 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 1 de 20

1. OBJETIVO

Establecer la metodología para la determinación y cuantificación de Coliformes totales y *Escherichia Coli* y en matriz agua superficiales de forma precisa y confiable, mediante la técnica de sustrato definido colilert por el método de NMP.

2. ALCANCE


Esta técnica es utilizada para el análisis de aguas potables, superficiales y residuales, probada por el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, es de simple manejo, rápida, precisa y no requiere ninguna prueba adicional de confirmación.

Los siguientes son los resultados obtenidos en la verificación del método:

CUADRO PARÁMETROS DE CONFIRMACIÓN DEL MÉTODO			
CÓDIGO DEL INSTRUCTIVO DE ENSAYO: M-S-LC-F066 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE			
FECHA DE INFORME DE ESTANDARIZACIÓN: 31/10/2018			
PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACIÓN
LIMITE DE DETECCION	1	NMP/100ml	Corresponde al límite de cuantificación
PRECISIÓN EN TRMINOS DE % CV	2,827	%	Nivel de concentración bajo ST. 219 NMP/100 ml
	2,143	%	Nivel de concentración alto ST 2178 NMP/100 ml
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	1,4	%	Nivel de concentración bajo ST. 219 NMP/100 ml
	1,3	%	Nivel de concentración alto ST. 2178 NMP/100 ml
RANGO DE TRABAJO (Lectura Directa)	1- 2419,6	NMP/ 100ml	Sin dilución de la muestra
RECUPERACIÓN EXPRESADO COMO %	94,24	NMP/100ml	Nivel de concentración bajo M1 + Ab
	98,49	NMP/100ml	Nivel de concentración alto M1 + Aa

3. DEFINICIONES

- **SM:** Estándar Métodos.
- **UV:** Ultravioleta.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 2 de 20

- **Colilert:** tecnología de sustrato definido para detectar simultáneamente coliformes totales y *E. coli*. Dos indicadores de nutrientes, ONPG y MUG, son las fuentes principales de carbono en Colilert y pueden metabolizarse con la enzima coliforme β -galactosidasa para metabolizar ONPG y cambiarla de incolora a color amarillo y *E. coli* usa la β -glucuronidasa para metabolizar MUG y crear fluorescencia.
- **ATCC:** American Type Culture Collection. Son cepas de microorganismos de referencia certificados. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.
- **NMP:** El método del Número más probable (NMP) (Most probable number - MPN - en inglés), también conocido como el método de los ceros de Poisson, es una forma de obtener datos cuantitativos en concentraciones de elementos discretos a partir de datos de incidencia positiva/negativa.


4. ASPECTOS DE SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO

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 de las muestras 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 con 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.

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

- Capacitar el nuevo personal que ingrese a trabajar al laboratorio en las técnicas de análisis y sobre seguridad en el laboratorio.
- Mantener cerradas las puertas del área de microbiología durante el trabajo relacionado
- Evitar el paso de personal ajeno por el área de microbiología mientras se siembra.
- Utilizar implementos de protección personal como batas, gafas de seguridad, tapabocas y guantes. Estos implementos se deben descontaminar una vez finalizado el análisis.
- Además, estos implementos no se deben llevar fuera del laboratorio a lugares como oficinas, cafeterías, etc.
- No guardar las batas y ropa protectora del laboratorio con la ropa de calle.

 <p> IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales </p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 3 de 20

- No pipetear con la boca.
- No fumar, comer, beber, guardar alimentos ni maquillarse en el laboratorio.
- Mantener el área de trabajo limpia, despejada y descontaminada, retirando del mismo cualquier material que no tenga relación con el trabajo o que no sea necesario en el momento del análisis.
- Descontaminar la superficie de trabajo, antes y después del análisis.
- Lavarse las manos antes y después del análisis.
- 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.
- Hacer las siembras 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 1%) 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.

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.

5. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

5.1 Equipos


- Incubadora 36°C +/-2°C
- Cámara UV
- Balanza con sensibilidad 0.0001 g
- Plancha eléctrica para calentar medios
- Autoclave Eléctrica
- Vórtex
- Selladora de sobres Quanti-Tray /2000

5.1.1 Verificación de Equipos

Antes de operar los equipos verificar que se encuentran en óptimas condiciones. Diligencie el formato de control diario de manejo del equipo M-S-LC-F007.

5.2 Materiales

- Probeta graduada de 100 ml
- Vaso de precipitado de 250 ml
- Tubos de ensayo 18x125mm
- Frascos con capacidad de 1 litro esterilizables

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 4 de 20

- Frascos con capacidad de 250 ml tapa rosca esterilizables para toma de muestra
- Varilla de vidrio
- Cajas de Petri grandes
- Botellas para dilución plásticas
- Botellas de dilución desechables
- Pipetas de 1, 5, y 10 mL.
- Micropipetas de 0.1 y 0.5. μ L
- Puntas azules y puntas amarillas para micropipeta
- Mechero de Alcohol
- Papel Kraft
- Vinipel
- Asa de platino redonda
- Gradillas
- Pita
- Espátula y Guantes de carnaza

5.3 Reactivos

Con el fin de mejorar la reproducibilidad de los resultados, se recomienda para la preparación de los diluyentes y medios de cultivo emplear componentes básicos deshidratados o medios deshidratados completos. De manera similar, pueden emplearse reactivos preparados comercialmente. Se deben seguir rigurosamente las instrucciones del fabricante así como las normas de bioseguridad para su manipulación.

Cada lote de medio debe ser probado antes de su uso. Los productos empleados para la preparación de los medios de cultivo y los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida.


El agua empleada debe ser destilada o desionizada, libre de sustancias que interfieran en el crecimiento de organismos bajo las condiciones de ensayo. En el Laboratorio se utiliza el agua tipo I.

Las mediciones de pH deben realizarse empleando un medidor de pH, con referencia a una temperatura de 25°C. Si los medios de cultivo preparados no se emplean de inmediato, deben almacenarse en oscuridad a aproximadamente 4°C, durante máximo un mes, a menos que se establezca de otro modo (Mercado et al., 2007).

Agua de Peptona Tamponada al 0.1%

Composición en g/L de agua Peptonada al 0.1%

Peptona caseína	10.0
Cloruro sódico	5.0
Potasio dihidrogenofosfato	1.5
di-sodicohidrogenofosfato dodecahidrato	9.0

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 5 de 20

Preparación:

- Disolver 25.5 g en 1 litro de agua tipo I en un frasco schott
- Llevar a ebullición e ir agitando en la plancha de calentamiento, hasta conseguir una completa disolución
- pH 7.0 ± 0.2 a 25°C
- Distribuir en tubos tapa rosca o frascos Shott
- Esterilizar en autoclave a 121°C , 15psi durante 15 minutos

Controles del medio preparado:

- Control macroscópico: caldo de color amarillo claro, sin precipitado
- Control de esterilidad
- Control de eficacia: buen crecimiento de *E.coli*

Conservación:

- 2 semanas a $2-8^{\circ}\text{C}$.


Agar Plate Count

Composición en g/l de agar Plate Count

Peptona caseína	5.0
Extracto de levadura	2.5
Glucosa	1.0
Agar-agar	14.0

Preparación:

- Disolver 22.5 g en 1 litro de agua tipo I en un frasco schott
- Llevar a ebullición en la plancha de calentamiento, hasta conseguir una completa disolución
- pH 7.0 ± 0.2 a 25°C
- Esterilizar en autoclave a 121°C , 15 psi durante 15 minutos
- Verter el medio de 15 a 20 ml en cajas de petri grandes el cual debe estar a una temperatura aproximada de $47^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$
- Dejar enfriar sobre una superficie horizontal fría
- Si se va a guardar envolver las cajas en papel vinipel para evitar modificaciones y rotular

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 6 de 20

Control del medio preparado:

- Control macroscópico: medio claro y amarillo
- Control de esterilidad
- Control de eficacia: buen crecimiento de *E.coli*

Conservación:

- 2 semanas a 2-8° C

Medio de cultivo para colilert

Composición de medio colilert

ONPG y MUG Sulfato de amonio Sulfito de sodio Sales minerales Solanium
--

Preparación:

- Tomar un vial de medio colilert y disolver en una botella de dilución que contiene 100 ml de agua estéril y la muestra a analizar, mezclar muy bien y adicionar a la bolsa quanti-tray y sellar.

Conservación:

- Se debe mantener a temperatura ambiente. Evitar la exposición prolongada de los medios a la luz solar directa. Desechar los medios que han cambiado de color, apariencia y / o textura.


E.DTA al 15 %.(Ácido etilendiamino tetracético): Preparación: Pesar 15 gramos de EDTA 0.1 M, disolver en 100 ml de agua tipo I.

Tiosulfato de sodio al 3% : tiosulfato de sodio pentahidratado. Disolver 4.6 g/100 ml de agua tipo I. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos a 15 psi. Utilizar 0.1 ml por cada 120ml de muestra.

Agua Estéril: Agua tipo I y esterilizada a 121 °C por 15 minutos a 15 psi.

Alcohol etílico al 70%

Hipoclorito de sodio: se utiliza hipoclorito de sodio al 0.5% en la desinfección de superficies, y al 1% para desinfección de material y en caso de derrames.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 7 de 20

Cada medio o reactivo debe estar identificado con un rotulo que tenga los siguientes datos:

- Nombre del medio
- Número de lote
- Fecha de preparación
- Fecha de vencimiento
- Nombre de quien lo preparo

Para los medios de cultivo se utiliza el mismo rótulo de reactivos código M-S-LC-F014, pero en el lugar de la concentración se coloca el número de lote. La preparación de los medios de cultivo se registra en el formato M-S-LC-F082.

6. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

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


- 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.

6.1 Condiciones Ambientales

Las condiciones ambientales de Temperatura y Humedad del Laboratorio de Microbiología se miden mediante un Termohigrómetro digital, y se registran en el formato de condiciones ambientales M-S-LC-F021.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 8 de 20

7. CONTROL Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

7.1 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:


***Escherichia coli* ATTC : 25922**

***Pseudomonas aeruginosa*: ATTC 27853**

Las cepas que se utilizan en el laboratorio son KWIK-STIK Plus la cuales brindan resultados equivalentes a los métodos tradicionales utilizados en la preparación, el almacenamiento y el mantenimiento de colecciones de cultivos de inventario de referencia. Los gránulos contienen una población pura de microorganismos y excipientes a los fines de la estructura y/o estabilidad que incluyen gelatina, leche descremada, ácido ascórbico, carbohidrato y carbón. Cada unidad de KWIK-STIK Plus incluye un gránulo liofilizado de un microorganismo, una ampolla de líquido hidratante y un hisopo de inoculación. Cada dispositivo está sellado dentro de una bolsa laminada que contiene material desecante para evitar la acumulación perjudicial de humedad. Los microorganismos de KWIK-STIK Plus están a 2 pasos del cultivo de referencia.

Procedimiento para los microorganismos de KWIK-STIK Plus:

- Deje que la bolsa de KWIK-STIK sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abra la bolsa rasgando a la altura de la muesca y quite la unidad de KWIK-STIK.
- Retire la porción de la etiqueta de tirar y rasgar y colóquesela a la placa de cultivo principal. No desarme el dispositivo durante la hidratación.
- Sobre la mesa de trabajo, presione la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK (justo debajo del menisco del líquido) para liberar el líquido hidratante.
- Manténgalo vertical y golpee suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
- Apriete la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
- De inmediato, sature el hisopo abundantemente con el material hidratado y transféralo al medio de cultivo Agar Plate Count.
- Inocule la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.
- Por medio de un asa esterilizada, haga estrías para facilitar el aislamiento de la colonia.
- Descarte el KWIK-STIK de forma apropiada para desechos de riesgo biológico.
- Incubar el medio de cultivo inoculado a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.
 - El mantenimiento de las mismas se realiza haciendo repique semanalmente en Agar Plate count, para control de medios de cultivo cuando se preparen o para los controles de las técnicas. A partir de la

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 9 de 20

cepa certificada se pueden realizar hasta 5 repiques para evitar alteraciones de las características típicas de la cepa, mutaciones o deterioro.

Repique

Procedimiento:

- Realizar el procedimiento en la cabina de flujo laminar, desinfectando la superficie con alcohol al 70%.
- Marcar tubos con los nombres de las cepas y agregar 3 a 5 mL de agua de peptona tamponada 0.1% en cada uno.
- Tomar alrededor de 5 colonias, observar que estas tengan las características propias de la cepa que se va a repicar (No tomar las colonias "contaminadas") hacer una solución de esta en agua de peptona tamponada al 0.1%, mezclar y llevar a la incubadora de 2 a 3 horas a 35 ± 0.5 ° C.
- Pasado este tiempo tomar una muestra con el asa redonda, hacer la siembra en superficie en toda la caja de Petri, con medio de cultivo agar Plate Count que se ha preparado y se le ha realizado el control de calidad.
- Incubar por 24 horas a 35 ± 0.5 ° C.
- Verificar pureza realizando tinción de gram.
- Dejar a temperatura ambiente y llevar a refrigeración 4°C.
- Las cepas están listas para ser utilizadas.
- Las cepas envejecidas se deben esterilizar a 121°C por 30 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 depósito de residuos biológicos.


7.2 Control de calidad para los medios de cultivo

El control de calidad de medios se debe realizar a cada lote de medio de cultivo preparado, se realiza control de esterilidad, control macroscópico y control de efectividad y viabilidad, para los medios Plate Count, agua Peptonada al 0.1% y medio Colilert.

Control de esterilidad: de cada lote disponible elegir al azar un 2% de la totalidad de las cajas servidas con el medio de cultivo y llevar a incubar durante 48 horas a $35^{\circ} \text{C} \pm 2$, para verificar que no se presente crecimiento de ningún tipo en las cajas.

Control macroscópico: realizar un examen visual para poder descartar cualquier error importante en la preparación del medio. Observar si su consistencia, color y aspecto corresponde con los que indica la ficha técnica de estos.

Control de pH a 25° C: tomar una muestra del medio de cultivo y con un pH-metro realizar una medición del medio a una temperatura de 25° C. El valor del pH de los medios de cultivo debe corresponder con el indicado en la ficha técnica del medio, donde se da un intervalo de aceptación de ± 0.2 . Ajustar el pH si es necesario, por ejemplo, cuando el medio se prepara en el laboratorio con componentes individuales; el ajuste se hace con una solución aprox. de 40g/l (cerca 1 mol/l) de hidróxido de sodio (NaOH) o una solución aprox. de 36.5 g/l (cerca 1 mol/l) de ácido clorhídrico (HCl).

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 10 de 20

Para comprobar la eficacia de cada medio se realizan pruebas con diferentes cepas de microorganismos de acuerdo al fundamento del medio como se realiza a continuación:

De la caja de Petri donde se encuentre la cepa de *E.coli*, tomar con el asa redonda estéril 5 colonias más o menos de las mismas características y hacer una suspensión en los 3 mL de agua de peptona tamponada al 0.1%, la cual debe estar a temperatura ambiente, mezclar suavemente y llevar a la incubadora por 3 – 4 horas hasta que se observe crecimiento (turbiedad). Realizar el mismo procedimiento con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* Con estas soluciones se realizan los controles positivos y negativos de los medios agar Plate count, agua de peptona tamponada al 0.1% y medio Colilert.

Control de calidad para el Agua Peptonada al 0.1%:

- Control positivo: a partir de la suspensión preparada de *E.coli*, se toma un mililitro y se transfiere a un tubo con 9ml de agua peptonada al 0.1%, se lleva a incubar a 35 ± 0.5 ° C. durante 24 horas. Se debe observar crecimiento por turbiedad.
- Control negativo: no se realiza debido a que esta es una solución no contiene inhibidores ni indicadores. Por lo cual crece toda clase de microorganismos.


Control de calidad para el medio agar Plate Count:

- Control positivo: a partir de la suspensión preparada de *E.coli*, tomar un mililitro y sembrar por profundidad, se lleva a incubar a 35 ± 0.5 ° C. durante 24 horas. Se debe observar crecimiento.
- Control negativo: no se realiza debido a que este medio de cultivo es un medio que no contiene inhibidores ni indicadores, es usado para la determinación de microorganismos totales contenidos en la leche, agua y otros productos. Por lo cual crece toda clase de microorganismos.

Control de calidad para el medio de Colilert:

Para el control de los viales de Colilert se debe verificar especificidad, esterilidad y vigencia. Para este tomar 2 viales por cada lote nuevo y semanalmente 1 vial cuando se estén usando, se deben realizar los siguientes controles:

- Control de esterilidad: agregar 100 ml de agua estéril a una botella de dilución y disolver un vial de Colilert, mezclar bien y verter a una bolsa quanti-tray/2000 marcada, sellar y llevar a la incubadora a 35 ± 0.5 ° C por 24 horas, después del tiempo de incubación no debe tener crecimiento ningún pozo, lo que quiere decir que el medio esta estéril.
- Control Positivo: a partir de la cepa de *E.coli* ATCC 25922 aislada en agar plate count, tomar una colonia con asa redonda estéril e inocular en 100 ml de agua estéril, agregar el medio colilert, mezclar bien y verter en una bolsa quanti-tray/2000 marcada, sellar y llevar a la incubadora a 35 ± 0.5 ° C por 24 horas. Se debe presentar crecimiento, evidenciado por color amarillo y fluorescencia bajo luz UV.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 11 de 20


- Control Negativo: realizar el mismo procedimiento que para el control positivo, pero con la cepa de *Pseudomonas, aeruginosa* ATCC 27853 aislada en agar plate count. No se debe presentar crecimiento.

Control de bolsas Quanti-Tray/2000 y botellas de dilución:

- Realizar el control a las bolsas quanti-tray/2000, con colorante alimentario anilina vegetal, agregando 1 o 2 gotas a 100 ml de agua desionizada, verter en la bolsa, pasar por la selladora y verificar visualmente si hay fugas en cada pozo. El control se realiza a cada lote nuevo de bolsas tomando dos de estas y mensualmente cuando se estén utilizando.
- El control de esterilidad de las bolsas quanti-tray/2000, se verifica agregando 100 ml de agua peptonada al 0.1% estéril o un caldo no selectivo a dos bolsas, se pasa por la selladora y se lleva a incubar 35 ± 0.5 °C por 24 horas y hasta 48°C. No se debe presentar crecimiento. Si se observa turbiedad indica que el material no es estéril. El control se realiza a cada lote nuevo de bolsas y mensualmente cuando se estén utilizando.
- Para el control de las botellas de dilución se debe verificar esterilidad y volumen.
- El control de calidad de los medios se registra en el formato de preparación de los medios de cultivo M-S-LC-F082.
- Hace duplicados cada semana o cada 10 muestras, realizar el duplicado para verificar repetibilidad y registrar en la carta de control código M-S-LC-F056 para Coliformes Totales y *E.coli*.

7.3 Control del funcionamiento de equipos:

- Verificar temperatura de incubadora Binder a 35°C con termocupla, semanalmente en cada bandeja cuando se esté utilizando.
- Verificar la calidad de la esterilización de cada autoclave de acuerdo al uso, realizando controles químicos, biológicos y físicos.
- Realizar control de calidad al material de lavado midiendo la conductividad y el ph.
- Realizar mantenimiento anual a los equipos de luz UV, cabina flujo laminar, incubadora, selladora y autoclave.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 12 de 20

7.4 Control Microbiológico de Aire y Superficies

Realizar análisis microbiológico de aire y superficies en el laboratorio de microbiología mensualmente para verificar la calidad del aire y superficies para asegurar la validez de los resultados, después de realizar una correcta desinfección del área. Ver el instructivo de Control Microbiológico de Superficies, Ambientes y Agua grado reactivo M-S-LC-I063.

8. DESARROLLO

8.1 PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba de Enzima – sustrato definido se fundamenta en la actividad enzimática de los Coliformes totales y *E.coli*. Los Coliformes totales se diferencian según su capacidad para fermentar lactosa, así:

Fermentadores Rápidos: *E. coli*, *klepsiella*, *Enterobacter*, poseen 2 enzimas, la beta-galactósido-permeasa, su actividad es permitir que la lactosa se difunda a través de la membrana celular. La otra es la beta-galactosidasa la cual descompone por hidrólisis el enlace beta -galactósido que une las moléculas de glucosa y galactosa para formar el disacárido de lactosa, liberando así la glucosa que de esta manera puede ser fermentada.

Los fermentadores lentos: Carecen de la enzima beta-galactósido-permeasa.

Los no fermentadores, no poseen ninguna de las enzimas.

En los medios sólidos con lactosa se comportan en general como no fermentadoras y solo puede detectarse demostrando la presencia de beta-galactosidasa por la reacción del ONPG (ortonitrofenil – galactopiranósido), compuesto capaz de atravesar la pared celular y que la beta-galactosidasa descompone en galactosa y ortonitrofenil, que al liberarse en medio alcalino toma un color amarillo pálido.


Para poder diferenciar la *E. Coli* se tiene en cuenta que ésta posee la enzima beta-glucoronidasa, que es la encargada de romper el enlace del complejo beta-glucoronido-4-metil-umbeliferilo o mejor el MUG, presente en el sustrato liberando 4-metil-umbeliferona que produce la fluorescencia visible bajo luz UV.

Este método está recomendado para análisis microbiológico para las muestras de agua en general, ya sea potable, de consumo humano, no tratadas, residuales aguas de alberca y de playa. El método es aplicable en un rango de 1 a 2419,6 NMP/100mL para detectar y cuantificar la concentración de Coliformes totales y *E.coli* para evaluar la calidad microbiológica de estas.

8.2 TOMA Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS

Recipiente y volumen de muestra: El recipiente requerido es botella 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:

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 13 de 20

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 declarante 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 declarante que debe adicionar a las muestras de agua potable es 0.1 ml de la solución de tiosulfato al 3% para un volumen de muestra de 120 ml, este podrá neutralizar hasta 5 mg/L de cloro residual. En muestras residuales tratadas con cloro la cantidad es de 0,1 ml 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.


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 microbiológico tomar la muestra directamente sin realizar purga del recipiente, teniendo en cuenta de no llenar el recipiente completamente, con la precaución de dejar una cámara de aire dentro de él; el recipiente microbiológico y su tapa, no deben tocar ninguna superficie contaminada, ya que esto podría alterar el resultado. Llenar el recipiente hasta la cantidad deseada, tapar y colocar 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 de 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.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 14 de 20

8.3 LIMPIEZA DE VIDRIERÍA Y MATERIAL DE CAMPO

Utilizar únicamente el material de vidrio aprobado en el control de calidad, para el lavado de material de vidrio se debe seguir el Instructivo para el lavado de material del Laboratorio.


8.3.1 Esterilización y Controles

Los procesos de esterilización se deben someter de manera rutinaria a controles que demuestren su efectividad. Estos controles pueden ser de tres tipos: físicos, químicos o biológicos. Se deben utilizar las tres formas de control.

Controles físicos: consisten en un registro del ciclo en el que se ha alcanzado la presión, temperatura y tiempo adecuados, medidos por el nanómetro y reloj. Si se aprecia alguna anomalía en estos parámetros la carga no puede ser considerada estéril, por lo que a pesar de ser de utilidad no son un medio eficaz de comprobar la esterilización.

Controles químicos: se realizan comúnmente mediante productos comerciales, consistentes en sustancias químicas que cambian de color si se cumple uno o varios elementos clave (temperatura, humedad, presión, concentración del agente esterilizante) en el proceso de esterilización. Al igual que los anteriores no garantizan que el equipo esté realizando una esterilización efectiva, aunque sí garantizan el funcionamiento del mismo, ya que reaccionan al alcanzarse dichos parámetros. Son diferentes de acuerdo al proceso de esterilización utilizado (calor seco, húmedo, gas). Existen dos controles químicos los externos que se colocan en el exterior del paquete o de los elementos a esterilizar y sirven para comprobar si el material fue sometido a un ciclo de esterilización o no y los internos se colocan en el interior del paquete. En ciclos de calor seco estos indicadores cambian de color a una determinada temperatura y tras cierto tiempo. En el laboratorio se utiliza la cinta indicadora de esterilización como control químico externo en cada ciclo que se realice.

Controles biológicos: Los controles biológicos son los únicos universalmente aceptados y sirven para verificar la eficacia de la esterilización. Consisten en preparaciones estandarizadas de esporas de microorganismos muy resistentes, que son procesadas en el esterilizador para comprobar si se han destruido o no y, por tanto, si se ha llevado a cabo o no el proceso de esterilización. Utilizan dos tipos de esporas: *Bacillus stearothermophilus* (para los procesos de esterilización con vapor de agua o con vapores químicos) y *Bacillus subtilis* (para los procesos con óxido de etileno o con calor seco), que se comercializan sobre tiras de papel o discos. En el laboratorio se utiliza para este control las ampollas de sterikon® plus bioindicador MERCK consta de una ampolla, que contiene caldo nutritivo, azúcar, un indicador de pH, así como esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (de esporulación optimada) como organismo de ensayo apatógeno. La termorresistencia está ajustada de tal manera que las esporas mediante calentamiento en vapor a presión tras 15 minutos a no menos de $121 \pm 0,5$ °C (245 kPa) experimentan una destrucción total. A temperatura más baja o tiempo de acción más breve las esporas sobreviven al menos parcialmente. Las ampollas se agregan al material de carga. Después de haber tenido lugar la esterilización se controla el éxito de esta mediante incubación de las ampollas a 60 ± 2 °C durante 48 horas y como control debe incubarse simultáneamente una ampolla no esterilizada, si no existe crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus* queda demostrada una esterilización suficiente, mientras que la existencia de crecimiento indica una esterilización insuficiente. Las

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 15 de 20

ampollas se almacenan en refrigeración de 2 a 8°C. Este control se realiza en el laboratorio mensualmente para verificar la calidad de la esterilización.

Para asegurar que el proceso de esterilización se lleve a cabo correctamente, es necesario que se sigan las instrucciones de mantenimiento de la autoclave.

El laboratorio cuenta con 3 autoclaves identificadas de acuerdo al uso de la siguiente manera:

Autoclave N. 1: se utiliza para medios de cultivo.

Autoclave N. 2: se utiliza para el material limpio.

Autoclave N. 3: se utiliza para el material usado.


Se registra el uso de cada autoclave en el formato de control diario del manejo de equipos M-S-LC-F007 y en el formato M-S-LC-F084 de control de calidad de esterilización los respectivos controles.

8.3.2 Instrucciones para el manejo del el Autoclave

Llenar con agua destilada el espacio de la base de la autoclave y la rejilla. Colocar el recipiente de aluminio dentro del Autoclave, haciendo que este quede en el centro de la 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 coincidir con las muescas de la autoclave y el espacio entre la 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.

Levantar la válvula de control para que salga el vapor de agua, cuando empiece a pitar baje la válvula (posición horizontal), mantenga vigilada muy de cerca la presión en el manómetro y ajuste el calor ya sea hacia arriba o hacia abajo como sea apropiado. La perilla del control de calor determina la duración que el termo-interruptor debe tener sus contactos abiertos o cerrados. El termostato reacciona a los cambios de temperatura y es controlado de la manera en que la perilla del control de calor es manejada. Cuando la corriente va al calentador la luz roja del piloto se ilumina y cuando la corriente no se está usando la luz del piloto se apaga. Cuando el manómetro alcanza la presión de 15 lb a 121°C manténgalo ahí el tiempo indicado teniendo en cuenta lo que se va a esterilizar.

Al final del periodo de esterilización ponga el conmutador on/off en "OFF" y mueva la palanca en el control de la válvula hacia arriba en posición (vertical) para que el vapor pueda escaparse. Cuando la palanca está en la posición vertical, el vapor se escapa al máximo. Para evitar tocar la palanca caliente para mover la de la posición (vertical) cerrado o abierto puede usar un objeto como un lápiz o una almohadilla para objetos calientes etc. Cuando la presión en el manómetro indica cero, afloje las mariposas por parejas girando de a dos opuestas al mismo tiempo en sentido contrario a las manecillas del reloj. Las mariposas los mangos laterales y el mango de la tapa estarán calientes. Siempre use almohadillas para objetos calientes cuando esté operando el esterilizador. Habiendo removido todas las mariposas de las ranuras de la tapa levante un poco la tapa y gire

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 16 de 20

la tapa en sentido contrario a las manecillas del reloj para zafarla fácilmente. Cuando está removiendo la tapa, siempre incline y ponga en ángulo la tapa lejos de usted u otras personas en el área para evitar lesiones producidas por el vapor caliente.

En caso de que la tapa se pegue, use un destornillador de pala largo para hacer palanca y aflojar la. Ponga la punta del destornillador haciendo ángulo entre la tapa y la parte baja del ensamble de la mariposa. No vaya derecho con el destornillador por que dañaría el sello de metal a metal. Suavemente haga palanca hacia arriba Continúe levantando uniformemente usando el destornillador como palanca en cada uno del ensamble de las mariposas de tal manera que la tapa es levantada en una forma uniforme. En la mayoría de los casos la tapa debe despegarse rápidamente. Si se necesita más asistencia, leer las instrucciones de mantenimiento del empaque de metal a metal.

Si el recipiente interior es removido del esterilizador para desocuparlo. Use guantes de carnaza para objetos calientes cuando lo remueve. Sacar el material llevar a donde corresponda.

Si el esterilizador no se va a usar otra vez, antes de guardar la unidad, debe sacar toda el agua y la unidad debe ser secada por dentro. Se recomienda que el agua sea vaciada de la unidad mientras que el fondo está caliente, pues el calor ayuda a secarla, deje usted la unidad destapada por 15 minutos antes de ponerle la tapa para guardarla. Con el propósito de guárdala, es solamente necesario apretar un poquito las mariposas lo suficiente para sostener la tapa en el fondo. Cuando la guarda es recomendada que deje la válvula de control en posición vertical para permitir que el aire circule en el fondo.


8.3.3 Esterilización medios de cultivo

Después de preparado el medio de cultivo liquido o sólido de acuerdo a las especificaciones del proveedor, esterilizar 15 minutos a 121°C, 15 lb de presión o de acuerdo a indicaciones, en la autoclave No. 1. Tan pronto como se termine el ciclo de esterilización y la presión llegue a cero, retire los medios de la autoclave con guantes de carnaza y tenga cuidado con la ebullición de los líquidos.

8.3.4 Esterilización de material limpio

- Cajas de Petri: Envuelva en papel kraft en 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. Este mismo procedimiento realice con las demás cajas.
- Tubos: Tome unos 6 tubos colóquele la tapa, pero sin dejarla muy sellada 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 la autoclave N.2 el material limpio y esterilizar durante 15 minutos, 121°C, 15lb, dejar enfriar y colocar en el estante designado para guardar el material limpio.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 17 de 20

8.3.5 Esterilización de material usado

El material utilizado: bolsas, tubos, frasco, etc., se deben esterilizar en la autoclave No. 3 utilizando como control biológico una ampolla de Sterikon y cinta indicadora de esterilización para verificar el funcionamiento de la autoclave. 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 $60^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ 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.

Esterilizar el material contaminado durante 30 minutos 121°C , 15lb de presión, terminado el ciclo apagar la autoclave, esperar a que la aguja del manómetro llegue a cero y dejar que el material se encuentre frío para llevarlo al área de lavado donde se debe retirar los residuos de agar y material sólido para desechar los cuales se recogen en bolsa plástica de color rojo y se marcan como residuos biológicos, se sella muy bien y se lleva al cuarto de máquinas, se avisa a la persona encargada de sacar la basura, que la llevará al lugar de los desechos biológicos.

Cuando el material es líquido se debe dejar en desinfectante (hipoclorito al 1%) por 10 minutos y posteriormente desechar por el desagüe del alcantarillado. El material listo para ser lavado con solución jabonosa de agua con Extrán neutro al 5%, se deja por un espacio de 1 a 2 horas, luego se frota con esponja suave y se enjuaga con abundante agua de grifo y por último se enjuaga con agua destilada.


El material es secado en el horno a 60°C por 2 horas. Registrar el uso del equipo en el formato de control diario del manejo de equipos M-S-LC-F007.

8.4 EJECUCIÓN DE LA TÉCNICA


8.4.1 Procedimiento de análisis de Coliformes totales y *E.coli* en aguas, mediante la técnica de sustrato definido - Colilert por el método de NMP

Las muestras se deben procesar lo más rápido posible, llevar a temperatura ambiente antes de su análisis. Se deben realizar las diluciones de acuerdo a su aspecto, olor y procedencia, trabajando bajo las condiciones adecuadas de esterilidad.

- Encender la cabina de flujo laminar, colocar en modo desinfección siguiendo las instrucciones de uso durante 1 hora, luego activar el flujo laminar 15 minutos antes de comenzar a utilizarla. Limpiar con gasa estéril y alcohol al 70%. Después de esto se puede introducir lo necesario para realizar el análisis, cuando se finalice, limpiar y dejar el flujo laminar 10 minutos más y apagar.
- Encender la selladora 15 minutos antes de su uso, cuando la luz roja de la parte superior derecha pasa a verde, indica que está lista para su uso.
- Agitar vigorosamente la muestra durante 7 segundos (aproximadamente 25 veces) hasta que se encuentre homogénea y realizar las diluciones, para esto se debe agregar 100 ml de agua estéril en la botella de dilución y de acuerdo a la dilución sacar la cantidad correspondiente de agua para añadir la muestra.












 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 18 de 20

- Para realizar diluciones 10^{-2} y pares se debe tomar 1 ml de muestra, y colocar dentro de la botella de dilución que debe contener 99 ml de agua estéril, si se van a realizar diluciones seriadas pares, se sigue este procedimiento sacando de la dilución anterior 1mL agregándolo a otra botella dilución para obtener una dilución 10^{-4} y así sucesivamente.
- Si se necesita realizar diluciones impares, tomar de la dilución 10^{-3} , 0.1 ml y agregar a la botella de dilución con 99.9 ml de agua estéril agitar muy bien, para realizar la siguiente dilución impar, tomar 0.1 ml y llevarlo a la botella de dilución para obtener la dilución 10^{-6} y así hasta llegar a la dilución requerida.
- Tomar el vial del medio Colilert y golpear suavemente tres veces sobre la mesa para que el contenido quede en el fondo del recipiente y adicionar a la botella de dilución con los 100 ml de la dilución realizada el contenido de un vial de Colilert, desprendiendo la parte superior del vial, teniendo en cuenta de agregar todo el contenido.
- Mezclar de manera que se disuelva completamente, luego verter toda la suspensión a una bolsa de Quanti-tray/2000, tomándola con la mano izquierda con los pozos hacia la palma de la mano, dejando caer el líquido sobre el papel de aluminio, golpear suavemente el extremo inferior de la bolsa con el mesón para sacar las burbujas y dejar en reposo hasta que se observe la desaparición de las burbujas.
- Colocar la bolsa sobre la plantilla de caucho haciendo que los pozos de la bolsa coincidan con los orificios de la plantilla, y la parte superior de la bolsa (boca) dirigida hacia el analista, deslizando la plantilla hasta que la selladora la sujete con los rodillos e inicie el sellamiento.
- Recuperar la bolsa sellada que se desplaza a la parte posterior de la misma.
- Verificar que la bolsa esté bien sellada e incubar durante 24 horas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. La posición de la bolsa en la incubadora no tiene importancia debido a que la temperatura es uniforme.
- Llevar las pruebas a la incubadora dentro de los 30 minutos posteriores a la adición del medio a la muestra.
- Transcurrido el tiempo cuente los pozos de color amarillo que corresponden al crecimiento de Coliformes totales, verificando que el color sea más fuerte que el del frasco de control que se encuentra en el mesón.
- Para realizar el recuento de *E.coli*, llevar la bolsa a la lámpara UV para verificar la fluorescencia que confirma la presencia de este, si no hay fluorescencia en ningún pozo, es una prueba negativa. Si hay fluorescencia es positiva y se cuentan los pozos.
- Para emitir el resultado, usar la tabla proporcionada por el proveedor que está localizada en la parte superior del mesón de microbiología. Si la respuesta cromogénica es cuestionable (amarillo no es nítido o no corresponde exactamente al patrón) después de 24 horas incubar 4 horas adicionales. Si el cromógeno se intensifica, la muestra es positiva para Coliformes totales si no, es negativa.
- Hace duplicados cada semana o cada 10 muestras, realizar el duplicado para verificar repetibilidad. Los controles de calidad del medio colilert se realizan cada vez que se empieza un lote nuevo de medio y semanalmente en periodo de análisis.

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 19 de 20

- Registrar el uso de la incubadora, la cabina de flujo laminar, la selladora Quanti-Tray/2000 y la lámpara UV en el formato de control diario del manejo de equipos M-S-LC-F007.

CUADRO SERIES DE DILUCIÓN PARA AGUAS


<i>Tipo de Dilución</i>	<i>Volumen de muestra (mL)</i>	<i>Volumen final (mL)</i>	<i>Dilución</i>
I	10	100	-1 
II	1	100	-2 
	0.1	100	-5 
	0.1	100	-8 
	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 

8.4.2 Cálculos y resultados

- **Resultado Para Coliformes Totales**

Pasado el tiempo de incubación examinar los pozos de la bolsa para ver si hay cambio a color amarillo, este nos indica que hay crecimiento de Coliformes totales o sea son positivas y las que no cambian de color no hay crecimiento, es decir, es una prueba negativa.

Contar los pozos positivos (amarillos) grandes y registre el resultado en el formato de captura de datos, Código M-S-LC-F025, a continuación, cuente los pozos pequeños positivos (amarillos) y registre también en el formato. Para el reporte del resultado final consulte la tabla de NMP- Quanti-tray /2000, que se encuentra en la parte

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 20 de 20

superior del mesón, busque el número de los pozos grandes en la primer columna (números colocado verticalmente, al lado izquierdo de esta), y en la parte superior de la tabla ubique el número de pozos pequeños. También puede ser utilizado el Software IDEXX Water NMP Generator. Reporte el dato del punto de encuentro entre la fila y la columna en el formato bajo la columna NMP de Coliformes totales. En la columna de resultado multiplique este por el inverso de la dilución e informe el resultado como NMP/100ml.


- **Resultado para *E.coli***

Colocar la bolsa bajo la lámpara de luz UV de longitud de onda larga (366 nm), cuente los pozos que presentan fluorescencia (color azul) los cuales indican que son positivos para *E. coli*. Para dar el resultado de *E. coli* se deben contar los pozos grandes y pequeños que presenten fluorescencia y seguir el procedimiento de interpolación y reporte mencionado para los Coliformes totales.

9. VER ANEXO 1

10. DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y BIBLIOGRAFÍA

- AWWA, APHA, WEF" Standard Methods for the Examination of water and Wastewater" 23 Rd. Edition; Washington, DC. 2017.
- GARCIA J.A., Fumarola, Rodríguez Torres, Piedrota G."MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA MEDICA" Editorial Salvat..
- MERCK., Microbiology Manual 12 th Edition.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 21 de 20

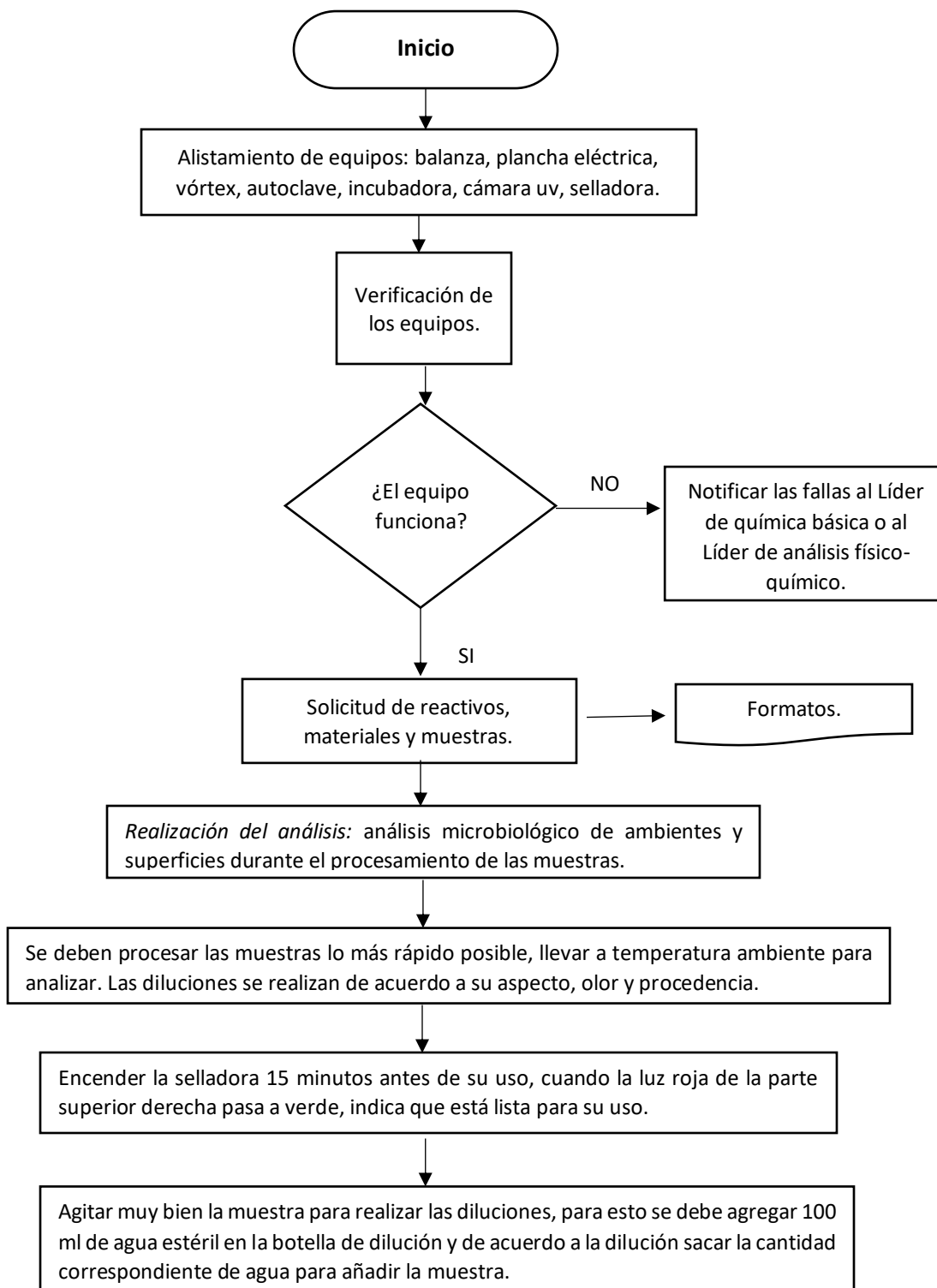
11. HISTORIAL DE CAMBIOS


VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
01	21/03/2018	Creación del documento con base a la nueva estructura del SGI. (Diana Carolina Rosas Wanumen)
02	02/05/2019	Se realizaron cambios en los resultados de la confirmación del método y cambios de forma del documento.
03	21/10/2020	Nueva versión producto de la actualización de la documentación del Sistema Integrado de Gestión.

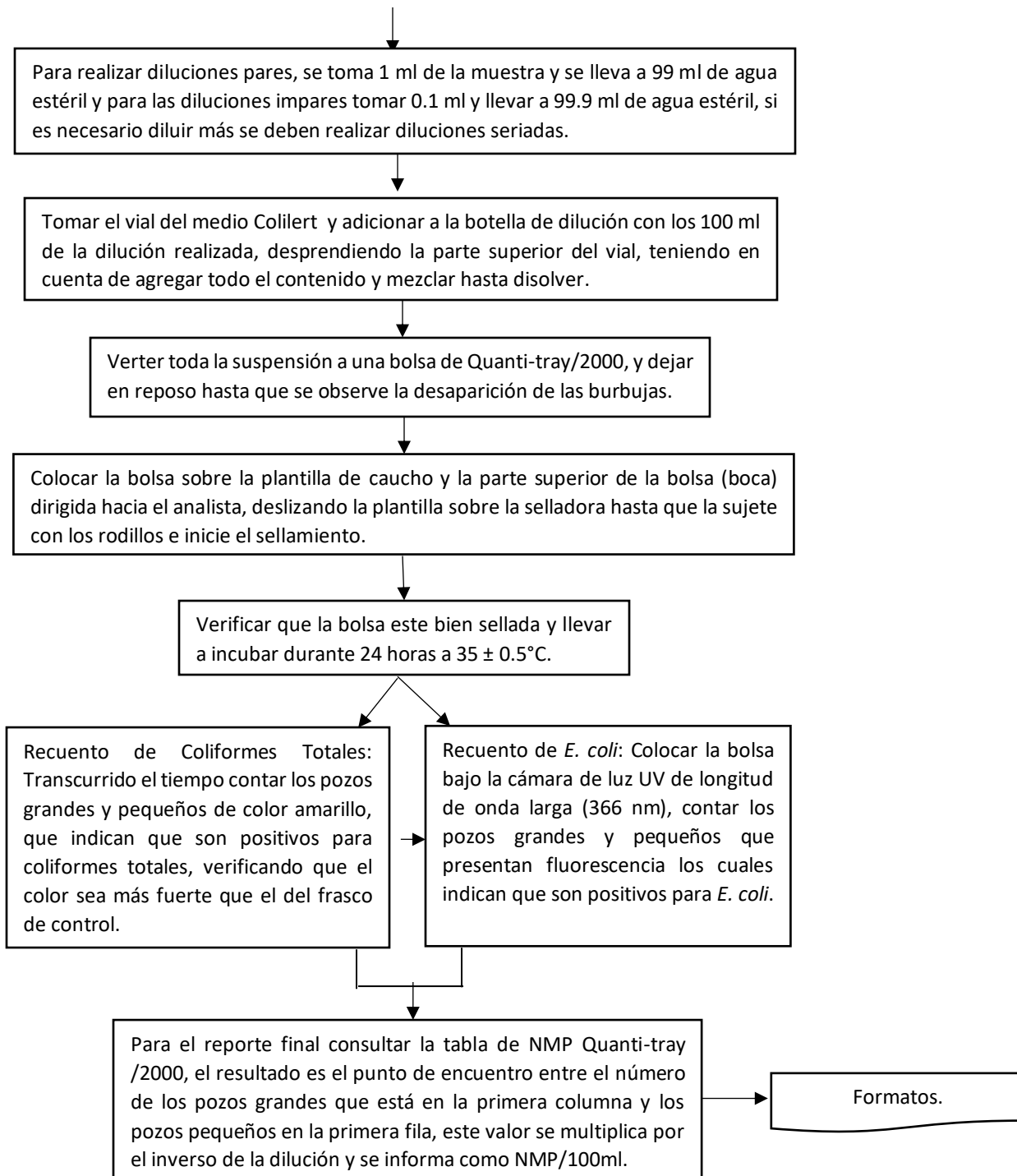
ELABORO:	REVISO:	APROBO:
Diana Carolina Rosas Wanumen Contratista Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	Carlos Martín Velásquez Ramírez Contratista Líder Técnico Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	Nelson Omar Vargas Martínez Subdirector de Hidrología


	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 22 de 20

ANEXO 1.



	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 23 de 20



	INSTRUCTIVO DE ENSAYO DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> EN AGUAS SUPERFICIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO - COLILERT POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE SM 9223B.	Código: M-S-LC-I062
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 24 de 20

