 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 1 de 21

1. OBJETIVO

Establecer la metodología para el control microbiológico de ambientes (mesófilos aerobios y hongos), mediante el método de sedimentación en placa de agar, control microbiológico de superficies por el método de hisopo y el control microbiológico de agua grado reactivo mediante recuento en placa por profundidad y filtración por membrana.

2. ALCANCE

Dentro de la normatividad de control de calidad frecuentemente debe incluirse un control microbiológico de ambiente, superficie y agua grado reactivo, estos análisis se hacen prácticamente imprescindibles en actividades relacionadas con control de contaminantes. Esta metodología aplica en el análisis de ambiente, superficie y agua grado reactivo del laboratorio del IDEAM


Para esto hay que tener en cuenta algunas características del ambiente, los procedimientos de muestro utilizados, los microorganismos a evaluar y número de muestras en cada sitio. Al realizar la valoración de los resultados obtenidos a partir de la medición de microorganismos en ambiente o en superficie, nos encontramos la mayoría de las veces con el problema de la no existencia de criterios legales de valoración. Por ello, sólo nosotros mismos podremos valorar nuestras estadísticas y fijar nuestros parámetros.

3. DEFINICIONES

- **Medio de cultivo nutritivo:** Es aquel medio de cultivo que no contiene inhibidores en su composición
- **Inhibidor:** sustancias que se adiciona a un medio de cultivo para evitar el crecimiento de alguna bacteria específica.
- **UFC:** Unidad formadora de colonias.
- **Microorganismos mesófilos:** Son aquellos que crecen a 35 °C ±0.2 en 24 horas debido a su metabolismo. Son poco exigentes por lo cual crecen en medios de cultivos simples como el Plate count y TGE.
- **Agua potable:** es aquella que reúne los requisitos organolépticos, físico-químicos y microbiológicos para el consumo humano sin producir efectos adversos a la salud.
- **Análisis microbiológico del agua:** Son aquellas pruebas del laboratorio que se efectúan a una muestra para determinar la presencia o ausencia, tipo y cantidad de microorganismos.

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 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

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 2 de 21


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:

- 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.
- 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 elemento 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.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 3 de 21

5. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

5.1 Equipos

- Incubadora 35 ± 0.5 °C
- Balanza con sensibilidad 0.0001 g
- Plancha eléctrica para calentar medios
- Autoclave Eléctrica
- Bomba de vacío
- Equipo completo de filtración por membrana que incluye: Bomba de vacío, soporte para embudo, embudo, portafiltras, trampas para vacío y base manifold de 6 puestos.
- Cuenta colonias

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.

A la incubadora mientras este en uso, se le debe verificar y registrar la temperatura dos veces al día, en la mañana y en la tarde separado por al menos 4 horas, en la parte superior e inferior de la incubadora con una termocupla. Diligenciar el formato M-S-LC-F0.

Para verificar la acción germicida de la luz ultravioleta de la cabina de flujo laminar, se deben exponer cajas de Petri que tengan entre 200 a 300 UFC/mL de una suspensión bacteriana seleccionada por 2 minutos, luego incubar a 35°C por 48 horas y realizar recuento. Reemplazar la lámpara si el recuento no se reduce en un 99%.

5.2 Materiales

- Vasos de 100mL, 250mL y 500 mL
- Probeta graduada de 100 mL, 500 mL y 1000 mL
- Frascos Schott esterilizables de 1000 mL, 500 mL y 250 mL
- Pipetas de 1mL, 5 mL y 10 mL
- Varilla de vidrio
- Cajas de Petri grandes y pequeñas
- Micropipeta de 0.5. µl
- Puntas azules y amarillas
- Filtros de celulosa con cuadrícula 0.45mm estériles
- Hisopos estériles
- Plantilla de 10 cm x 10cm
- Pinzas estériles
- Asa de platino redondeada
- Mechero de Alcohol
- Papel Kraft

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 4 de 21

- Vinipel
- 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.

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 de Peptonada Tamponada al 0.1%

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

Preparación:

- Disolver 25.5 g en 1 litro de agua desmineralizada 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 Schott
- Esterilizar en autoclave a 121° C, 15psi durante 15 minutos

Control de medio preparado:

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

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 5 de 21

Conservación:

- 2 semanas a 2-8°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 desmineralizada 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, 15psi 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°C +/- 0.2°C
- Dejar enfriar sobre una superficie horizontal fría
- Si se va a guardar envolver las cajas en papel vinipel para evitar modificaciones y rotular

Control del medio preparado:

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

Conservación:


- 2 semanas a 2-8°C.

Agar glucosa 4% según SABOURAUD

Tabla 3. Composición en g/l de agar glucosa 4% según SABOURAUD

Peptona de caseína	5.0
Peptona de carne	5.0
Glucosa	4.0
Agar-agar	15.0

Preparación:

 <p> IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales </p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 6 de 21

- Disolver 65 g en 1 litro de agua desmineralizada en un frasco schott
- Llevar a ebullición e ir agitando en la plancha de calentamiento, hasta conseguir una completa disolución
- pH 5.6 ± 0.2 a 25°C
- Esterilizar en autoclave a 121°C , 15psi 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

Control de medio preparado:

- Control macroscópico: caldo de color ámbar claro, sin precipitado
- Control de esterilidad
- pH
- Control de eficacia: buen crecimiento de *Aspergillus brasiliensis*

Conservación:

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


Agar Endo

Composición en g/l de agar ENDO

Peptona	10.0
Hidrogenofosfato dipotásico	2.5
Lactosa	10.0
Sulfito sódico anhidro	3.3
Pararosanilina(fuscina)	0.3
Agar-agar	12.5

Preparación:

- Disolver 39 g en 1 litro de agua desmineralizada en un frasco schott
- Llevar a ebullición en la plancha de calentamiento, hasta conseguir una completa disolución
- pH 7.4 ± 0.2 a 25°C
- Esterilizar en autoclave a 121°C , 15psi durante 15 minutos
- Verter el medio de 15 a 20 mL en cajas de petri grandes o 10 mL para cajas pequeñas, 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

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 7 de 21

- Si se va a guardar envolver las cajas en papel vinipel para evitar modificaciones y rotular

Control del medio preparado:

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

Conservación:

- 2 semanas a 2-8°C.

E.DTA al 15 %.(Ácido etilendiamino tetracético): Preparación: Pesar 15 gramos de EDTA 0.1 M, disolver en 100 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 psi durante 15 minutos.

Tiosulfato de sodio al 3% : tiosulfato de sodio pentahidratado. Disolver 4.6 g/100 mL de agua desmineralizada. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 psi durante 15 minutos. Utilizar 0.1 mL para cada muestra de agua.

Agua Estéril: Agua ultrapura y esterilizada a 121 °C por 20 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 la desinfección del material y en caso de derrames.

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

 <p> IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales </p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 8 de 21

- 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, 2 veces al día. Las condiciones establecidas para el Laboratorio de Microbiología deben tener circulación de aire y mantener una temperatura entre 16°C y 27°C.

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*: ATCC 25922**


***Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404**

***Staphylococcus aureus*: ATCC 25923**

Repique

Procedimiento:

- Realizar el procedimiento en la cabina de flujo laminar, desinfectando la superficie con alcohol al 70%.
- Marcar 4 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.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 9 de 21

- 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 o dependiendo de las características del microorganismo.
- Verificar pureza realizando tinción de gram y viabilidad en medio selectivo si se encuentra disponible de acuerdo al microorganismo.
- 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 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 depósito de residuos biológicos.

El control de las cepas de referencia se registra en el formato de Control de Cepas de Referencia para Microbiología número M-S-LC-F085.

7.2 Control de calidad para los medios de cultivo empleados

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 Agar Plate Count, glucosa 4% según Sabouraud, Endo y Agua de Peptona Tamponada al 0.1%.

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 ± 0.5 °C, para verificar que no se presente crecimiento de ningún tipo en las cajas.


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).

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.

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 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 *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus brasiliensis* Con estas soluciones se realizan los controles positivos y negativos de los medios agar Plate count, agar glucosa 4% según Sabouraud, agar Endo y agua de peptona tamponada al 0.1%

Control de calidad para el agua de peptona tamponada al 0.1%.

 <p> IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales </p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 10 de 21

- Control positivo: a partir de la suspensión preparada de *E.coli*, tomar un mililitro y transferir a un tubo con 9mL de agua de peptona tamponada al 0.1%, 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, 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 agar glucosa 4% según Sabouraud:

- Control Positivo: realizar un aislamiento con el asa redonda tomando una muestra a partir de la suspensión preparada de *Aspergillus brasiliensis*, mezclar bien e incubar a 25°C de 5 a 7 días. Se debe observar el crecimiento de este microorganismo evidenciado por colonias negras esporuladas.
- Control Negativo: realizar un aislamiento con el asa redonda tomando una muestra a partir de la suspensión preparada de *Staphylococcus aureus*, mezclar bien e incubar a 35 ± 0.5 °C durante 24 horas. No se debe observar crecimiento.

Control de calidad para el medio agar Endo:


- Control positivo: realizar un aislamiento con el asa redonda tomando una muestra a partir de la suspensión preparada de *E.coli*, mezclar bien e incubar a 35 ± 0.5 °C durante 24 horas. Se debe observar el crecimiento de este microorganismo evidenciado por colonias de color azul-violeta.
- Control Negativo: realizar un aislamiento con el asa redonda tomando una muestra a partir de la suspensión preparada de *Staphylococcus aureus*, mezclar bien e incubar a 35 ± 0.5 °C durante 24 horas. No se debe observar crecimiento.

El control de calidad de los medios se registra en el formato de preparación de los medios de cultivo M-S-LC-F082.

8. DESARROLLO

8.1 PRINCIPIO DEL MÉTODO

En el Laboratorio de Calidad Ambiental del IDEAM, se realiza la evaluación del control microbiológico de ambientes para la determinación de mesófilos y hongos filamentosos, control microbiológico de superficies y aguas del

 <p> IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales </p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 11 de 21

Laboratorio, los cuales indica la cantidad de microorganismos que están presentes en un área determinada. Los microorganismos generalmente no están flotando en el aire, sino que se encuentran en partículas inertes, por ejemplo, polvo, gotas de agua, etc. que le sirven como medio de transporte, y pueden encontrarse aislados o agregados, algunas de estas partículas pueden depositarse sobre las superficies.

La sedimentación es el método más básico de medición de microorganismos en el ambiente (microorganismos mesófilos y hongos). Consiste en la exposición de placas de Petri al ambiente con un medio nutritivo sólido durante un cierto tiempo. Este método tiene la ventaja de que se puede realizar en todas las condiciones habituales de trabajo y en tiempo real, es el más económico y requiere muy poco tiempo de dedicación. El resultado ha de expresarse como: UFC (unidades formadoras de colonias) Los tiempos de exposición no deben ser extremadamente largos para evitar que se reseque la superficie de la placa.

El método del hisopo o frotis, es el método especialmente indicado para superficies La recuperación de los microorganismos depende de la textura de la superficie, de su naturaleza y del tipo de microflora a investigar. A pesar de sus limitaciones, este método es rápido, sencillo y barato para calcular la flora microbiana de superficies.

El control microbiológico de superficies proporciona información sobre la cantidad de microorganismos presentes, en equipos, mesones, ropa, etc. Esta evaluación se hace en el Laboratorio de Calidad Ambiental del IDEAM, para la determinación de mesófilos en Agar Plate Count por Recuento en placa por profundidad y Coliformes totales en Agar Endo, por Filtración por membrana. Los microorganismos anteriores se consideran altamente nocivos tanto para el agua potable como para el agua suministrada en la preparación de reactivos o algún otro fin, la cual requiere cierto grado de pureza. Por esta razón se hace indispensable la determinación de dichos microorganismos en forma rápida usando una técnica que resulte sencilla, confiable y eficaz; los métodos de recuento en placa y filtración por membrana reúnen estas características pues ofrecen un valor aproximado del número total de bacterias viables, permitiendo valorar la calidad microbiológica del agua tratada.

8.2 TOMA Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS

Ir al numeral 8.4. Ejecución de la técnica.


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 Procedimiento para material usado.

El material utilizado: bolsas, tubos, frasco, etc., se deben esterilizar en el autoclave No. 3 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 alta 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 el procedimiento no es aceptable. En caso de no contar con ampolla de Sterikon, se debe utilizar la cinta indicadora de esterilidad.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 12 de 21

Transcurrido este tiempo apagar el 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.

8.3.2 Esterilización de material limpio

- Cajas de Petri: Envolver en papel kraft en grupo de 4 cajas de Petri, sellar con cinta de enmascarar y colocar un trozo de cinta indicadora de esterilidad sobre el papel kraft. Este mismo procedimiento realizarlo con las demás cajas.
- Tubos: Tomar unos 6 tubos colocar la tapa, pero sin dejarla muy sellada, envolver en papel Kraft, sellar con cinta de enmascarar y colocar un trozo de cinta indicadora de esterilidad, realizar esto con los tubos que sean necesarios.

Colocar en la autoclave N.2, esterilizar a 121°C por 15 minutos a 15 psi. Dejar enfriar y guardar en el estante designado para este material.


NOTA: La cinta indicadora contiene una serie de colorantes en sus canales diagonales los cuales tienen un indicador de color que al momento de la esterilización satisfactoria vira a negro.

8.3.3 Instrucciones para el manejo del el Autoclave

Llenar con agua del grifo el espacio de la base del autoclave y la rejilla. Colocar el recipiente (olla) 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 del 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.

Levantar la válvula de control para que salga el vapor de agua, cuando empiece 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 apagar, dejar que baje a 0 la aguja del manómetro para que pueda sacar el material. Sacar el material y llevar a donde corresponda. Observar la cinta de control de esterilización si es material limpio

 <p> IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales </p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 13 de 21

y si es material sucio observe la ampollita (si no se cuenta con ampolla utilizar cinta indicadora) y llevar a incubar. Dejar el autoclave limpio y seco.

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.

Registrar el uso de cada autoclave en el formato de control diario del manejo de equipos M-S-LC-F007.


8.4 EJECUCIÓN DE LA TÉCNICA

8.4.1 Control microbiológico de Mesófilos Aerobios en ambientes:

- Retirar de la nevera las cajas de petri con medio de cultivo para recuento total de mesófilos aerobios agar Plate Count, ambientar y exponer durante 20 minutos sin la tapa en las áreas donde sea necesario realizar el control, por ejemplo:
 - Caja No. 1 Área de DBO
 - Caja No. 2 Área de DQO
 - Caja No. 3 Cafetería
 - Caja No. 4 Laboratorio de microbiología
 - Caja No. 5 Área de Lavado
- Llevar al laboratorio de microbiología e incubar a 35 ± 0.5 °C durante 48 horas. Incube las cajas de petri en posición invertida.

8.4.2 Control microbiológico de hongos en ambientes:

- Retirar de la nevera 4 cajas de petri con medio de cultivo para recuento total de hongos agar 4% glucosa según Sabouraud, ambientar, marcar y exponer durante 20 minutos sin la tapa en las áreas donde sea necesario realizar el control, por ejemplo:
 - Caja No. 1 área de DBO,
 - Caja No. 2 área de DQO,
 - Caja No. 3 en la cafetería
 - Caja No. 4 en laboratorio de microbiología
 - Caja No. 5 Área de Lavado
- Llevar al laboratorio de microbiología e incubar a 25°C de 5 a 7 días, observándolas diariamente para ver si han crecido hongos filamentosos o levaduras.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 14 de 21

8.4.3 Control microbiológico de superficies:


- Retirar de la nevera las cajas de petri con agar Plate Count para el recuento de mesófilos, agar Endo para Coliformes y tubos con agua de peptona tamponada al 0.1% para la toma de las muestras, dejar ambientar los medios y marcar, con el nombre del área a analizar según se requiera, por ejemplo:

Caja No. 1 área de DBO
Caja No. 2 área de DQO
Caja No. 3 en la cafetería
Caja No. 4 en laboratorio de microbiología
Caja No. 5 Área de Lavado

- Tomar los tubos con 3 mL de agua de peptona tamponada al 0.1% a temperatura ambiente. y márkuelos con las superficies donde va a tomar la muestra.
- En una gradilla colocar los tubos, llevar los hisopos estériles y mechero a las superficies antes mencionadas.
- Colocar la plantilla sobre la superficie a muestrear. La plantilla debe ser con un área abierta en el centro de 100 cm² (10cm x 10cm).
- Tomar un hisopo estéril y humedecerlo en agua de peptona tamponada al 0.1% del tubo marcado con dicha superficie.
- Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30° frotar 4 veces la superficie delimitada por la plantilla, cada una en dirección opuesta a la anterior, sobre la superficie a evaluar, en un área de 1m² por lo menos en dos direcciones distintas, rotándolo ligeramente. Luego se la cabeza del hisopo en el tubo y mezcle suavemente. Esto lo realiza en todas las superficies.
- Transportar este material al laboratorio y espere 20 minutos para que la muestra se mezcle bien.
- Tomadas las muestras realizar primero la determinación de mesófilos por el método Recuento en placa en siembra por profundidad y luego por Filtración por membrana determinar Coliformes Totales.

Recuento de Mesófilos en agua por el método en placa en siembra por profundidad:

- Tomar 1 mL de cada tubo y deposítelo en cada caja marcada con su nombre respectivo.
- Verter inmediatamente en las cajas de petri 10- 15 mL de agar Plate Count fundido el cual debe estar a una temperatura entre 45-50 °C.
- Mezclar el inóculo con el agar girando la caja de petri, hacer movimientos de vaivén una 5 veces, girar suavemente en el sentido de las manecillas del reloj 5 veces y al contrario otras 5 veces.
- Dejar solidificar el medio, invertir la caja de Petri e incubar a 35 ± 0.5 °C por 48 horas.
- Transcurrido el tiempo, encender el contador de colonias, realizar el conteo de éstas.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 15 de 21

Recuento de Coliformes totales:

Fase Pre-analítica:

- Esterilizar embudos, frisas, pinzas a 121°C por 15 minutos.

Fase Analítica

- Desinfectar completamente el área de trabajo. Verifique que todo el material a utilizar este completamente estéril.
- Colocar 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 (sumergidas en alcohol etílico al 95% y flameadas) colocar la membrana de celulosa estéril con la cuadrícula hacia arriba sobre la frisa. Con cuidado colocar el embudo sobre la frisa y fijelo.
- Agregar los 2 mL que quedaron en los tubos a los vasos de filtración y enjuagar el tubo con agua de peptona tamponada al 0.1%, agregue al vaso de filtración 20 mL de agua de peptona tamponada al 0.1%.
- Filtrar a través de la membrana. Cuando termine de filtrar cerrar las llaves del manifold, apagar la bomba de vacío, retirar el embudo, tomar la membrana con las pinzas estériles y colocar sobre una caja de Petri con medio agar Endo, que haya marcado con anterioridad.
- Incubar la caja en posición invertida a 35 ± 0.5 °C, de 22 a 24 horas, al cabo de este tiempo leer el número de colonias resultantes.

Fase Post-analítica: Se realiza la lectura de acuerdo con la siguiente tabla:

Apariencia de las colonias	Microorganismos
Rojas	Lactosa - Positivas
Rojas con brillo metálico permanente	Escherichia coli
Rojas a rojizas, mucoides	Enterobacter aerogenes, Klebsiella y otros
Incoloras	Lactosa-negativas


Cuente las colonias de acuerdo con el color cuando el medio posee menos de 200 UFC/100 mL.

8.4.4 Control microbiológico de agua grado reactivo:

Este análisis se debe realizar mensualmente o cuando sea requerido y se realiza en las llaves de: Agua ultra pura, agua destilada agua desionizada y agua de la llave de la cafetería.

Recipiente y volumen de muestra: El recipiente requerido son botellas de vidrio borosilicato esterilizables no menor a 100 mL con preservante tiosulfato de sodio al 3%. 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 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 16 de 21

La cantidad de decolorante en las muestras de agua potable debe ser de 0.1 mL de tiosulfato de sodio al 3% para un volumen de muestra 250 mL, esta cantidad de tiosulfato de sodio neutraliza 5 mg/L de cloro residual.

- Toma de muestra.

Para análisis microbiológico en agua grado reactivo, se desinfectan las llaves de la siguiente manera. Con un trozo de algodón impregnado de alcohol antiséptico se pasa por donde sale el agua se le hace una limpieza estricta, luego se pasa el mechero de forma rápida dos veces.

Abrir la llave dejando que salga agua con un chorro de dimensión de un lápiz, se deja de 2 a 3 minutos, se toma la muestra directamente sin realizar purga del recipiente, teniendo en cuenta no llenar el recipiente completamente, dejar una cámara de aire dentro del recipiente. El recipiente y la 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.

Después de recolectadas las muestras deben ser llevadas al laboratorio lo más rápido posible, para ser procesada.

Recuento de Mesófilos en agua por el método en placa en siembra por profundidad

- Agitar vigorosamente la muestra. Verter un mililitro de muestra con la micropipeta sobre una caja de petri estéril, agregar 15 mL del medio de cultivo el cual debe estar a una temperatura entre 45-50 °C, mezclar el inóculo con el medio de cultivo girando la caja de petri en forma de 8 suavemente varias veces.
- Dejar solidificar el medio de cultivo, invertir la caja de petri e incubar por 48 h a 35 ± 0.5 °C.

Recuento de Coliformes totales:


Se realiza por el método de filtración por membrana. Ver Instructivo de Determinación de Coliformes Totales por el método de Filtración por membrana en agar Endo M-S-LC-1060 numeral 8.4.

Registrar el uso de las incubadoras y la cabina de flujo laminar en el formato de control diario del manejo de equipos M-S-LC-F007.

8.4.5 Cálculos y Resultados

Resultado control microbiológico de Mesófilos aerobios en ambientes:

- Contar el número de colonias obtenidas por la exposición durante 20 minutos, que corresponde a los mesófilos aerobios y expresar los resultados en UFC/ 20 min.
- Los resultados se deben registrar en el formato de Control de calidad microbiológico de ambientes M-S-LC-F029.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 17 de 21

Resultado control microbiológico de hongos en ambientes:

- Realizar el recuento de hongos y levaduras obtenidas por la exposición durante 20 minutos y expresar el resultado en UFC/ 20min.
- Los resultados se deben registrar en el formato de Control de calidad microbiológico de ambientes M-S-LC-F029.

Resultado control microbiológico de superficies:

- **Recuento de Mesófilos:** se cuenta el número de colonias y se calcula el número de UFC/área de la placa, dependiendo del diámetro de la misma.

Reporte = UFC/cm²

Si el diámetro de la caja petri es 9 cm por consiguiente su radio es 4.5 cm $\pi = 3.1416$

Área de la caja = $\pi \times r^2 = 3.1416 \times 20.25 = 63.62 \text{ cm}^2$

Si el diámetro de la caja petri es 6 cm por consiguiente su radio es 3 cm

Área de la caja = $\pi \times r^2 = 3.1416 \times 9 = 28.27 \text{ cm}^2$

Entonces se cuenta el número de mesófilos que hay en el área de la caja y se hace una regla de tres. Si por ejemplo hay 6 mesófilos, entonces 6 están en 28.27 cm², en 1 m² que es el área en donde se realizó el frotis o 100 cm² cuantos mesófilos se encuentran.


$6 * 100 / 28.27 = 21 \text{ UFC/cm}^2$

Registrar los resultados en el formato de Control de calidad microbiológico de superficies M-S-LC-F030.

- **Recuento para Coliformes totales:** Para realizar el recuento de los Coliformes Totales en el medio agar Endo con el filtro de membrana, se utiliza un contador de colonias. Se realiza la lectura de acuerdo con las siguientes características:

Apariencia de las colonias	Microorganismos
Rojas	Lactosa - Positivas
Rojas con brillo metálico permanente	<i>Escherichia coli</i>
Rojas a rojizas, mucoides	<i>Enterobacter aerogenes, Klebsiella</i> y otros
Incoloras	Lactosa-negativas

- Girar la caja de Petri en diferentes ángulos ayuda a detectar el brillo de la colonia, ya que el ángulo de luz del contador de colonias afecta la detección del brillo metálico de las colonias.
- Contar las colonias de acuerdo con el color cuando el medio posee menos de 200 UFC.
- Presentar el resultado con dos cifras significativas.
- Realizar el recuento después de finalizar el tiempo de incubación. Las colonias típicas de Coliformes en medio Endo tienen color rosado a rojo oscuro con brillo metálico. Se cuentan las colonias típicas y atípicas. El brillo puede variar de tamaño desde una pequeña cabeza de alfiler hasta cubrir todo el medio.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 18 de 21

Las colonias atípicas pueden ser de color rojo oscuro, mucoides o nucleadas sin brillo. En general las colonias rosadas, azules, blancas, incoloras o sin brillo se consideran no coliformes.

- Refrigerar cultivos con alta densidad de colonias de no coliformes (después de la incubación) de 30 minutos a una hora antes del recuento, puede ayudar a diferenciar el brillo.
- Contar 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. Las cadenas de colonias que parezcan ser consecuencia de la desintegración de un grupo de bacterias, se cuentan como una unidad. 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.
- Si se presenta un crecimiento que cubra toda o una parte de la membrana, se reporta como crecimiento confluyente con o sin Coliformes.
- Si el total de colonias por membrana es > 200 y no se pueden contar con precisión, se informa Demasiado Numerosas para Contar.
- Realizar los cálculos, de la misma manera que para mesófilos.
- Registrar los resultados en el formato de Control de calidad microbiológico de superficies M-S-LC-F030.

Resultado control microbiológico de agua grado reactivo:

Contar las colonias de Mesófilos y expresar el resultado como UFC/mL por el inverso de la dilución. En este caso es 1. El reporte de Coliformes totales se hace de acuerdo al numeral 8.4.5. Se registran los resultados en el formato de Control de calidad microbiológico del agua grado reactivo M-S-LC-F032.

9. DIAGRAMA

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.
- Carlbert, D. 1995 Cleanroom Microbiology for the Non Microbiologist. Interpham press, Inc. buffalo Grove, Illinois.
- Clavell, I.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología Manual de Métodos Generales (2da edición). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
- Gioconda san-Blas. Jefe, Lab. Micología. Facultad de Micología Universidad Central de Venezuela.
- MERCK, Microbiology Manual 12 th Edition.
- NTC 4092. Microbiología de Alimentos y Productos para Alimentación Animal. Requisitos Generales y Directrices para Análisis Microbiológicos.

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES, SUPERFICIES Y AGUA GRADO REACTIVO SM 9020B.	Código: M-S-LC-I089
		Versión : 01
		Fecha: 25/10/2021
		Página: 19 de 21

- Resolución 2115 de 2007. Ministerio de la Protección Social. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

11. HISTORIAL DE CAMBIOS

VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
01	25/10/2021	Creación del documento con base a la nueva estructura del SGI. Diana Carolina Rosas Wanumen

ELABORO: Diana Carolina Rosas Wanumen Contratista Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	REVISO: Carlos Martín Velásquez Ramírez Contratista Líder Técnico Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	APROBO: Nury Alejandra Mesa Buitrago Coordinadora (E) Laboratorio de Calidad Ambiental
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ANEXO 1. Diagrama

