiltro estéril sobre la base del manifold, poniendo primero la goma de caucho de color azul luego va la friza, la membrana y por último el embudo el cual debe ser bien enroscado para no se salga la muestra cuando la introduzca.

Con las pinzas estériles (pasada por alcohol anticéptico y un segundo por el mechero coloca la membrana de celulosa estéril con la cuadrícula hacia arriba sobre la friza.

Con mucho cuidado coloque el embudo sobre la friza fijelo.

Llene el embudo con los 100 mL de la dilución escogida según el cuadro (Serie de diluciones para aguas)

Se alistan dos frascos Schott con 100 mL de agua de peptona tamponada estéril al 1% como mínimo para cada muestra. De acuerdo a las diluciones que vaya a realizar, extraiga del frasco que contiene el agua de peptona un volumen igual al determinado de acuerdo a la dilución.



Mezcle bien la muestra y restituye el volumen original con la alícuota de la muestra, utilice pipeta automática y punta estéril, mezcle muy bien antes de realizar la siguiente dilución.

Realice las diluciones de acuerdo con el siguiente cuadro.

CUADRO SERIES DE DILUCIÓN PARA AGUAS			
Tipo de Dilución	Volumen de muestra (mL)	Volumen final (mL)	Dilución
I	10	100	-1
II	1	100	-2
	0.1	100	-5
	0.1	100	-8
III	0.1	100	-3
	0.1	100	-6
	0.1	100	-9
IV	1	100	-2
	1	100	-4
	0.1	100	-7

Filtre a través de la membrana. Cuando haya pasado todo el líquido adicione más agua de peptona para hacer un enjuague de las paredes del embudo y aplique vacío de nuevo.

Cuando termine de filtrar cierre las llaves del manifold, apague la bomba de vacío, retire el embudo, tome la membrana con las pinzas estériles y colóquela sobre una caja de petri que haya marcado con anterioridad (código de la muestra, y la dilución correspondiente).

Incube la caja en posición invertida y déjela 24 horas a 36°C al cabo de este tiempo lea el número de colonias resultantes.

11.3 Fase Post-analítica

- Se realiza la lectura de acuerdo con la siguiente tabla:

Tipos de Colonias	Color de colonias
Coliformes Totales	Rojo salmón
E. coli	Azul oscuro



Otros gram
negativos

Transparentes,
crema

- Se cuentan las colonias de acuerdo con el color cuando el medio posee menos de 200 UFC/100 mL.
- Recuento para Coliformes totales: Contar todas las colonias, las de color rojo salmón más las azules oscura. El resultado se obtiene por la multiplicación del número total de colonias de la caja más representativa por el inverso de la dilución utilizada. El resultado debe ser presentado con dos cifras significativas.
- Cuéntense como colonias **individuales** aquellas que poseen aspecto de colonias y crecen muy cerca unas de otras, sin tocarse, siempre que la distancia entre ellas sea al menos igual al diámetro de la colonia más pequeña. Cuéntense como **una unidad**, las cadenas de colonias que parezcan ser consecuencia de la desintegración de un grupo de bacterias. Las colonias que se forman como una película entre el agua y el borde de la superficie del agar cuando no se filtra bien, se deben contar como una sola
- El recuento para E. **coli**: Se cuenta solamente las colonias que presenten color azul oscuro-violeta sin tener en cuenta las de Coliformes totales (rojo salmón)
- Se confirman las colonias de E. **coli** dudosas realizando la prueba del indol, agregando 2 gotas de reactivo de Kovacs, el cual produce un halo rojo
- alrededor de la colonia. También se puede confirmar con la prueba de Bactident E. **coli**.

12. Prueba de Bactident E. coli. (Kit)

Técnica:

- Con el asa bacteriológica (redonda) extraer del medio de cultivo colonias bien crecidas que se encuentren individualizadas.
- Poner en suspensión la masa bacteriana en una cubeta de reacción (incluida en el kit) en 200 µL de agua desionizada y colocar esta en la bandeja (incluida en el kit)
- Introducir la varilla indicadora en la cubeta de reacción a lo largo de la fisura cada vez más estrecha.
- Incubar a 37° C durante 120 minutos.
- Evaluación de la reacción bajo una lámpara UV (aprox 360 nm). Una fluorescencia azul muestra la presencia de Beta-D-glucoronidasa.
- Para detección de Indol formado añadir una gota del reactivo de Kovacs en la cubeta con el gotero adjunto. Una reacción positiva es indicada tras 1-2 minutos mediante una coloración roja.

La identificación de la E. **coli** tiene lugar detectando las enzimas de beta-D-glucoronidasa y triptofanasa. El 94 % de las cepas de E. **coli** poseen esta enzima y la

	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial - República de Colombia			
	SUBDIRECCIÓN DE HIDROLOGIA – GRUPO LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL			
	Código: TP0314	Fecha: 30/08/2007	Versión: 03	Página: 17 de 17
COLIFORMES TOTALES Y E. COLI POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EN AGAR CHROMOCULT				

formación de Indol a partir de triptófano es positiva en el 99 % de todas las cepas de E.coli.

13. Procesamiento de datos y cálculos de resultados

Resultado El resultado se informa en UFC/100 mL (Unidades formadoras de colonias) por 100 mL

Los Coliformes totales incluyen todas las colonias tanto las de color rojo salmón (coliformes totales) más las de color violeta o azul (E.coli) y se multiplica por el inverso de la dilución analizada.

Para E.coli, se cuentan solamente las colonias de color violeta o azul, se multiplica por el inverso de la dilución analizada.

14. BIBLIOGRAFIA

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 ed. New York, 2005.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. GTC 82:2002 Guía de Buenas Prácticas para Laboratorios que realizan muestreo y análisis de aguas. Bogotá. 2002.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC-ISO 5667-3 Calidad del Agua. Muestreo. Directrices para la conservación y manejo de las muestras. Bogotá. 1995.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC-ISO 5667-3 Calidad del Agua. Muestreo. Guía para el muestreo de agua potable y agua utilizada para procesamiento de alimentos y bebidas. Bogotá. 1995.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC-ISO 4772 Calidad del Agua. Detección y recuento de E. coli y Bacterias coliformes parte I. Método de Filtración por Membrana. Bogotá. 2000.

MERCK. Manual de medios de cultivo.1994.