


| | | |
|---|--|-------------------|
|  | Producción Agua Potable COLIFORMES TOTALES Y ESCHERICHIA COLI | Código:MI2-IN-001 |
| | | Versión No:001 |

1. OBJETIVO

Establecer las instrucciones para realizar el ensayo de Coliformes Totales y Escherichia Coli en aguas potables, superficiales, subterráneas y residuales en los laboratorios control de procesos.

2. DESCRIPCION DE ACTIVIDADES

2.1 PRELIMINARES DEL ENSAYO

2.1.1 Preparación de muestras

Para aguas en las cuales se espere un conteo > 200 UFC, se diluye al volumen necesario de muestra para el ensayo con agua destilada estéril y se aplica en factor de dilución, así:

$$\text{Factor de dilución (FD)} = \frac{\text{Volumen final de dilución}}{\text{Volumen tomado de muestra}}$$

A continuación se presenta los factores de dilución necesarios dependiendo el tipo de muestra:

| Tipo de agua | 1 | 10 | 100 | 1 000 | 10 000 |
|---|---|----|-----|-------|--------|
| Agua cruda superficial | | X | X | X | |
| Agua cruda subterránea | X | X | | | |
| Agua sedimentada (antes de la filtración) | X | X | | | |
| Agua filtrada | X | X | | | |
| Agua potable (después de cloración) | X | | | | |

Tabla 1. Factor de dilución para la preparación de muestras.

2.1.1 Equipos

- Cabina microbiológica en vidrio.
- Incubadora microbiológica (a una temperatura de 36 °C ± 1 °C).
- Plancha de calentamiento con agitación.

2.1.2 Accesorios y equipos auxiliares

- Equipo de filtración estéril, (Embudo, soporte y pinzas de agarre).
- Membranas reticuladas estériles, 0,45 µm, 47 mm diámetro.
- Sistema de vacío (Trompa de vacío, mangueras para vacío, kitasato 500 ml y adaptador de caucho).
- Pinzas microbiológicas para el manejo de filtros de membrana, autoclavables y esterilizables a la llama con etanol.
- Vaso de precipitado estéril 50 ml y/o 100 ml.
- Probeta graduada estéril de 100 ml.
- Soporte para pinzas microbiológicas.
- Mechero con alcohol.
- Encendedor.

2.1.3 Reactivos y Estandares

- Agar Chomocult preparado y listo sobre cajas petri estériles.
- Etanol al 96% (Alcohol)

2.2 DESARROLLO DEL MÉTODO

2.2.1 Condiciones generales

1. Antes de iniciar el ensayo, lávese las manos con jabón desinfectante y abundante agua.
2. Durante el ensayo no utilice manillas, relojes, etc.
3. Durante el ensayo utilice bata de laboratorio, tapabocas y guantes de nitrilo.

- Es caso de derrame de la muestra dentro de la cabina de flujo laminar, seque con papel absorbente y limpie con etanol.
- Evite abrir las cajas de petri incubadas si no se tiene tapabocas, pueden provocar infección por inhalación.
- Evite movimientos bruscos o innecesarios ya que puede ocasionar derrame.
- Evite tener contacto con superficies no estériles cuando se esté sembrando o cuando se tengan guantes.
- Evite hacer contacto con las superficies estériles que están en contacto directo con la muestra o el medio de cultivo durante el desarrollo del método.
- Mantenga cerradas las puertas del área de microbiología mientras se desarrolla el método.

2.2.2 Preparación de medio de cultivo

- Pese directamente en un vaso de precipitado estéril, la cantidad exacta indicada en tabla 2 de acuerdo al número de muestras a ensayar. Vierta el medio de cultivo deshidratado directamente del envase original. Una vez pesada la cantidad necesaria cierre el envase inmediatamente.
- Tome en una probeta estéril, la cantidad de agua para reactivos estéril indicada en la tabla 1 de acuerdo a la cantidad de medio de cultivo pesado, y adiciónela lentamente al vaso de precipitado con el medio de cultivo deshidratado.
- Introduzca una barra magnética agitadora estéril.
- Ubique el vaso sobre el plato de calentamiento y agite constantemente sin calentamiento durante aproximadamente 10 minutos.
- Caliente el medio de cultivo a ebullición con agitación constante hasta que este se disuelva completamente. Preste especial atención cuando el medio esta próximo al punto de ebullición ya que esto puede ocurrir inesperadamente y se puede derramar el medio. Verifique la disolución completa observando que la solución viscosa fluya suavemente y que no queden partículas de agar adheridas a las paredes del recipiente después de agitar.
- Retire el vaso del plato de calentamiento y deje reposar hasta alcanzar una temperatura que no se solidifique y que no forme condensado en la tapa al ser vertido en las cajas petri. (entre 45 °C a 50 °C)
- Vierta cuidadosamente el medio sobre las cajas Petri procurando un espesor de capa entre 2 mm y 3 mm. Agite el medio antes de verter para asegurar su homogenización.
- Marque cada una de las cajas que contiene Chromocult con la letra C.

| No. de muestras a ensayar | Cantidad de Chromocult a pesar (g) | Volumen Agua dd estéril a adicionar (ml) |
|---------------------------|------------------------------------|--|
| 10 | 1,33 | 50 |
| 15 | 1,99 | 75 |
| 20 | 2,65 | 100 |

Tabla 2. Preparación del medio de cultivo

2.2.3 Alistamiento del material y los equipos

- De acuerdo al número de muestras a analizar, aliste en la cantidad suficiente las cajas petri estériles con el medio de cultivo Chromocult preparado, los equipos de filtración esterilizados y las membranas reticuladas estériles.
- Dentro de la cabina de flujo laminar ubique el siguiente material: Kitasato 500 ml, vaso de precipitado con alcohol, pinza microbiológica sobre su respectivo soporte.
- Instale el sistema de vacío conectando con la manguera la parte del desprendimiento lateral del kitasato con la parte lateral de la trompa de vacío.

2.2.4 Montaje del equipo de filtración

- Retire la protección de papel aluminio del kitasato.
- Retire la protección de papel aluminio de la parte inferior del soporte del equipo de filtración y ajústelo sobre la flauta de filtración.
- Retire la protección de papel aluminio de la parte superior del soporte del equipo de filtración y de la parte angosta del embudo del equipo de filtración.
- Ubique el embudo sobre el soporte de manera que este quede centrado.
- Esterilice la pinza microbiológica en el mechero y luego sumérjala en el vaso de precipitado con alcohol.
- Retire la protección plástica de la membrana reticulada, tómelala con la pinza microbiológica esterilizada y ubíquela entre el soporte y el embudo de manera centrada, teniendo especial cuidado en no tener contacto directo con las manos.
- Asegure el soporte al embudo con la pinza de agarre.
- Retire la protección de papel aluminio de la parte superior del embudo.

2.2.5 Procedimiento de filtración por membrana e incubación

- Encienda el mechero dentro de la cabina de flujo laminar y deje calentar el aire interior hasta que el termómetro indique aproximadamente 50 °C. Esto hace que el aire interior circule de manera similar a una cabina de flujo laminar.
- Limpie y seque las muestras con un trapo limpio y seco. Retire cuidadosamente la cubierta de papel aluminio de las muestras y transcriba en el frasco el número de muestra y los ensayos a realizar.
- Ubique al frente del equipo de filtración la muestra a ensayar, después de agitarlas suavemente con movimientos verticales.

4. Ubique frente a la muestra lista para ensayar, una caja petri estéril con el medio de cultivo Chromocult preparado y debidamente marcada sobre la tapa con la letra C.
5. Marque sobre la tapa de la caja petri el número de la muestra.
6. Abra completamente el grifo conectado a la trompa de vacío.
7. Abra cuidadosamente el frasco con la muestra y vierta al embudo 100 ml de muestra.
8. Espere hasta que esta haya filtrado por completo a través de la membrana.
9. Cierre el grifo conectado a la trompa de vacío.
10. Retire la pinza de agarre del equipo de filtración y retire cuidadosamente la membrana humedecida con las pinzas microbiológicas esterilizadas.
11. Ubique la membrana humedecida sobre el medio de cultivo Chromocult en la caja petri de manera que no queden burbujas de aire.
12. Introduzca la caja petri en posición invertida (con el medio de cultivo hacia arriba) en la incubadora microbiológica, para su incubación durante $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$.
13. Registre la fecha, hora de la incubación y el número de muestra.

2.2.6 Interpretación de resultados

1. Después $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ retire la caja petri de la incubadora.
2. Verifique la formación de colonias coloreadas.
3. Cuento las colonias azul oscuro a violeta y regístrelas como Escherichia Coli.
4. Cuento las colonias color salmón a rojo junto con las colonias azul oscuro a violeta registradas anteriormente como Escherichia Coli y registre la totalidad como Coliformes Totales.
5. Registre los resultados obtenidos anteriormente como UFC/100 ml, en el formato MI2-FO-018 Control Ensayos Microbiológicos.

3. CONTROL DE CAMBIOS

4. CONTROL DE EMISIÓN DEL DOCUMENTO

| Elabora | Revisa | Aprueba |
|--|--|--|
| Diego Ramiro Corrales Velasco PROFESIONAL III - CONTROL PROCESOS EN PLANTA Y CALIDAD | Farid Montenegro Charruf PROFESIONAL V -CONTROL PROCESOS EN PLANTA Y CALIDAD | Alexander Sanchez Rodriguez SUBGERENTE OPERATIVO |