

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**PROPUESTA PARA LA ELABORACIÓN DEL MANUAL DE
PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE ANALISIS
MICROBIOLÓGICO EN AGUAS PARA EL LABORATORIO DE
MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA DE
LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

Trabajo de Graduación presentado por:

RICARDO ERNESTO HERNÁNDEZ

Para optar al Grado de:

LICENCIADO EN QUÍMICA Y FARMACIA

16 MAYO 2003
DE 1841

San Salvador, El Salvador, Centroamérica



© 2001, DERECHOS RESERVADOS

**Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador**

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

DRA. MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ
RECTOR

LIC. LIDIA MARGARITA MUÑOZ VELA
SECRETARIO GENERAL

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

LIC. MARÍA ISABEL RAMOS DE RODAS
DECANO

LIC. ANA ARELY CÁCERES MAGAÑA
SECRETARIO

ASESORES

LIC. CORALIA FIGUEROA DE MURILLO

LIC. EVELYN SÁNCHEZ DE RAMOS

JURADO

LIC. LORENA MARGARITA RAMÍREZ MERCADO

ING. MARÍA DEL CARMEN GUILLÉN DE
MEDRANO

LIC. ANA ISABEL GRANADOS

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por darme la fortaleza para seguir adelante y no desampararme nunca.

A la Virgen de Nuestra Señora del Perpetuo Socorro por bendecirme y guiarme en cada momento de mi vida.

A mi madre:

Lidia Estela Hernández de Sosa por todo su amor y su apoyo en los momentos que más lo necesite. Gracias por estar siempre conmigo.

A mi padre

Nicolás Manuel Sosa Saravia, por el apoyo que siempre me ha brindado en todos los momentos de mi vida.

A mi esposa;

Marta Nely Montes de Hernández. Por todo el Amor, comprensión, paciencia, y por todo el apoyo que me ha brindado en el desarrollo de este trabajo.

A mi hijo:

Ricardo Enrique Hernández Montes por ser la inspiración de mi vida y animarme a seguir adelante.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
INTRODUCCIÓN	
OBJETIVOS	
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
GENERALIDADES DEL AGUA	1
1.1 PROPIEDADES FÍSICAS DEL AGUA	2
1.2 PROPIEDADES TÉRMICAS DEL AGUA	2
1.3 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA	3
1.4 AGUA COMO VEHÍCULO DE TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES	9
1.5 MICROORGANISMOS INDICADORES	11
1.6 REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE UN LABORATORIO DE ANÁLISIS	16
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	21
2.1 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA	22
2.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO	22
2.2.2 RECOLECCIÓN DE DATOS	22
2.2.3 TABULACIÓN DE DATOS	22

2.5	DIAGNOSTICO DE LOS LABORATORIOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO ACREDITADOS	23
-----	--	----

PROCEDIMIENTOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS29

➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN MECANISMOS PARA LA TOMA DE MUESTRA DE AGUAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	30
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PRECAUCIONES DE SEGURIDAD PERSONAL Y DE OPERACIÓN EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS	49
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO DE EQUIPOS Y MATERIALES PARA UN LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE AGUAS	56
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	77
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE FILTRO DE MEMBRANA (FM)	97
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE RECuento TOTAL EN PLACA	110

➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	123
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE FILTRO EN MEMBRANA (FM)	138
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTREPTOCOCOS FECALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	150
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTREPTOCOCOS FECALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE FILTRO EN MEMBRANA (FM)	165
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	180
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EN AGUA POR EL MÉTODO DE FILTRO EN MEMBRANA (FM)	196
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PSEUDOMONAS AERUGINOSAS EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	209
➤	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	

PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA SP. EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	226
➤ PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE VIBRIÓN CHOLERAE EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	238
➤ PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ESCHERICHIA COLI EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	251
CONCLUSIONES	267
RECOMENDACIONES	272
ANEXOS	
BIBLIOGRAFÍA	

INTRODUCCIÓN.

El agua es un recurso de gran utilidad, pero debido a los diferentes factores ambientales del país así como la deforestación, urbanización e industrialización, han afectado notablemente su disponibilidad, calidad y pureza, es por ello que se vuelve necesario contar con laboratorios debidamente especializados y acreditados para garantizar la calidad de esta, basadas en la de la Norma Salvadoreña, las cuales dictan una serie de especificaciones para desarrollar, implementar y mejorar el sistema de calidad, controlando así los métodos de análisis.

En general la calidad del agua es evaluada mediante análisis, cuyas técnicas y procedimientos han sido examinados y desarrollados cuidadosamente teniendo los niveles de aceptabilidad requeridos para garantizar que los resultados de estas determinaciones sean exactos, precisos, reproducibles y confiables.

El análisis microbiológico es una evaluación crítica que permite garantizar la calidad del agua. Esto conlleva en asegurar que la práctica de dichas evaluaciones tiene que efectuarse dentro de un sistema de confiabilidad que involucra la aplicación o verificación de la prueba, así como la comprobación y certeza de la información que proporcione a través de las evaluaciones pertinentes.

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos, son determinados por el grado de confiabilidad que se presente en la realización de los ensayos, lo que implica competencia técnica y la existencia de un adecuado sistema de calidad.

Para seguir la tendencia mundial de la globalización, es necesario igualar condiciones y capacidades, por esto en El Salvador, se ha designado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), que se encarga entre otros aspectos, de regular los procedimientos relativos a la acreditación de laboratorios de ensayos y análisis.

En el presente trabajo se propone un manual de procedimientos normalizados de análisis microbiológico de aguas para el Laboratorio de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador que servirá para evaluar la calidad de los diferentes tipos de agua .

Para ello se ha desglosado cada uno de los procedimientos del manual de tal forma que se interpretan y se proporcionan posibles planteamientos para la aplicación de cada uno de los procedimientos de análisis microbiológico.

**Este trabajo está diseñado para
que los procedimientos puedan**

**ser aplicados en un laboratorio
de control de calidad
microbiológica de aguas.**

OBJETIVOS

1. General

Elaborar una propuesta del manual de procedimientos normalizados de análisis microbiológico en aguas para el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

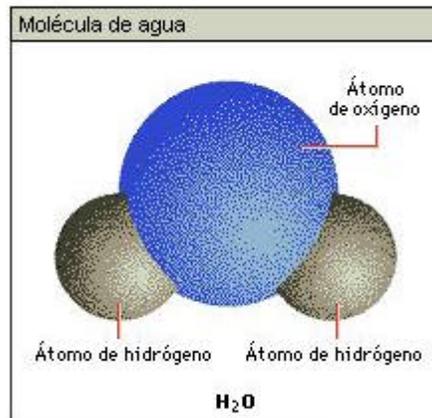
2. Objetivos específicos

- 2.1. Realizar una investigación sobre los laboratorios de análisis microbiológicos de aguas que se encuentran acreditados en el país.
- 2.2. Ordenar información bibliográfica recopilada para la elaboración de los procedimientos normalizados de operación para el manual de procedimientos normalizados de análisis microbiológico de aguas, así como las normas microbiológicas especificadas.
- 2.3. Seleccionar los procedimientos y métodos estandarizados a ser usados para evaluar la calidad microbiológica del agua.
- 2.4. Proporcionar la información necesaria referente a los trámites de acreditación de laboratorios ante los organismos o instituciones correspondientes.

FUNDAMENTOS TEORICOS

1.0 GENERALIDADES DEL AGUA

El agua es un componente de nuestra naturaleza que ha estado presente en la Tierra desde hace más de 3.000 millones de años, ocupando tres cuartas partes de la superficie del planeta. Su naturaleza se compone de tres átomos, dos de hidrógeno y uno de oxígeno que unidos entre sí forman una molécula de agua, H_2O , la unidad mínima en que ésta se puede encontrar. La forma en que estas moléculas se unen entre sí determinará la forma en que encontramos el agua en nuestro entorno; como líquidos, en lluvias, ríos, océanos, etc., como sólidos en témpanos y nieves o como gas en las nubes.



Gran parte del agua de nuestro planeta, alrededor del 98%, corresponde a agua salada que se encuentra en mares y océanos, el agua dulce que poseemos en un 69% corresponde a agua atrapada en glaciares y nieves eternas, un 30% está constituida por aguas subterráneas y una cantidad no superior al 0,7% se encuentra en forma de ríos y lagos (15).

1.1 Propiedades físicas del agua

- ❖ Viscosidad relativamente baja, fluye con facilidad
- ❖ Incompresible, relaciones presión - densidad no son importantes
- ❖ Disuelve muchas y variadas sustancias
- ❖ Punto de ebullición
- ❖ Punto de congelación (15)

1.2 Propiedades térmicas del agua

- ❖ El comportamiento térmico del agua es único en varios aspectos, debiéndose esto principalmente a que las asociaciones intermoleculares que forma el agua son inusualmente fuertes.
- ❖ El agua tiene elevados puntos de ebullición y de fusión para ser una sustancia de peso molecular tan bajo.

- ❖ El agua tiene una de las más altas capacidades caloríficas, lo que la transforma en un sumífero de calor, consecuentemente, grandes masas de aguas tienen un efecto regulador de la temperatura ambiente (14).

1.3 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA

El análisis microbiológico del agua determina la calidad sanitaria de éstas para los distintos usos. En general, los métodos utilizados están diseñados para detectar el grado de contaminación del agua con desechos de origen humano y/o animal y vegetal.

Tradicionalmente se han usado ensayos para la determinación de microorganismos indicadores, más que para la determinación de patógenos.

El grupo de bacterias coliformes ha sido siempre el principal indicador de la calidad de los distintos tipos de agua; el número de coliformes en una muestra se usa como criterio de contaminación y por lo tanto, de calidad sanitaria de la misma. (15)

1.3.1 Clasificación de los microorganismos

Existen dificultades para clasificar los microorganismos ya que éstos carecen de características morfológicas definidas y de mecanismos sexuales de reproducción que son utilizados para su clasificación por la ciencias zoológicas. El término microorganismo es aplicable a algunos organismos de dimensiones microscópicas. La clase mayormente diferenciada es la célula Eucariótica que es la unidad básica de la estructura de las

plantas, animales, protozoos, hongos y muchos grupos de algas. La menos diferenciada es la célula procariótica que es la unidad básica de estructura de bacterias (15) .

1.3.2 Atendiendo a su estructura celular, se ha considerado la siguiente clasificación

- ❖ Protistas inferiores o procarióticos
- ❖ Protistas superiores o eucarióticos

Protistas inferiores o procarióticos

La unidad es la célula procariótica, de tamaño inferior a 5 micrones, No posee núcleo definido ni realiza mitosis. Tiene un solo cromosoma, su citoplasma es muy simple y su estructura no esta definida en lo que respecta a respiración, producción de enzimas, transporte de sus productos metabólicos y la pigmentación fotosintética.

Protistas superiores o eucarióticos

La unidad es la célula eucariótica de tamaño mayor a 5 μ m posee núcleo definido y delimitado por membrana nuclear. Tiene uno o más cromosomas. Su división de células es por mitosis.

Los que nos interesan estudiar son los Protistas inferiores o procarióticos

Características:

- ❖ Los microorganismos son especies vivientes de tamaños diminutos

- ❖ No se consideran como plantas ni como animales. Si no más bien se los califica en un tercer reino llamado Protista.
- ❖ Microorganismos de tamaño promedio
- ❖ Tamaño : $10^{-6}\text{m} = 1\mu\text{m}$
- ❖ Peso $< 10^{-12}\text{g}$
- ❖ Los microorganismos varían en tamaño, forma, habilidad para usar diferentes sustancias como fuentes de alimentos, métodos de reproducción y complejidad.

1.3.3 Clasificación de microorganismos por grupo y tamaño:

Microorganismos	Tamaño
Bacterias	1 μm
Protozoos	10-100 μm
Virus	0.01-0.30 μm

Bacterias

- ❖ Microorganismos procarióticos

Clasificación según su forma :

- ❖ **Cocos : Forma esférica**
- ❖ Bacilos : Forma cilíndrica
- ❖ Espirilos : forma de espiral

Componentes celulares de las bacterias

- ❖ Componentes fijos : Membrana celular, Ribosomas y región nuclear
- ❖ Componentes variables : Flagelos (apéndices como cabellos que permiten el desplazamiento)

Clasificación de bacterias según sus fuentes de energía y carbono

Clasificación	Fuentes de energía	Fuentes de carbono
Quimioorganotrófico (Heterotrófico)	Compuestos químicos	Compuestos orgánicos
Quimolitotrófico (Autotrófico)	Compuestos químicos	Compuestos inorgánicos
Fotoorganotrófico	Energía radiante	Compuestos orgánicos
Fotolitotrófico	Energía radiante	Compuestos inorgánicos

Clasificación de bacterias según sus necesidades de oxígeno

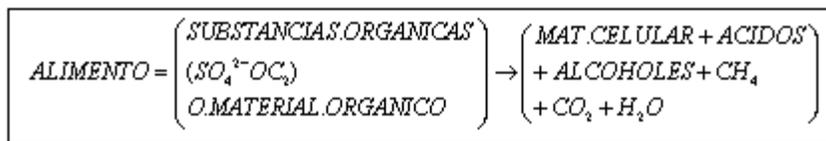
a) Bacterias aeróbicas

Requieren oxígeno libre para metabolizar sus alimentos

Metabolismos : Alimento + O₂ ? Material celular + CO₂ + H₂O

b) Bacterias anaeróbicas

El oxígeno es un tóxico, su metabolismo es:



c) **Bacterias anaeróbicas facultativas**

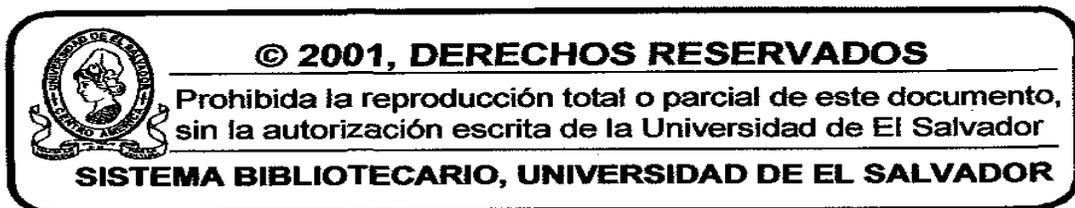
Oxidán la materia orgánica (alimento) en presencia o ausencia de oxígeno libre

Clasificación de bacterias según la temperatura de operación

- ❖ Termofílicas : 40 a 80°C
- ❖ Mesofílicas : 20 a 40°C
- ❖ Psicofílicas : < 20°C

Otras consideraciones

- ❖ La mayoría de las bacterias prefieren un pH neutro (7,0)



- ❖ Algunas bacterias son capaces de formar esporas bajo condiciones ambientales adversas, las esporas son altamente resistente a condiciones desfavorables, pueden permanecer en estado latente por mucho tiempo.

Protozoos

- ❖ Los protozoos son microorganismos eucarióticos con características similares a la de los animales, pueden ser uni o multicelular.
- ❖ Hábitat más común : Océanos, también lagos, ríos, lagunas, 10 primeros centímetros del suelo y los intestinos de los animales
- ❖ Ejemplos comunes : amebas, paramecios.

Virus

- ❖ Son sumamente pequeños, contienen una porción de material genético (ácido nucleico) protegido por una envoltura.
- ❖ En casos simples esta constituido por una sola proteína, en casos complejos rodeada por una envoltura adicional constituida por una lipoproteína y en casos más complejos aun tienen enzimas asociadas a ellos.
- ❖ Generalmente, mientras más complejo es el virus, más fácil resulta inactivarlo.

- ❖ Todos los virus son parásitos que se reproducen invadiendo células huéspedes y obligando a estas a producir más virus.(13)

1.4 El agua como vehículo de transmisión de enfermedades

El abastecer de agua potable de buena calidad a las poblaciones es una buena medida de control de las enfermedades entéricas, considerando que en muchos países sigue siendo alta la mortalidad, causada por estas enfermedades.

La forma de transmisión de los organismos patógenos puede ser por ingestión indirecta, utilizando los alimentos como vehículo; o directamente por aguas polucionadas. Es por ello que la calidad microbiológica del agua es importante, a continuación se presentan los agentes patógenos.

1.4.1 Agentes patógenos transmitidos por vía oral

- a) **Bacterias:** Entre las bacterias entéricas tenemos : Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae y E. coli presentes en el agua de consumo humano, la más común es la Salmonella. La infección bacteriana generalizada del hombre es la fiebre paratifoidea y los agentes que causan esta infección son: Salmonella paratyphi, A, B, C patógeno del hombre

la fiebre tifoidea es una infección sistémica con una tasa de mortalidad del 10%. El agente infeccioso de la fiebre tifoidea es *Salmonella typhi*, patógeno que se encuentra en el hombre y muy disperso en el mundo. Las fuentes de infección son las heces y, en menor grado, la orina de las personas infectadas.

La disentería bacilar es una infección bacteriana aguda del intestino y una de las causas más importantes de fallecimientos entre las personas muy jóvenes y entre los ancianos debilitados. Los agentes infecciosos son las diversas especies del género *Shigella*.

Las infecciones de *E. Coli* atacan con mayor frecuencia a los infantes menores de un año. Los agentes patógenos se transmiten por contacto con una persona infectada bien sea directa o indirectamente.

El Cólera es una enfermedad bacteriana aguda causada por el *Vibrio cholerae* O1 biotipo clásico o el TOR y el *Vibrio cholerae* O139. La enfermedad se caracteriza por diarrea acuosa, abundante, vómitos ocasionales, rápida deshidratación, acidosis, calambres musculares y colapso respiratorio, pudiendo llevar a la muerte al paciente en un período de 4 a 48 horas.(13)

- b) Protozoarios:** La amibiasis, que se manifiesta principalmente en el colon del hombre, es el resultado de la infección de un protozoo de la especie *Entamoeba histolytica*.
- c) Virus:** La hepatitis infecciosa es aguda y de carácter benigno. El agente infeccioso es un virus. Esta enfermedad se presenta en todo el mundo y es endémica en algunas zonas.

El reservorio de esta enfermedad es el hombre y las fuentes infecciosas son las heces y la sangre de las personas infectadas.

1.4.2 Agentes patógenos oportunistas

Existe un grupo de organismos que tienen prioridad moderada por su baja patogenicidad y sólo provocan enfermedades oportunistas en personas de inmunidad reducida y pueden causar enfermedades por vía de infección primaria, por contacto o por inhalación. Entre estos están : Pseudomonas aeruginosa, Flavobacterium, Klebsiella, Serratia, Aeromonas y ciertas especies de Mycobacterias (13) .

1.5 Microorganismos indicadores.

Ya que sería prácticamente imposible analizar en el agua cada uno de los agentes patógenos que pueden estar presentes, el control y la vigilancia de la calidad microbiológica del agua, se basa principalmente en pruebas de detección de microorganismos indicadores. Cada uno de los indicadores usados para este fin tiene sus propias ventajas y desventajas, todavía existe el reto para seleccionar el indicador apropiado, o la combinación de los indicadores, esto estaría relacionado con el fin específico de la evaluación de la calidad del agua.

La fuente exclusiva de estos indicadores son, excrementos humanos y de animales, fácilmente detectable y cuantificable, más resistente en el agua que la mayoría de los patógenos, a la vez no demasiado resistente en agua como para producir frecuentes falsas alarmas y reproducción en agua insignificante entre estos indicadores tenemos:

1.5.1 Características de los indicadores

a) Grupo coliformes totales

Las bacterias del grupo coliformes se encuentran entre otros lugares del medio ambiente, en el intestino, en heces humanas y de animales de sangre caliente. Se denominan organismos coliformes a las bacterias gram-negativas, en forma de bastoncillos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos y oxidasa negativa, capaces de crecer en presencia de sales biliares u otros compuestos tenso activos que fermentan la lactosa a temperaturas de 35 a 37 °C con producción de ácido, gas y aldehído entre 24 a 48 horas. Pertenecen a este grupo lo géneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella.

b) Grupo coliformes fecales

Son bacterias que forman parte del total del grupo coliformes y son definidas como bacilos gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido gas a 44.5 ± 0.2 °C dentro de las 24 ± 2 horas. La especie de mayor importancia en el grupo de coliformes fecales es la Escherichia coli y en menor grado especie de Klebsiella, Enterobacter y Citrobacter.

c) Grupo estreptococos fecales.

Los estreptococos fecales generalmente están presente en las heces de origen humano y animal. Taxonómicamente incluye los géneros Enterococcus y Streptococcus. Son cocos Gram positivos que forman pares o cadenas y poseen el antígeno del grupo D de

Lancefield. Pueden crecer en presencia de sales biliares y de concentraciones de azida de sodio inhibitorias para los organismos coliformes y la mayoría de otras bacterias Gram negativas a una temperatura de 44 ± 0.25 °C. Hidrolizan la esculina y son catalasa negativa. Algunas especies son resistentes al calentamiento a 60 °C por 30 minutos, crecen en caldo nutritivo con 6.5% de NaCl y a un PH de 9.6 . El genero Enterococcus comprende ahora todos los estreptococos que comparten determinadas propiedades bioquímicas y toleran bien las condiciones de desarrollo desfavorable. Incluye las especies *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundii* y *E. solitarius*, los cuales en su mayoría son de origen fecal y en muchas circunstancias prácticas, pueden considerarse generalmente indicadores específicos de contaminación fecal de origen humano. Sin embargo también se pueden aislar de las heces de animales algunas especies y subespecies como : *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. liquefaciens*, *E. malodoratus* y *E. solitarius*, se encuentran principalmente en las materias vegetales. En el género Enterococcus, únicamente *S. bovis* y *S. equinus* poseen el antígeno del grupo D.

Este método de determinación de Estreptococos fecales puede ser utilizada para la evaluación de muestras de aguas dulces y saladas. Sin embargo, otras técnicas de membrana filtrante no son apropiadas para las aguas con turbiedad alta y aguas residuales cloradas.

d) *Clostridium perfringes*.

Los clostridios reductores de sulfitos son bacilos Gram positivos, anaeróbios, que forman esporas y reducen el sulfito a sulfuro. El *Clostridium perfringens* forma un coágulo en medio leche litmus (LMM), crossley's milk medium (CMM)

e) *Pseudomonas aeruginosa*

Es un bacilo Gram negativo, monotrico que pertenece a la familia Pseudomonadaceas. Puede ser reconocido por la producción de un pigmento verde azulado fluorescente llamado piocianina, el cual puede difundir en medios de cultivo con agar; algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de muestras clínicas pueden no producir este pigmento y también pierden esta propiedad en subcultivos. Al igual que otras *Pseudomonas* fluorescentes presentes en aguas naturales, las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* producen catalasa y oxidasa.

f) *Escherichia coli*

En este método de determinación de *E. Coli* por tubos múltiples se define como bacteria coliforme que posee la enzima β -D glucuronidasa y es capaz de romper el sustrato 4-metil umbeliferil glucorónico (MUG) con la correspondiente producción de fluorescencia cuando crece en los medios EC-MUG a 44.5 ± 0.2 °C en 24 ± 2 horas o menos; y en agar nutritivo con MUG a 35 ± 0.5 °C en 4 horas. (13)

1.5.2 Interpretación de la presencia o ausencia del organismo indicador en el agua

Presencia : Se supone que el agua contiene organismos patógenos.

Ausencia : Se supone que el agua es segura

Aunque no existe un microorganismo indicador totalmente ideal, las bacterias coliformes satisfacen casi todos los requisitos. (13)

1.6 REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE UN LABORATORIO DE ANÁLISIS

La propuesta de un manual de procedimientos normalizados de análisis microbiológico en agua para el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador surge ante la inminente necesidad de igualar condiciones y capacidades de los laboratorios para competir y continuar con la tendencia mundial a la globalización.

Por lo tanto se hace necesaria la acreditación del Laboratorio de Microbiología ante las entidades acreditadoras en el país como lo es el CONACYT, para ello el CONACYT ha puesto en vigencia la norma salvadoreña NSR ISO/IEC 17025 denominada "Requisitos generales para la competencia de laboratorios de prueba y calibración". Esta norma es idéntica a la norma internacional ISO/IEC 17025:1999.

Esta norma internacional especifica los requerimientos para la competencia de laboratorios para llevar a cabo pruebas y/o calibraciones, incluyendo muestreo. Incluye la realización de pruebas y calibraciones usando métodos estándar, métodos no estándar, y métodos desarrollados en laboratorios.(11)

Esta norma es aplicable a todos los laboratorios que realizan pruebas y/o calibraciones, sin tomar en cuenta el número de personas o la longitud del rango de actividades de prueba y calibración. Esta norma fue creada para que la usen los laboratorios para el desarrollo de los sistemas de calidad administrativa y técnica que gobiernen sus operaciones.

Si los laboratorios de pruebas y calibración cumplen con los requisitos de esta norma internacional, operarán en un sistema de calidad para sus actividades de prueba y calibración que también cumple los requerimientos de ISO 9001 cuando usen métodos estándar y no estándar, y con ISO 9002 cuando usen métodos estándar. Esta norma y las ISO 9001 e ISO 9002. ISO/IEC 17025 cubre varios requerimientos de competencia técnica.

Dentro de los requerimientos de esta norma se encuentra el sistema de calidad en el cual se establece y mantiene un sistema apropiado respecto a las actividades del laboratorio.

En él se documentarán sus políticas, sistemas, programas, procedimientos e instrucciones en la extensión necesaria para asegurar la calidad de los resultados de prueba.

Los objetivos del sistema de calidad del laboratorio serán definidos en un manual de calidad. El manual de calidad incluirá o hará referencia a procedimientos de mantenimiento incluyendo

procedimientos técnicos. Debe dar lineamientos para la estructura de documentación usada en el laboratorio

El laboratorio debe establecer y mantener procedimientos para controlar todos los documentos que formen parte del sistema de calidad internamente generados o de fuentes externas, tales como regulaciones, normas, otros documentos normativos, métodos de pruebas, gráficos, especificaciones, instrucciones y manuales.(11)

Todos los documentos que formen parte del sistema de calidad emitidos para el personal del laboratorio serán revisados y aprobados para su uso por el personal autorizado previo a su emisión, además debe haber una lista maestra de control de documentos que identifique el estatus de revisión y distribución actual de documentos en el sistema de calidad.

Los documentos del sistema de calidad generados por el laboratorio deben estar identificados inequívocamente. Tal identificación deberá incluir la fecha de emisión y/o revisión, identificación, numeración de página, el número total de páginas o una marca que indique el fin del documento.

Los cambios en los documentos serán revisados y aprobados por la misma persona que ejecutó la revisión original a menos que específicamente se designe a otra. El personal designado tendrá acceso al cúmulo de información previa pertinente sobre la cual se basa la revisión y aprobación.

Donde sea práctico, el texto nuevo o alterado se identificará en el documento o en los agregados apropiados.

Dentro del sistema de calidad se contempla el manual de procedimientos normalizados, el laboratorio usará los métodos y procedimientos apropiados para todas las pruebas, esto incluye muestreo, manejo, transporte y almacenamiento de muestras que serán analizadas.

Todas las instrucciones, normas, manuales y datos de referencia relevantes para el trabajo del laboratorio mantendrán la fecha y estarán libremente disponibles para el personal.

El laboratorio usará procedimientos de prueba que incluyen procedimientos de muestreo, métodos publicados en normas internacionales, regionales ó nacionales, los cuales serán preferiblemente usados. El laboratorio asegurará el uso de la última edición de una norma, a menos que ésta no sea apropiada ó posible de aplicar, cuando sea necesario, la norma será suplementada con detalles adicionales para asegurar su aplicación consistente. La introducción de métodos de prueba desarrollados por el laboratorio para su propio uso será una actividad planeada y será asignada para calificar personal equipado con recursos adecuados, cuando es necesario usar métodos no estandarizados por métodos estandarizados, estos serán sujetos a previa validación antes de su uso y deberán contener al menos la siguiente información:

- a) Identificación apropiada
- b) Ámbito
- c) Descripción del tipo de artículo a ser aprobado
- d) Parámetros ó cantidades y rangos a ser determinados
- e) Aparatos y equipos
- f) Normas y materiales de referencia requeridos

- g) Condiciones ambientales requeridas y cualquier período de estabilización necesario
- h) Descripción de los procedimientos
- i) Criterios y requerimientos para aprobación / rechazo
- j) Datos para ser registrados y métodos de análisis y presentación

La validación de un método es la confirmación por verificación, y provisión de la evidencia objetiva de los requerimientos particulares para un uso específico planeado. El laboratorio validará los métodos no estandarizados, los métodos diseñados o desarrollados por el mismo, métodos estándares usados fuera de su ámbito planeado, ampliaciones y modificaciones de métodos estándar para confirmar que los métodos son convenientes para su uso. La validación será tan extendida como es necesario conocer las necesidades de aplicación dadas ó el campo de aplicación. El laboratorio registrará los resultados obtenidos, el procedimiento usado para la validación y una declaración de si el método es el conveniente para su planificado uso.

El laboratorio deberá tener procedimientos de muestreo , de manejo y transporte y procedimientos de análisis o de prueba.

Los resultados de cada prueba realizada por el laboratorio serán reportadas exacta, clara, sin ambigüedades y objetivamente en concordancia con las especificaciones del método usado.

La presente propuesta del manual de procedimientos normalizados de análisis microbiológicos en aguas esta basado en los requerimientos del sistema de calidad de la

norma salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 en el cual se especifica la necesidad de un manual de procedimientos, como parte de un sistema de calidad. (11)

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
TOMA DE MUESTRAS DE AGUA PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la toma de muestras de agua para análisis microbiológico.

2.0 Alcance y aplicación

El procedimiento de muestreo describe la selección, plan de muestreo, factores de muestreo, salida, preparación de una muestra y transporte de las muestras de aguas para sus respectivos análisis.

3.0 Definiciones:

3.1 Definición de agua potable

- Aquella que por reunir los requisitos organolépticos (olor, sabor y percepción visual), físicos, químicos y microbiológicos, puede ser consumida por la población humana sin producir efectos adversos a la salud.
- Efluente de una planta potabilizadora o Planta de tratamiento de agua potable. Todas las aguas empleadas para bebida o preparación de alimentos en estado natural o posterior a un proceso de tratamiento que cumplen con los requisitos microbiológicos, físicos, químicos y organolépticos para ser considerado inocuo para el consumo humano.
- Agua que es destinada al consumo humano y que satisface las características físicas, químicas, bacteriológicas, biológicas y radiológicas que establezca la Autoridad Sanitaria competente con sus correspondientes normas y que abastece un edificio.

3.2 Definición de agua purificada no estéril para uso farmacéutico

- Se define como agua para la preparación de productos medicinales no estériles, la cual es purificada por tres procesos :
 - a) Desmineralización o Desionización.
 - b) Destilación.
 - c) Osmosis reversa.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

- El agua purificada se define como agua que se somete a un proceso de purificación este tipo de agua se distribuye en envases de polietileno ó bolsas plásticas para su comercialización.

3.3 Definición de agua de pozo

Se define como agua de consumo que se obtiene de una perforación hecha en la tierra, este tipo de agua es de uso en el área rural.

Las aguas subterráneas se encuentran debajo de muchos tipos de formas geológicas.

Las áreas donde existen grandes cantidades de aguas subterráneas que pueden abastecer pozos o manantiales se llaman acuíferos, una palabra que significa "portador de agua".

Los acuíferos acumulan el agua entre los espacios de arena, grava, y rocas. La reserva subterránea depende en gran medida de la porosidad del acuífero, o la cantidad de espacios que hay para sostener el agua.

La capacidad del acuífero de transmitir agua, o su permeabilidad, se basa en parte al tamaño de estos espacios y la manera en que están interconectados.

3.4 Definición de agua de río

El agua de río se define como masa de agua en movimiento encausada a un afluente.

Los ríos son cursos continuos de agua encausada. Su acción geológica depende de la pendiente, de la naturaleza del terreno y del caudal del río.

También se define como corriente de agua de grandes dimensiones que sirve de canal natural de drenaje en una cuenca de drenaje.

3.5 Definición de agua de lago

Se define como una masa de agua estática. Masa aislada y permanente de agua, de considerable volumen con comunicación al mar o sin ella. Masa de agua continental de considerable tamaño.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

3.6 Definición de agua de mar

El agua de mar se define como una masa de agua en movimiento permanente que contiene un alto contenido de sal. Agua en la que la concentración de sales es relativamente alta (más de 10 000 mg/l).

3.7 Definición de agua residual

Se define como el agua resultante de cualquier uso, proceso u operaciones de tipo agropecuario, doméstico e industrial, sin que forme parte de productos finales.

4.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

5.0 Materiales

- Frascos de vidrio de 250 mL
- Bolsas de polietileno de (P.E.T.)
- Termómetro calibrado
- Rotulador indeleble
- Etiquetas
- Hielera

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

6.0 Preparativos generales previos a la toma de muestras

- 6.1 Habrá de disponerse de un número suficiente de envases con capacidad de 250 ml.
- 6.2 De ser posible, los envases deberán ser de material inerte que no contenga PVC. El vidrio sería adecuado, pero no es recomendable para llevarlo por su peso. Se recomienda utilizar botellas de medio litro o bolsas de polietileno de (P.E.T.).
- 6.3 Las botellas deberán estar estériles.
- 6.4 El recipiente debe mantener la temperatura, sobre todo cuando el tiempo sea caluroso.
- 6.5 Utilizar un rotulador indeleble para rotular las etiquetas de los envases.
- 6.6 También deberá contarse con un termómetro que permita la medida de la temperatura del agua y del aire circundante.

Se proporcionarán estos materiales a los colaboradores que vayan a realizar la toma de muestras en las salidas organizadas; pero, no obstante, conviene tener presentes las necesidades para una fácil coordinación.

7.0 Detalles de la recolección de muestras de aguas

- 7.1 Se debe dejar un espacio vacío en el frasco (al menos 2.0 cm) para facilitar la homogenización por agitación antes de proceder al análisis.
- 7.2 Se tomará la temperatura del agua y la del aire circundante. Para este último paso puede emplearse el mismo termómetro, esperando unos minutos a que adquiera la temperatura,
- 7.3 Es importante tomar una fotografía de la fuente, que será su descripción más elocuente. A veces un dibujo, hecho con suficiente calidad, puede ser más claro que la fotografía, si las condiciones para esta última no son adecuadas.
- 7.4 Si la fuente no estaba previamente ubicada y catalogada, habrá de anotarse su ubicación, de modo que pueda localizarse al realizar un segundo muestreo.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

7.5 Debe tomarse nota de cualquier circunstancia especial o curiosa que se advierta en la fuente o su entorno. Esto contribuirá a que la descripción de las fuentes contenga una información más completa.

7.6 Los frascos deberán transportarse en hieleras ó en una bolsa-termo o similar, para que la muestra se mantenga a baja temperatura. En el laboratorio deberán mantenerse en la refrigeradora por debajo de 10 °C. Hasta que sean entregadas para su análisis.

8.0 TOMA DE MUESTRA DE AGUA POTABLE

8.1 Identificar las muestras debidamente (fecha y hora de muestreo, tipo de muestra, punto de muestreo).

8.2 Usar frascos de muestreo estériles con capacidad mínima de 250 ml. La toma de muestra se determina de acuerdo con el objetivo del estudio.

8.3 Al hacer la toma de muestra se debe dejar un espacio vacío en el frasco (al menos 2.0 cm) para facilitar la homogeneización por agitación antes de proceder al análisis.

8.4 Para aguas cloradas utilizar frascos con tiosulfato de sodio.

8.5 Para la toma de muestra en el sistema de distribución, se debe seleccionar un grifo o llave que esté conectado directamente a la red, (no seleccionar viviendas con cisternas o tanque elevado), se debe dejar correr el agua por lo menos dos minutos, para limpiar la línea de servicio y la muestra sea representativa.

9.0 Manejo y preservación

9.1.1 El tiempo desde la recolección de la muestra hasta el inicio del análisis no debe exceder de 30 horas.

9.1.2 Mantener las muestras por debajo de los 10 °C durante el transporte, aún después de su llegada al laboratorio y comenzar el análisis de inmediato, como máximo a las dos horas siguientes de su llegada. El análisis nunca deberá postergarse hasta el día siguiente sin que sea Refrigerada (siempre que el tiempo no exceda las 30 horas).

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

10.0 DETERMINACIONES A REALIZAR EN AGUA POTABLE

- ❖ Determinación de coliformes totales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
por el método de recuento en placa
- ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
- ❖ Determinación de Estreptococos fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
- ❖ Determinación de Clostridium perfringens por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
- ❖ Determinación de Pseudomonas aeruginosas por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de Salmonella Sp. Por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de Vibrión cholerae Por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de Escherichia Coli por el método de tubos múltiples (NMP)

11.0 AGUA PURIFICADA DE USO FARMACÉUTICO NO ESTÉRIL

- 11.1 Identificar las muestras debidamente (fecha y hora de muestreo, tipo de muestra, punto de muestreo).
Para la recolección de muestras de agua purificada de uso farmacéutico no estéril. Usar frascos de muestreo estériles con capacidad mínima de 250 ml. La toma de muestra se determina de acuerdo con el objetivo del estudio.
- 11.2 Al hacer la toma de muestra se debe dejar un espacio vacío en el frasco (al menos 2.0 cm) para facilitar la homogeneización por agitación antes de proceder al análisis.
- 11.3 Para la toma de muestra en el sistema de distribución del laboratorio, se debe seleccionar un grifo o llave que esté conectado directamente a la red

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

12 Manejo y preservación

- 12.1 El tiempo desde la recolección de la muestra hasta el inicio del análisis no debe exceder de 30 horas.
- 12.2 Mantener las muestras por debajo de los 10 °C durante el transporte, aún después de su llegada al laboratorio y comenzar el análisis de inmediato o máximo a las dos horas siguientes de su llegada. El análisis nunca deberá postergarse hasta el día siguiente sin que sea refrigerada (siempre que el tiempo no exceda las 30 horas).

13 AGUA PURIFICADA ENVASADA

- 13.1 Identificar las muestras debidamente (fecha y hora de muestreo, tipo de muestra, punto de muestreo).
- 13.2 Para la recolección de muestras de agua purificada no se usa frasco si no que se recolecta un recipiente o una presentación de un litro o la presentación más pequeña de agua de cada una de las marcas a evaluar.
- 13.3 La toma de muestra se hace aleatoriamente de acuerdo al número de supermercados existentes en la zona, donde se distribuyen las diferentes marcas de agua a evaluar, se tomara una muestra de cada una de las marcas de agua purificada.
- 13.4 Si es una sola empresa la muestra se toma una muestra aleatoria de los lotes de producción

14 Manejo y preservación

- 14.1 El tiempo desde la recolección de la muestra hasta el inicio del análisis no debe exceder de 30 horas.
- 14.2 Mantener las muestras por debajo de los 10 °C durante el transporte, aún después de su llegada al laboratorio y comenzar el análisis de inmediato o máximo a las dos horas siguientes de su llegada. El análisis nunca deberá postergarse hasta el día siguiente sin que sea refrigerada (siempre que el tiempo no exceda las 30 horas).

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

15 Diseño y tamaño de muestra.

El universo en estudio son las industrias productoras de agua purificada, distribuidos en el país, considerando. Según la formula de Sturges, el tamaño de la muestra a considerar es de " X " lo cual representa un % del universo.

La formula que se aplico es la siguiente:

$$K = 1 + 3.332 \log n \text{ (formula de Sturges)}$$

Donde:

n= Número de industrias productoras de agua purificada en el país

K= Constante de Sturges

Para determinar el tamaño de muestra se utiliza la siguiente fórmula:

$$i = \frac{T_{\text{mayor}} - T_{\text{menor}}}{K}$$

Donde:

i = Tamaño de la muestra

T mayor= número de industrias que producen agua purificada en el país

T menor= 0

%= $[i / T_{\text{mayor}}] \times 100$

16 DETERMINACIONES A REALIZAR EN AGUA PURIFICADA DE USO FARMACÉUTICO NO ESTÉRILES

- ❖ Determinación de coliformes totales por el método de tubos múltiples (NMP)
 - por el método de filtro de membrana (FM)
 - por el método de recuento en placa
- ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de tubos múltiples (NMP)

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

por el método de filtro de membrana (FM)

- ❖ Determinación de *Streptococcus* fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
- ❖ Determinación de *Clostridium perfringens* por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
- ❖ Determinación de *Pseudomonas aeruginosa* por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de *Salmonella* Sp. Por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de *Vibrio cholerae* Por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de *Escherichia Coli* por el método de tubos múltiples (NMP)

17 AGUA DE POZO.

- 17.1** Identificar las muestras debidamente (fecha y hora de muestreo, tipo de muestra, punto de muestreo).
- 17.2 Usar frascos de muestreo estériles con capacidad mínima de 250 ml. La recolección de muestra se determina de acuerdo con el objetivo del estudio.
- 17.3 Al hacer la toma de muestra se debe dejar un espacio vacío en el frasco (al menos 2.0 cm) para facilitar la homogeneización por agitación antes de proceder al análisis.
- 17.4 Para aguas cloradas utilizar frascos con tiosulfato de sodio.
- 17.5 Para la toma de muestra de pozo con bomba de mano, se debe bombear agua durante 5 minutos antes de proceder a tomar la muestra. Si el pozo está equipado con una bomba mecánica, se hará la toma de un grifo de descarga. En caso que no exista sistema de bombeo, se hará la toma directamente del pozo por medio de un frasco estéril provisto de un peso en la base o por medio de un muestreador o cordel limpio. Se tomará la muestra 30 cm por debajo de la superficie y en la parte central, evitando coger natas flotantes.

18 Manejo y preservación

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

- 18.2 El tiempo desde la recolección de la muestra hasta el inicio del análisis no debe exceder de 30 horas.
- 18.3 Mantener las muestras por debajo de los 10 °C durante el transporte, aún después de su llegada al laboratorio y comenzar el análisis de inmediato o máximo a las dos horas siguientes de su llegada. El análisis nunca deberá postergarse hasta el día siguiente sin que sea refrigerada (siempre que el tiempo no exceda las 30 horas).

19 DETERMINACIONES A REALIZAR EN AGUA DE POZO

- ❖ Determinación de coliformes totales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
por el método de recuento en placa
- ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
- ❖ Determinación de Estreptococos fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
- ❖ Determinación de Clostridium perfringens por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
- ❖ Determinación de Pseudomonas aeruginosas por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de Salmonella Sp. por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de Vibrión cholerae por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de Escherichia Coli por el método de tubos múltiples (NMP)

20.0 AGUA DE RÍO.

- 20.1 Identificar las muestras debidamente (fecha y hora de muestreo, tipo de muestra, punto de muestreo).

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

- 20.2 Usar frascos de muestreo estériles con capacidad mínima de 250 ml. La recolección de muestra se determina de acuerdo con el objetivo del estudio.
- 20.3 Al hacer la toma de muestra se debe dejar un espacio vacío en el frasco (al menos 2.0 cm) para facilitar la homogeneización por agitación antes de proceder al análisis.
- 20.4 Toma de muestra de aguas de río. Para determinaciones microbiológicas suelen tomarse a una profundidad de 20-25 cms, por debajo de la superficie del agua de río. Donde el agua corra libre y no haya retenciones o concentración.

21 Manejo y preservación

- 21.2 El tiempo desde la recolección de la muestra hasta el inicio del análisis no debe exceder de 30 horas.
Mantener las muestras por debajo de los 10 °C durante el transporte, aún después de su llegada al laboratorio y comenzar el análisis de inmediato o máximo a las dos horas siguientes de su llegada. El análisis nunca deberá postergarse hasta el día siguiente sin que sea refrigerada (siempre que el tiempo no exceda las 30 horas).

22 DETERMINACIONES A REALIZAR EN AGUA DE RÍO

- ❖ Determinación de coliformes totales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
por el método de recuento en placa
- ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)

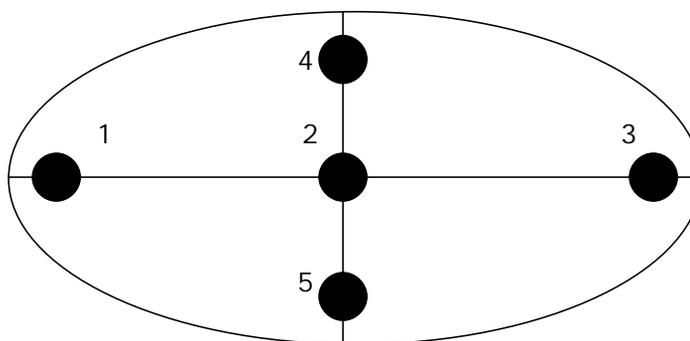
23 AGUA DE LAGO

- 23.2 Identificar las muestras debidamente (fecha y hora de muestreo, tipo de muestra, punto de muestreo).
- 23.3 Usar frascos de muestreo estériles con capacidad mínima de 250 ml. La toma de muestra se determina de acuerdo con el objetivo del estudio.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

- 23.4 Al hacer la toma de muestra se debe dejar un espacio vacío en el frasco (al menos 2.0 cm) para facilitar la homogeneización por agitación antes de proceder al análisis.
- 23.5 Para la toma de muestras de agua de lago. Se hará la toma directamente en distintos lugares del lago por medio de un frasco estéril provisto de un peso en la base o por medio de un muestreador o cordel limpio. Se tomará la muestra 50 cm de profundidad, evitando coger natas flotantes.

Puntos de muestreo en el lago



24 Manejo y preservación

- 24.2 El tiempo desde la recolección de la muestra hasta el inicio del análisis no debe exceder de 30 horas.
- 24.3 Mantener las muestras por debajo de los 10 °C durante el transporte, aún después de su llegada al laboratorio y comenzar el análisis de inmediato, como máximo a las dos horas siguientes de su llegada. El análisis nunca deberá postergarse hasta el día siguiente sin que sea refrigerada (siempre que el tiempo no exceda las 30 horas).

25 DETERMINACIONES A REALIZAR EN AGUA DE LAGO

- ❖ Determinación de coliformes totales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

por el método de recuento en placa

- ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)

26 AGUA DE MAR

- 26.2 Identificar las muestras debidamente (fecha y hora de muestreo, tipo de muestra, punto de muestreo).
- 26.3 Usar frascos de muestreo estériles con capacidad mínima de 250 ml. La toma de muestra se determina de acuerdo con el objetivo del estudio.
- 26.4 Al hacer la toma de muestra se debe dejar un espacio vacío en el frasco (al menos 2.0 cm) para facilitar la homogeneización por agitación antes de proceder al análisis.
- 26.5 Para la toma de muestras de agua de mar. Se hará la toma directamente desde costa en mar por medio de un frasco estéril provisto de un peso en la base o por medio de un muestreador o cordel limpio. Se tomará la muestra 50 cm de profundidad, evitando coger natas flotantes a 5.0 Kilómetros de la costa.

27 Manejo y preservación

- 27.2 El tiempo desde la recolección de la muestra hasta el inicio del análisis no debe exceder de 30 horas.
- 27.3 Mantener las muestras por debajo de los 10 °C durante el transporte, aún después de su llegada al laboratorio y comenzar el análisis de inmediato o máximo a las dos horas siguientes de su llegada. El análisis nunca deberá postergarse hasta el día siguiente sin que sea refrigerada (siempre que el tiempo no exceda las 30 horas).

28 DETERMINACIONES A REALIZAR EN EL AGUA DE MAR

- ❖ Determinación de coliformes totales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)
por el método de recuento en placa

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

- ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)

29 AGUA RESIDUAL.

- 29.2 Identificar las muestras debidamente (fecha y hora de muestreo, tipo de muestra, punto de muestreo).
- 29.3 Usar frascos de muestreo estériles con capacidad mínima de 250 ml. La toma de muestra se determina de acuerdo con el objetivo del estudio.
- 29.4 Al hacer la toma de muestra se debe dejar un espacio vacío en el frasco (al menos 2.0 cm) para facilitar la homogeneización por agitación antes de proceder al análisis.
- 29.5 Toma de muestra de aguas residuales. Cada muestra puntual deberá estar constituida por la mezcla homogénea de dos submuestras de igual volumen, extraídas de la superficie y del interior del fluido, debiéndose observar las condiciones de colecta, tipo de envase, preservación y tiempo entre la toma de muestras y el análisis correspondiente al método.
- 29.6 Lugar de muestreo. El lugar de toma de muestras será una cámara o dispositivo especialmente habilitado para tal efecto, en donde concurren previamente mezclados, todos los líquidos provenientes del proceso industrial.

30 Manejo y preservación

- 30.2 El tiempo desde la recolección de la muestra hasta el inicio del análisis no debe exceder de 30 horas.
- 30.3 Mantener las muestras por debajo de los 10 °C durante el transporte, aún después de su llegada al laboratorio y comenzar el análisis de inmediato o máximo a las dos horas siguientes de su llegada. El análisis nunca deberá postergarse hasta el día siguiente sin que sea refrigerada (siempre que el tiempo no exceda las 30 horas).

31 DETERMINACIONES A REALIZAR EN AGUA RESIDUAL

- ❖ Determinación de coliformes totales por el método de tubos múltiples (NMP)
por el método de filtro de membrana (FM)

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

por el método de recuento en placa

- ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de filtro de membrana (FM)

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGINA: __ DE __

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Toma de muestra de agua para análisis microbiológico	PÁGI NA: __ DE __

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR I SO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

**PRECAUCIONES DE SEGURIDAD PERSONAL Y DE OPERACIÓN EN EL
LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS**

Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN Precauciones de seguridad personal y de operación en el laboratorio de análisis microbiológico de aguas	CODIGO: _____ PÁGINA: _ DE _
--------------------------------------	---	---------------------------------

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación en el cual se describan las precauciones de seguridad personal y de operación necesarias para garantizar la protección del personal del laboratorio de análisis microbiológico de aguas.

2.0 Alcance y aplicación

Este procedimiento es aplicable a todas las áreas y a todas las labores realizadas en un laboratorio de análisis microbiológico de aguas

3.0 Resumen del procedimiento:

En este procedimiento se resumen todos los pasos referentes a las precauciones de seguridad personal y precauciones de operación que hay que tomar en un laboratorio de análisis microbiológico de aguas.

4.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

5.0 Precauciones de seguridad

- 5.1 Se requiere el uso de gabacha , gorro, mascarilla y guantes para la protección personal
- 5.2 No succionar las pipetas con la boca. El uso de bombillas para dicha actividad es necesario para evitar una posible ingestión de la muestra y por ende que el analista pueda contraer algún tipo de enfermedad.
- 5.3 Lavarse bien las manos antes y después del procesamiento de las muestras.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN Precauciones de seguridad personal y de operación en el laboratorio de análisis microbiológico de aguas	CODIGO: _____ PÁGINA: _ DE _
--------------------------------------	---	---------------------------------

- 5.4 Desinfectar la mesa de trabajo con un desinfectante no tóxico (Por ejemplo una solución de alcohol yodado al 3%), antes y después del análisis.
- 5.5 No usar hojas de presión, debido a las escasas medidas de seguridad que tienen y a las dificultades en el control operativo.
- 5.6 Una vez cumplido el análisis, desinfectar y esterilizar todo el material utilizado antes de su disposición final.
- 5.7 Medidas aplicables en caso de exposición accidental y descontaminación.
En caso que el frasco con una muestra o material contaminado o que contiene cultivos se quiebre, estos deben recogerse con la ayuda de guantes y depositarse en bolsas autoclavables para inmediatamente proceder a su esterilización por autoclave antes de su disposición final. Se debe limpiar la zona afectada con un desinfectante adecuado.
- 6.0 Precauciones de operación**
- 6.1 El tiempo desde la recolección de la muestra hasta el inicio del análisis no debe exceder de 30 horas.
- 6.2 Cuando se tomen muestras de lugares lejanos, se recomienda enviar frascos con agua destilada estéril como muestras viajeras control. Estas se analizarán y se verificará si su esterilidad se mantuvo durante el transporte hasta el laboratorio. En caso salieran contaminadas, se invalida todo el lote de muestras y se solicita un nuevo muestreo.
- 6.3 Los frascos con muestras y/o diluciones deben agitarse vigorosamente para asegurar una buena homogeneización.
- 6.4 Utilizar solamente agua de grado reactivo para la preparación de medios de cultivo, reactivos y agua de dilución.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Precauciones de seguridad personal y de operación en el laboratorio de análisis microbiológico de aguas	PÁGINA: _ DE _

- 6.5 El medio de cultivo esterilizado refrigerado, debe incubarse de la noche a la mañana previo al análisis, para evitar un cambio brusco de temperatura que pueda perjudicar el desarrollo de las bacterias coliformes. Se deben descartar los medios de cultivo con crecimiento.
- 6.6 Los materiales que se utilizan para la detección de clostridios deben ser autoclavados ya que las esporas no se inactivan con la ebullición
- 6.7 No mantener el agua de dilución con inóculo por más de 30 minutos a temperatura ambiente por que puede ocasionar la muerte de las bacterias.
- 6.8 Los tiempos requeridos para esterilizar en autoclave son los que se enumeran a continuación. A excepción de los filtros de membrana, almohadillas y medios que contienen carbohidratos, los tiempos indicados son tiempos mínimos que pueden requerir ajustes de acuerdo a volúmenes envases y cargas.

MATERIALES Y EQUIPOS	TIEMPO
Medios que contienen carbohidratos	12-15'
Materiales contaminados	30'
Frascos de recolección de muestras	15'
Material de vidrio individual	15'
Blanco de agua de dilución	15'
Agua de enjuague(0.1-1 L)	15-30' *

*El tiempo depende del volumen de agua por envase y la carga del autoclave.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN Precauciones de seguridad personal y de operación en el laboratorio de análisis microbiológico de aguas	CODIGO: _____ PÁGINA: _ DE _
--------------------------------------	---	---------------------------------

- 6.9 El lavado del material de vidrio debe hacerse con un detergente adecuado como el cloruro de benzalconio , se debe enjuagar con agua caliente para eliminar todos los residuos del compuesto lavado, y por último con agua destilada o desionizada para el enjuague final.
- 6.10 El material de vidrio se esteriliza en recipientes de metal o acero inoxidable a 170 °C durante 2 horas. Los frascos de muestreo con tapas de plástico y otros materiales no resistentes a la esterilización por calor seco, deben autoclavarse durante 15 minutos a 121 °C y 15 lbs de presión.
- 6.11 Si en los análisis de rutina no se obtiene un resultado positivo de coliformes totales durante un trimestre, el laboratorio debe de realizar el procedimiento de coliformes totales utilizando un control (cultivo puro o muestra positiva) para coliformes totales positivos, con el objeto de descartar resultados falso negativos.
- 6.12 Verificar periódicamente el funcionamiento de los equipos a utilizar.
- 6.13 Al comienzo de cada serie de filtraciones, utilizar unidades de filtración estériles como mínima precaución para evitar la contaminación accidental.
- 6.14 Considerar que se interrumpe una serie de filtraciones cuando transcurre un intervalo de 30 o más minutos entre la filtración de dos muestras. Si se produjera una interrupción de este tipo, la filtración siguiente se debe tratar como si fuera una nueva serie, esterilizándose los soportes de los filtros de membrana que estén utilizándose.
- 6.15 El tiempo máximo de almacenamiento en refrigeración de los medios de cultivo es de 96 horas para caldos, y dos semanas para agar.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN Precauciones de seguridad personal y de operación en el laboratorio de análisis microbiológico de aguas	CODIGO: _____ PÁGINA: _ DE _
--------------------------------------	---	---------------------------------

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN Precauciones de seguridad personal y de operación en el laboratorio de análisis microbiológico de aguas	CODIGO: _____ PÁGINA: _ DE _
--------------------------------------	---	---------------------------------

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN

**PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO DE EQUIPOS Y MATERIALES PARA
UN LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE AGUAS**

Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	 FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	 FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE _

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación en el cual se manifiesten las pruebas necesarias para el aseguramiento del buen funcionamiento de los equipos y materiales del laboratorio.

2.0 Alcance y aplicación

Este procedimiento puede utilizarse para la evaluación de equipos y materiales de un laboratorio de análisis microbiológico de aguas.

3.0 Resumen del procedimiento:

En este procedimiento se resumen todas las evaluaciones necesarias para el buen funcionamiento de los equipos calibrados de un laboratorio de análisis microbiológico de aguas.

4.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

5.0 Materiales y equipos

5.1 Equipos calibrados

5.1.1 Estufa, debe de estar provisto de termómetro calibrado y termostato para mantener la temperatura de esterilización entre 170-180°C durante por lo menos dos horas. Debe tener capacidad suficiente para la circulación del aire caliente en su interior.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

5.1.2 Autoclave, de tamaño suficiente para permitir la circulación de vapor. Debe tener fuente interna de calor, termómetro con sensor de salida, manómetro y válvula de seguridad operativa. El autoclave debe mantener la temperatura de esterilización durante todo el ciclo y completar un ciclo de 45 minutos, cuando se usa un periodo de esterilización de 12-15 minutos, 15 lbs de presión y 121 ± 0.5 °C

Para que la esterilización sea eficiente todo el aire debe ser eliminado del interior del autoclave antes de iniciar el periodo de esterilización. Concluido el auto clavado, la presión debe bajar lentamente para asegurar que el medio no hierva y se formen burbujas en los tubos de Durham.

5.1.3 Flujo laminar

5.1.4 Incubadora de aire caliente. Debe tener un dispositivo interno de monitoreo de temperatura y mantener la misma a 35.0 ± 0.5 °C. Para incubadoras no portátiles, los termómetros deben colocarse en la parte superior e inferior de los anaqueles del área en uso, con el bulbo del termómetro sumergido en liquido como el agua.

5.1.5 Refrigeradora. Debe mantener una temperatura entre 1-5°C. Los termómetros deben estar graduados en intervalos de 1°C y el bulbo del termómetro debe estar sumergido en liquido como el agua.

5.1.6 Equipo de filtración. Las unidades del equipo deben ser de plástico autoclavable, acero inoxidable o vidrio, no debe estar ralladas o corroídas y no deben tener fugas.

5.1.7 Equipo de vacío.

5.1.8 Balanzas calibradas deben tener sensibilidad de 0.1g.

5.1.9 Destilador de agua. Debe producir agua no tóxica que pueda impedir el desarrollo de bacterias. Se recomienda efectuar un tratamiento previo si es que el agua que alimenta el destilador es de baja calidad (por ejemplo que contenga dureza, compuestos orgánicos o turbiedad). Una columna de intercambio iónico, utilizando

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

el ciclo de cloruro de sodio, puede ser colocada antes del destilador para ablandar las aguas duras.

- 5.1.10 Medidor de PH calibrado. Dotado de un sistema electrónico capaz de dar lecturas directas con exactitud de ± 0.1 unidades de PH.
- 5.1.11 Contador de colonias Québec
- 5.1.12 Mecheros de Bunsen.
- 5.1.13 Agitador magnético.
- 5.1.14 Frascos para la toma de muestra. Deben ser botellas de vidrio no corrosivo o de plástico de boca ancha con tapas de vidrio o tapas con forros no tóxicos para resistir la esterilización repetida. La capacidad de los envases de muestra debe ser de al menos 250 ml de muestra los tapones de los frascos deben estar cubiertos con papel aluminio o papel resistente a la esterilización.
- 5.1.15 Frascos con agua de dilución. Con una capacidad de 200 ml, deben ser autoclavables con tapas de roscas cuyo revestimiento no produzca compuestos tóxicos o bacteriológicos al ser esterilizados.
- 5.1.16 Pipetas de 10 ml deben ser exactas con una tolerancia de ± 0.25 ml de error. deben tener la graduación claramente marcada y la punta intacta.
- 5.1.17 Tubos de ensayos y tubos Durham. Deben ser resistentes al auto clavado. Con dimensiones de 16 x 150 mm (para medios de concentración simple) y 25 x 150 mm (para concentración doble).
- 5.1.18 Placas estériles descartables de 50 mm x 12 mm o placas de 60 mm x 10 mm de vidrio autoclavables
- 5.1.19 Membranas pre-esterilizadas. Deben ser de éster de celulosa, blancos con cuadrículas de 47 μm de diámetro y tamaño de poro de 0.45 μm .

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

- 5.1.20 Almohadillas absorbentes (que absorban entre 1.7 a 2.0 ml de medio)
- 5.1.21 Pinzas sin dientes con borde plano (esterilizadas en alcohol etílico al 95% y a la llama).
- 5.1.22 Equipo para preparación de medios de cultivos (probetas, matraces, espátulas, vasos de precipitación, magnetos).
- 5.1.23 Asas de inoculación. Deben ser metálicas y con punta de níquel-cromo o platino.
- 5.1.24 Estuches de pipetas. Se debe usar estuches de acero inoxidable o aluminio, cilíndricas o rectangulares, de 5 a 7.5 cm de ancho y una longitud de 40 cm. Si no se dispone de ellas, se sustituirán por envolturas de papel individuales (kraft).
- 5.1.25 Materiales diversos como algodón, papel kraft, papel aluminio, tijeras, plumón, mascarillas, guantes, etc.

6.0 Pruebas de equipos

- 6.1 Los medidores de PH deben estar calibrados, además deben estandarizarse antes de cada periodo de uso con soluciones amortiguadoras estándares de PH 7.0, 4.0 y 10.0. Cualquiera que sea la combinación de que cubra el PH deseado de los medios o reactivos. (ver cuadro 1)

Los frascos con solución amortiguadora para la calibración del medidor de PH deben registrar la fecha de preparación. Esta solución debe descartarse cuando presenta turbiedad o sedimento.

- 6.2 En las incubadoras la temperatura corregida por calibración debe registrarse dos veces al día durante los días en uso, las lecturas de la temperatura deben hacerse espaciadas por lo menos cada 4 horas. (ver cuadro 2)

FACULTAD DE QUI MICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

- 6.3 La temperatura del refrigerador debe ser registrada durante los días en uso por lo menos una vez al día. (ver cuadro 3)
- 6.4 Cada vez que se use el autoclave, se debe registrar la fecha, contenido, tiempo de esterilización, temperatura, tiempo total para cada ciclo e iniciales del analista. (ver cuadro 4 y 5)
Se debe mantener una copia del contrato de servicio o protocolo de mantenimiento interno y registro del mantenimiento. El mantenimiento debe realizarse, mínimo, anualmente.
Un termómetro de registro de la temperatura máxima o un dispositivo de registro continuo debe usarse durante cada ciclo, para asegurar que se alcance y registre la temperatura.
- 6.5 Las ampollas de Bacillus stearothermophilus deben usarse semanalmente en el autoclave y horno de aire caliente para confirmar la esterilización. Estas se colocan junto con el material a esterilizar, luego son incubadas a 55 °C por 24 horas. La confirmación de esterilidad se realiza por la ausencia de cambio de color y turbiedad en las ampollas. (ver cuadro 4, 5 y 6)
- 6.6 Debe evaluarse mensualmente la calidad del agua de grado reactivo, y ésta debe cumplir con los siguientes criterios: Conductividad: < 2µmhos/cm (µsiemens/cm) a 25 °C; cloro residual: < 0.1 mg/l y recuento heterotrófico en placa: < 500 UFC/ml. (ver cuadro 7)
- 6.7 Por lo menos un frasco estéril debe seleccionarse aleatoriamente de cada lote y verificar su esterilidad al agregar 25 ml de un caldo estéril no selectivo (por ejemplo, soya triptica, soya tripticasa o triptona). El caldo debe incubarse a 35 ± 0.5 °C durante 24 horas y verificar si hay crecimiento. Esterilizar nuevamente si se detecta crecimiento.(ver cuadro 8)
- 6.8 En cada lote de agua de dilución se debe verificar la esterilidad al agregar 50 ml de agua a 50 ml de un caldo no selectivo de doble concentración (por ejemplo soya triptica, soya tripticasa o triptona) incubar a 35 ± 0.5 °C por 24 horas y controlar el crecimiento. Descartar si se detecta crecimiento. (ver cuadro 9)

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

- 6.9 Controlar la esterilidad del lote de los medios de cultivos preparados, incubándolos a temperatura adecuada por 24 a 48 horas, luego de las cuales se observa si hay crecimiento. Además debe examinarse el medio estéril en los tubos para asegurar que los tubos Durham no tengan burbujas de aire y estén al menos la mitad a dos tercios después de que se agrega la muestra de agua (ver cuadro 9)
- 6.10 Cada nuevo lote de medios deshidratados o preparados debe verificarse antes del uso con controles de cultivo positivo y negativo. Estos organismos de control pueden provenir de ceparios (cuya pureza es verificada periódicamente) o discos comercialmente disponibles impregnados con el organismo. Los resultados deben registrarse. (ver cuadro 10).
- 6.11 Si se usa una lámpara UV (254nm) para esterilización, ésta debe probarse trimestralmente con un fotómetro UV o placa de agar inoculado. La lámpara debe reemplazarse si emite menos de 70% de su producción inicial o si una placa de agar inoculado que contiene 200 a 250 microorganismos, expuestos a la luz UV durante dos minutos, no muestra una reducción de recuentos de 99%. Se pueden usar otros métodos para probar la lámpara si los datos demuestran que son efectivos.
- 6.12 El control de calidad de las membranas se realiza colocando por lo menos una membrana de cada lote en 50 ml de un caldo nutritivo, incubándolo a 35 °C durante 24 horas, luego de las cuales se verifica su esterilidad por la ausencia de turbiedad en el medio. (ver cuadro 11)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

CUADRO N° 2



**Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia
Laboratorio de Microbiología**

Registro de control de temperatura

Equipo: Incubadora

Temperatura especificada: $35 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$

A.M: Antes del medio día

P.M: Pasado del medio día

Fecha	Temperatura		T máxima	T mínima	Observaciones	Analista
	AM	PM				
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

CUADRO N° 3



**Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia
Laboratorio de Microbiología**

Registro de control de temperatura

Equipo: Refrigeradora

Temperatura especificada: 1 - 5 °C

A.M: Antes del medio día

P.M: Pasado del medio día

Fecha	Temperatura		T máxima	T mínima	Observaciones	Analista
	AM	PM				
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

CUADRO N° 4



**Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia
Laboratorio de Microbiología**

Registro de preparación y esterilización de medios, reactivos y equipos

Fecha	Tipo de medio	Esterilización		F Ciclo	PH Final	Control Ampollas	Analista
		F	T °C				

* Control: Con ampollas de Bacillus stearothermophilus las cuales se colocan en el autoclave y luego se incuban a 55 °C por 24 horas. La confirmación de esterilidad se realiza por la ausencia de cambio de color y turbiedad en las ampollas.

F: Frecuencia T °C: Temperatura F ciclo: Frecuencia de ciclo

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

CUADRO N° 6



**Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia
Laboratorio de Microbiología**

Registro de esterilización de material por calor seco

Fecha	Prueba	Esterilización		Control*	Analista
		tiempo	T °C		

* Control: Con ampollas de Bacillus stearothermophilus, las cuales son se someten a calor seco se incuban a 55 °C por 24 horas. La confirmación de esterilidad se realiza por la ausencia de cambio de color y turbiedad en ampollas.

T °C: Temperatura

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE __

CUADRO N° 9



**Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia
Laboratorio de Microbiología**

Registro de control de la esterilidad del agua y medios de cultivo

Fecha	Prueba	Resultados de esterilidad *	Analista

* Los medios preparados son incubados por 48 horas a 35 °C. 50 ml de agua de enjuague es agregado a 50 ml de caldo BHI de doble concentración e incubado por 24 horas a 35 °C, y examinado para crecimiento/no crecimiento.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE _

CUADRO N° 10



**Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia
Laboratorio de Microbiología**

Registro de control de medios de cultivos con cultivos positivos / negativos

Fecha	Medio	Cultivo Control	Resultados	Analista

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	PÁGINA: __ DE _

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUI MICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Pruebas de funcionamiento de equipos y materiales para un laboratorio de análisis microbiológicos de aguas	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
---------------------------------------	---	-----------------------------------

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de coliformes totales, mediante el procedimiento de fermentación en tubos múltiple, es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar y aguas residuales. El límite de confianza es de 95 % cuando se utilizan diversas combinaciones de resultados positivos de series de 10, 1 y 0.1 mL en series de 5 tubos. Los resultados de este método se reportan en Números Más Probable (NMP) de microorganismos existentes.

3.0 Definiciones:

3.1 Grupo coliformes

Las bacterias del grupo coliformes se encuentran entre otros lugares del medio ambiente, en el intestino, en heces humanas y de animales de sangre caliente. Se denominan organismos coliformes a las bacterias gram-negativas, en forma de bastoncillos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos y oxidasa negativa, capaces de crecer en presencia de sales biliares u otros compuestos tenso activos que fermentan la lactosa a temperaturas de 35 a 37 °C con producción de ácido, gas y aldehído entre 24 a 48 horas. Pertenecen a este grupo lo géneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella.

3.2 Número Más Probable (NMP)

Es el cálculo de la densidad probable de bacterias coliformes basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La precisión de cada prueba depende del número de tubos utilizados. Tres series de dilución son necesarias para la obtención del código de NMP. Las tablas de

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de hacer las porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP podrá resultar mayor o menor que el número real de densidad bacteriana. La densidad bacteriana se obtiene a través de la fórmula facilitada o a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor determinado y se expresa como NMP de coliformes/100 ml.

Abreviaciones:

- Numero Más probable (NMP)
- Caldo lauril triptosa : (CLT)
- Caldo lactosado verde brillante billis 2% : (CLVBB)

4.0 Resumen del método:

El método consta de dos etapas: prueba presuntiva y confirmativa.

La presuntiva consiste en colocar volúmenes determinados de muestras de agua en una serie de tubos conteniendo caldo lauril triptosa y luego son incubados a $35 \text{ ó } 37 \pm 0.5 \text{ °C}$ durante 24-48 horas. En esta prueba presuntiva la actividad metabólica de las bacterias es estimulada vigorosamente y ocurre una selección inicial de organismos que fermentan la lactosa con producción de gas.

La prueba confirmativa consiste en transferir un inóculo de cada tubo positivo de la prueba presuntiva, a tubos conteniendo caldo lactosado verde brillante billis 2% e incubados posteriormente a $35 \pm 0.5 \text{ °C}$ durante 24-48 horas. Esta prueba reduce la posibilidad de resultados falsos-positivos que pueden ocurrir por la actividad metabólica de bacterias formadoras de esporas.

La formación de gas dentro de las 24 a 48 horas, constituye una prueba confirmativa de la presencia de coliformes. Los resultados se expresan en términos de Número Más Probable (NMP) de microorganismos. El límite de detección es de 1.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __DE __
--------------------------------------	---	----------------------------------

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Se recomienda el uso de medios deshidratados o preparados comercialmente. El medio deshidratado debe almacenarse en un lugar fresco y seco. Los medios aglutinados o decolorados deben descartarse, así mismo, el medio debe ser descartado en la fecha de expiración indicada por el fabricante.

El medio estéril en los tubos debe examinarse para asegurar que los tubos de Durham no tengan burbujas de aire y estén al menos la mitad a dos tercios cubiertos después de agregar la muestra.

6.1 Caldo lauril triptosa

Disolver 35.6 g del medio deshidratado por litro de agua destilada (caldo simple). Ajustar el PH a 6.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio (NaOH 1N) y distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 16 mm x 150 mm provistos en su interior con un tubo de fermentación invertido (Durham), tapar y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Para caldo de doble concentración, disolver 71.2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Ajustar el PH a 6.8 ± 0.2 . con hidróxido de sodio (NaOH 1N). Distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 25 x 150 mm provisto también en su interior con tubos Durham y proceder a esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

Cuadro 1 - concentración de caldo lauril triptosa (CLT) en función al volumen de muestra adecuado

Tubos con CLT ml	Volumen de muestra ml	Concentración del medio	CLT g/l
10	0.1 a 1.0	1 x (simple)	35.6
10	10	2 x (doble)	71.2

6.2 Caldo lactosado verde brillante bilis 2 %

Disolver 40.0 g de caldo deshidratado para un litro de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.2 con hidróxido de sodio (NaOH 1N) y distribuir 10 ml en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm, provisto en su interior con un tubo Durham invertido. Tapar y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

6.3 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121 °C.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121°C , un volumen de 90 ± 2 ml.

6.4 Tíosulfato de sodio

Disolver 3 g de tiosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua potable, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.5 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Prueba presuntiva I

7.1.1 Preparar una serie de cinco tubos conteniendo 10 ml de caldo lauril triptosa de concentración doble y, 2 series de cinco tubos con 10 ml de caldo lauril triptosa de concentración simple. Colocarlos en una gradilla y codificar los tubos anotando el número asignado a la muestra, volumen (y/o dilución) a inocular y fecha.

7.1.2 Si las muestras están muy contaminadas se procede a realizar las diluciones respectivas, identificando y codificando los frascos con cada una de las diluciones.

7.1.3 Las muestras de agua deben agitarse vigorosamente unas 25 veces antes de ser analizadas, para asegurar una buena homogeneización.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

- 7.1.4 En caso de realizar diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original.
- 7.1.5 Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra original. Continuar con éste proceso dependiendo del grado de contaminación de la muestra.
- 7.1.6 Ordenar los frascos conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución).
- 7.1.7 Agitar vigorosamente por unas 3 veces el frasco con la última dilución efectuada y con una pipeta estéril, inocular 1 ml de la dilución en cada uno de los 5 tubos con caldo lauril triptosa de concentración simple correspondiente a dicha dilución.
- 7.1.8 Proceder de la misma forma inculando de la muestra más diluida a la más concentrada, utilizando la misma pipeta.
- 7.1.9 Inocular también 1 ml de la muestra original en cinco tubos con caldo lauril triptosa de concentración simple y 10 ml en cinco tubos con caldo lauril triptosa de concentración doble.
- 7.1.10 Incubar los tubos por 24 ± 2 horas a 35 ± 0.5 °C. Examinar y separar los tubos de caldo lauril triptosa positivos, es decir, aquellos que presenten a la vez formación de gas en el tubo Durham, turbiedad y fermentación. Anotar los resultados. Todos los tubos positivos deben pasar a la prueba confirmativa. Reincubar los tubos negativos por 24 horas más.
- 7.1.11 Realizar la segunda lectura. Separar y anotar los resultados de los tubos positivos y pasarlos a la prueba confirmativa. Los tubos negativos no se toman en cuenta; todas las muestras que producen solamente un cultivo turbio (crecimiento pesado, es

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

decir opaco) debido a la ausencia de gas/acido, en caldo lauril triptosa deben invalidarse y solicitar una nueva muestra de la misma ubicación que la muestra original invalidada.

7.2 Prueba presuntiva II

7.2.1 Preparar una serie de 5 tubos conteniendo 10 ml de caldo lauril triptosa de doble concentración.

7.2.2 Codificar los tubos anotando el número asignado a la muestra, volumen inoculado y fecha.

7.2.3 Inocular 20 ml de muestra a cada uno de los tubos.

7.2.4 Proceder como en la prueba presuntiva I, desde 7.1.1 a 7.1.11

7.2.5 Para calcular el NMP de la prueba presuntiva II, véase el siguiente cuadro

Cuadro 2

No. de tubos con reacción positiva	NMP / 100 ml	Limite de confianza de 95%	
		Inferior	Superior
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.05	6.3
2	2.6	0.3	9.6
3	4.6	0.8	14.7
4	8.0	1.7	26.4
5	>8.0	4.0	Infinito

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

7.3 Prueba presuntiva III

- 7.3.1 Prepara una serie de 10 tubos conteniendo 10 ml de caldo lauril triptosa de doble concentración o de concentración 1.5.
- 7.3.2 Inocular 10 ml de muestra a cada uno de los tubos.
- 7.3.3 Proceder como en la prueba presuntiva I desde 7.1.1 a 7.1.11
- 7.3.4 Para calcular el NMP de la prueba presuntiva III, véase el siguiente cuadro

Cuadro 3

No. de tubos con reacción positiva	NMP / 100 ml	Limite de confianza de 95%	
		Inferior	Superior
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	>23.0	13.5	Infinito

La prueba presuntiva I, II, III se utilizaran siempre que tengamos muestras muy contaminadas, esto con el objetivo de tener un resultado más confiable y poder seleccionar los tubos positivos que nos servirán en la prueba confirmativa

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __DE __
--------------------------------------	---	----------------------------------

7.4 Prueba confirmativa

- 7.4.1 Utilizar caldo lactosado verde brillante bilis 2 %.
- 7.4.2 Marcar los tubos de caldo lactosado verde brillante bilis 2% que corresponden a cada tubo positivo de caldo lauril triptosa de la prueba presuntiva.
- 7.4.3 Agitar cada tubo de caldo lauril triptosa presuntivo positivo y con una asa previamente esterilizada y enfriada se siembra, extraer una asada del material e inocular en el tubo de caldo verde brillante bilis 2% evitando tocar la película superficial que puede formarse en el tubo de caldo lauril triptosa.
- 7.4.4 Incubar los tubos de caldo verde brillante bilis 2% durante 24 a 48 horas a 35 ± 0.5 °C.
- 7.4.5 Proceder a la lectura luego de 24 horas, considerando prueba positiva confirmativa para coliformes totales a los tubos que presenten, a la vez, formación de gas en el tubo Durham, turbiedad y fermentación.
- 7.4.6 Reincubar los tubos sin crecimiento 24 horas adicionales.
- 7.4.7 Continuar con la lectura luego de las 24 horas adicionales y proceder a realizar la segunda lectura. Separar y anotar los resultados de los tubos positivos, los tubos negativos no se toman en cuenta.
- 7.4.8 Anotar los resultados y calcular el NMP a partir de los datos obtenidos en la prueba confirmativa.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

8.0 Análisis de datos.

8.1 Resultados

8.1.1 El cálculo de la densidad probable de bacterias coliformes totales está basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La densidad de coliformes totales se expresa como NMP de coliformes por 100 ml y se obtiene a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor de NMP determinado para ello, se necesitan tres diluciones para la obtención del código del NMP, ver el cuadro 7

8.1.2 Aunque los códigos presentados en el cuadro anterior se refieran específicamente a la combinación de resultados positivos obtenidos cuando son inoculados volúmenes de 10 ml, 1 ml y 0.1 ml de muestra, éstos pueden ser usados para volúmenes mayores o menores de siembra ajustando con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de NMP en la tabla} \times \frac{10}{\text{Vol. dilución inicial de la muestra seleccionada}} = \text{NMP} / 100 \text{ ml}$$

8.1.3 Cuando más de tres diluciones decimales son inoculadas, se debe determinar las tres diluciones significativas para el código. Estas diluciones se pueden determinar de acuerdo a las siguientes reglas:

8.1.3.1 Como primer número del código se seleccionara la mayor dilución en la que todos los tubos resultaran positivos y las dos diluciones subsiguientes para completar el código. (ver cuadro 4 prueba 1 y 2)

8.1.3.2 Si menos de tres diluciones tienen resultados positivos, se seleccionaran las tres mayores diluciones que incluyen los tubos positivos para completar el código. (ver cuadro 4 prueba 3)

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __DE __
--------------------------------------	---	----------------------------------

- 8.1.3.3 Si resultaran tubos positivos en diluciones mayores que en aquellas seleccionadas para el código, los resultados positivos se desplazan hacia las diluciones seleccionadas a fin de incrementar los tubos positivos en la ultima dilución seleccionada. (ver cuadro 4 prueba 4)
- 8.1.3.4 Si resultaran tubos negativos en volúmenes mayores de muestra que los escogidos para el código, el primer número del código será el de la mayor dilución en la cual todos los tubos resultaran positivos, con las siguientes diluciones más altas para completar el código. (ver cuadro 4 prueba 5)
- 8.1.3.5 Si todos los tubos resultaran positivos, seleccionar para el código, aquellas tres diluciones mayores. (ver cuadro 4 prueba 6)
- 8.1.3.6 Si todos los tubos resultaran negativos, seleccionar para el código aquellas tres diluciones menores. (ver cuadro 4 prueba 7)
- 8.1.3.7 Si no resultaran tubos positivos en una dilución intermedia, seleccionar para el código la serie de menor dilución con tubos positivos y otra de mayor dilución con tubos positivos. (ver cuadro 4 prueba 8)
- 8.1.3.8 Si solamente la dilución intermedia resultara positiva, escoger para el código la serie de menor dilución y otra de mayor dilución para el código. (ver cuadro 4 prueba 9)

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

Cuadro 4. Valores para la selección del código

Prueba	Tubos positivos/ml y volumen de muestra					Código
	10	1	0.1	0.01	0.001	
1	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	0	0	5-2-0
2	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	5-2-1
3		<u>3</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	3-1-0
4	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	5-3-1
5	4	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	5-4-0
6		5	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	5-5-5
7		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0-0-0
8		4	<u>0</u>	<u>1</u>	0	4-0-1
9		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0-1-0

8.2 Registro de datos

- 8.2.1 En el cuadro 5 se esquematiza una hoja de registro de datos para la prueba de coliformes fecales, fase presuntiva y confirmativa.
- 8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora de análisis.
- 8.2.3 Reportar los resultados de las pruebas presuntivas de 24 y 48 horas y prueba confirmativa de 24 y 48 horas para cada muestra.
- 8.2.4 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.
- 8.2.5 Los rangos de dilución a emplearse se dan de acuerdo al tipo de muestra analizada

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __DE __
--------------------------------------	---	----------------------------------

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 El cuadro 6 esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes totales en agua.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

CUADRO 5.



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

Página N° ____ de ____

Determinación de coliformes totales método tubos múltiples

Prueba presuntiva: Caldo lauril triptosa

Prueba confirmativa: caldo lactosado verde brillante billis 2%

FECHA Y HORA DE MUESTREO	FECHA Y HORA DE ANALISIS	PUNTO DE MUESTREO	PRUEBA PRESUNTIVA Y CONFIRMATIVA 24-48 HORAS (DILUCIONES EN ML)					COLIFORMES TOTALES NMP/100 ML
			10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __DE __
--------------------------------------	---	----------------------------------

CUADRO 6.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Coliforme total NMP/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laborato

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __DE __

Cuadro 7. NMP y límites de confianza de 95% cuando se usan diversas combinaciones de resultados positivos de series de 10, 1 y 0.1 ml en series de 5 tubos

Número de tubos con reacción positiva			Índice de NMP/100 ml	Límites de confianza de 95%	
10 ml	1 ml	0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	<2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	25
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	0	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	4	5	>1600	---	---

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __DE ____
--------------------------------------	---	------------------------------------

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __DE __
--------------------------------------	---	----------------------------------

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE FILTRO DE MEMBRANA (FM)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana (FM).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de coliformes totales por la técnica de filtración de membrana es altamente reproducible, puede utilizarse para estudiar volúmenes relativamente grandes de muestras es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar, proporcionan resultados numéricos más rápidos que el método de tubos múltiple.

Esta técnica es útil para controlar las posibles situaciones de emergencia con el agua.

3.0 Definiciones:

3.1 Grupo coliformes

3.2 Las bacterias del grupo coliformes se encuentran, en el intestino, en heces humanas y de animales de sangre caliente. Se denominan organismos coliformes a las bacterias gram-negativas, en forma de bastoncillos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos y oxidasa negativa, capaces de crecer en presencia de sales biliares u otros compuestos tenso activos que fermentan la lactosa a temperaturas de 35 a 37 °C con producción de ácido, gas y aldehído, además desarrollan una colonia roja con brillo metálico en un medio tipo Endo que contenga lactosa tras una incubación entre 24 a 48 horas. Pertenecen a este grupo lo géneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella.

Abreviaciones:

- Filtración de membrana: FM
- Ultravioleta : UV

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

- Unidades Formadoras de Colonias: UFC
- Caldo lauril triptosa : (CLT)
- Caldo lactosado verde brillante billis 2% : (CLVBB)

4.0 Resumen del método

6.1.2 El procedimiento de filtración consiste en hacer pasar con ayuda del vacío, la muestra del agua a través de una membrana de celulosa blancos con cuadrículas de 47 μm de diámetro y tamaño de poro de 0.45 μm , la cual es colocada luego en una placa de petri conteniendo un medio de cultivo e incubada a una temperatura determinada. Esta técnica permite examinar volúmenes muy variables de agua y ofrece un resultado directo de la concentración de bacterias coliformes (por el recuento de colonias), en lugar de un estimado estadístico, como en el caso de tubos múltiples.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Se recomienda el uso de medios deshidratados o preparados comercialmente. El medio deshidratado debe almacenarse en un lugar fresco y seco. Los medios aglutinados o decolorados deben descartarse, así mismo, el medio debe ser descartado en la fecha de expiración indicada por el fabricante. El medio estéril en los tubos debe examinarse para asegurar que los tubos de Durham no tengan burbujas de aire y estén al menos la mitad a dos tercios cubiertos después de agregar la muestra.

6.1 Caldo m-Endo

Disolver 48 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada conteniendo 20 ml de etanol al 95%. Calentar evitando la ebullición y el sobrecalentamiento. El PH final debe ser de 7.2 ± 0.1 . No auto clavar el medio.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

6.2 Caldo lauril triptosa

Disolver 35.6 g del medio deshidratado por litro de agua destilada (caldo simple). Ajustar el PH a 6.8 ± 0.2 y distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 16 mm x 150 mm provistos en su interior con un tubo de fermentación invertido (Durham), tapar y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Para caldo de doble concentración, disolver 71.2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Ajustar el PH a 6.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio (NaOH 1N). Distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 25 x 150 mm provisto también en su interior con tubos Durham y proceder a esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Cuadro 1 Concentración de caldo lauril triptosa (CLT) en función al volumen de muestra adecuado

Tubos con CLT ml	Volumen de muestra ml	Concentración del medio	CLT g/l
10	0.1 a 1.0	1 x (simple)	35.6
10	10	2 x (doble)	71.2

6.3 Caldo lactosado verde brillante bilis 2 %

Disolver 40.0 g de caldo deshidratado para un litro de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.2 con hidróxido de sodio (NaOH 1N) y distribuir 10 ml en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm, provisto en su interior con un tubo Durham invertido. Tapar y auto clavar a 121 °C durante 15 minutos.

6.4 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121 °C.

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121 °C, un volumen de 90 ± 2 ml.

6.5 Tíosulfato de sodio

Disolver 3 g de tiosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua potable, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.6 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Esterilizar el equipo de filtración mediante radiación UV o autoclave. En caso del empleo de luz UV, bastará con una exposición de dos minutos.

7.2 Usar una pinza estéril y colocar el filtro de membrana estéril sobre la base del sistema de filtración.

7.3 Colocar con cuidado el embudo o vaso de filtración sobre la base del sistema, fijándolo con una pinza.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

- 7.4 Humedecer la membrana con un pequeño volumen de agua destilada estéril.
- 7.5 Realizar un control de calidad previo al análisis, filtrando 100 ml de agua destilada estéril, y procediendo como si fuera una muestra más.
- 7.6 Homogenizar vigorosamente la muestra por lo menos unas 3 veces.
- 7.7 Proceder a realizar diluciones en caso fuera necesario.
- 7.7.1 Para las diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original.
- 7.7.2 Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra original. Continuar con éste proceso dependiendo del grado de contaminación de la muestra.
- 7.7.3 Ordenar los frasco conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución).
- 7.7.4 En caso de trabajar con diluciones, empezar con la más diluida.
- 7.8 Colocar la muestra o diluciones de la misma en un volumen ideal que proporcione alrededor de 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias de todos los tipos. (Por ejemplo, 10 ml, 25 ml, 50 ml y 100 ml). No se recomienda filtrar volúmenes menores a 10 ml.
- 7.9 Proceder a filtrar la muestra con ayuda de una bomba de vacío.
- 7.10 Luego de la filtración y la desconexión del vacío, retirar el embudo y el filtro de membrana con una pinza estéril.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

- 7.11 Colocar la membrana (con ayuda de la pinza estéril) en la placa conteniendo el caldo m-Endo, con un movimiento de rotación para evitar la formación de burbujas de aire debajo de la membrana. (Para ello, colocar la almohadilla absorbente previamente esterilizada en la base de la placa, y saturar con 1.7 a 2.0 ml del medio).
- 7.12 Invertir la placa e incubar a 35 ± 0.5 °C por 22 a 24 horas.
- 7.13 Contar las colonias de color rojo oscuro, con brillo metálico en la superficie.
- 7.14 Verificar por lo menos cinco colonias con brillo y transferir el crecimiento de cada colonia a caldo lauril triptosa y caldo lactosado verde brillante billis 2%, incubando a 35 ± 0.5 °C durante 24 a 48 horas. La formación de gas en los tubos Durham, así como, la presencia de fermentación y turbiedad a las 24 ó 48 horas confirma la presencia de coliformes totales.

8.0 Análisis de datos.

8.1 Resultados

- 8.1.1 Para el cálculo de la densidad de coliformes se expresa como el total de coliformes en unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 ml.
- 8.1.2 El recuento se calcula utilizando filtros de membrana que tengan entre 20 a 200 colonias de coliformes y no más de 200 colonias de todos los tipos por membrana.
- 8.1.3 Se aplica la siguiente formula:

$$\text{Colonias de coliformes (totales)/100 ml} = \frac{\text{Colonias de coliformes contadas}}{\text{ml de muestra filtrada}} \times 100$$

8.2 Registro de datos

- 8.2.1 El siguiente cuadro esquematiza una hoja de registros de datos para la prueba de coliformes totales.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora del análisis.

8.2.3 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

pagina N° ____ de ____



Determinación de coliformes totales Metodo de filtración de membrana

Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Volumen filtrado					Coliformes totales UFC / 100 ml	Medios de cultivo
			100 ml	50 ml	25 ml	10 ml	10 ⁻¹		
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	CLT
								48 hrs verificado	CLT
								24 hrs confirmado	CLVBB
								48 hrs confirmado	CLVBB
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	CLT
								48 hrs verificado	CLT
								24 hrs confirmado	CLVBB
								48 hrs confirmado	CLVBB
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	CLT
								48 hrs verificado	CLT
								24 hrs confirmado	CLVBB
								48 hrs confirmado	CLVBB
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	CLT
								48 hrs verificado	CLT
								24 hrs confirmado	CLVBB
								48 hrs confirmado	CLVBB

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 El siguiente cuadro esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes totales en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

pagina N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Coliforme total NMP/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de filtro de membrana	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE RECUENTO TOTAL EN PLACA	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> <small>NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO</small>	<hr style="border: none; border-top: 1px solid black;"/> <small>FIRMA Y FECHA</small>
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> <small>NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO</small>	<hr style="border: none; border-top: 1px solid black;"/> <small>FIRMA Y FECHA</small>

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa.

2.0 Alcance y aplicación

El conteo de colonias heterotróficas en placa, conocido como recuento estándar en placa, es un procedimiento empleado para la estimación del número de bacterias vivas heterotróficas aerobias o anaerobias facultativas en el agua. Es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar y aguas residuales. Los resultados de este método se reportan en unidades formadoras de colonias por ml de agua analizada.

3.0 Definiciones:

3.1 Grupo coliformes

Las bacterias del grupo coliformes se encuentran entre otros lugares del medio ambiente, en el intestino, en heces humanas y de animales de sangre caliente. Se denominan organismos coliformes a las bacterias gram-negativas, en forma de bastoncillos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos y oxidasa negativa, capaces de crecer en presencia de sales biliares u otros compuestos tenso activos que fermentan la lactosa a temperaturas de 35 a 37 °C con producción de ácido, gas y aldehído, además desarrollan una colonia roja con brillo metálico en un medio tipo Endo que contenga lactosa tras una incubación entre 24 a 48 horas. Pertenecen a este grupo los géneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella.

Abreviaciones:

- Unidades formadoras de colonias: UFC

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	PÁGINA: __ DE __

4.0 Resumen del método

El procedimiento consiste en colocar volúmenes determinados de muestras de agua en placas de petri, luego se agrega el medio líquido el cual debe estar a una temperatura de 44 a 46 °C, mezclar por rotación en forma de ocho, dejar solidificar y luego incubar las placas invertidas a 35 ± 0.5 °C de 24-48 horas, luego contar las colonias que crecen en el medio.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Se recomienda el uso de medios deshidratados o preparados comercialmente debido al control de calidad. El medio deshidratado debe almacenarse en un lugar fresco y seco. Los medios aglutinados o decolorados deben descartarse, así mismo, el medio debe ser descartado en la fecha de expiración indicada por el fabricante.

El medio estéril en los tubos debe examinarse para asegurar que los tubos de Durham no tengan burbujas de aire y estén al menos la mitad a dos tercios cubiertos después de agregar la muestra.

6.1 Agar nutritivo, agar extracto glucosa triptosa o agar extracto glucosa triptosa y levadura

6.2 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	PÁGINA: __ DE __

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121 °C.

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121 °C, un volumen de 90 ± 2 ml.

6.3 Tiosulfato de sodio

Disolver 3 g de tiosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.4 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Preparación de la muestra. Sembrar las diluciones por triplicado, en placas de petri debidamente identificadas con el número de muestra, fecha, dilución y cualquiera otra información necesaria antes del análisis de la muestra.

Los frascos de la muestra de agua a analizar se deben agitar, haciendo movimientos completos de arriba hacia abajo, antes de efectuar la dilución.

7.2 Trabajar en condiciones de esterilidad. Desinfectar la mesa y trabajar cerca de la llama de los mecheros o en una cámara de flujo laminar.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	PÁGINA: __ DE __

- 7.3 Si las muestras están muy contaminadas se procede a realizar las diluciones respectivas, identificando y codificando los frascos de agua de dilución. Estas diluciones deben de permitir obtener un número de unidades formadoras de colonias entre 30 y 300. No es recomendable sembrar más de 1 ml de agua en una placa, sin embargo, cuando el número total de colonias desarrolladas en la placa es menor de 30 es necesario usar un volumen mayor de muestra.
- 7.4 Colocar el volumen seleccionado en placas de Petri, por triplicado, debidamente identificadas usando una pipeta estéril diferente para cada cantidad. Al tomar la muestra la pipeta no se debe introducir más de 0.5 cm abajo de la superficie de la muestra o dilución.
- 7.5 Verter de 10 a 12 ml del medio líquido el cual debe estar entre 44-46 °C, dentro de cada una de las placas de Petri. (El medio de agar sólido debe colocarse en un baño de agua o en un flujo de vapor en un recipiente parcialmente cerrado para licuarlo. Se deben evitar exposiciones prolongadas a altas temperaturas, durante y después de licuar el medio. El agar una vez licuado se debe mantener en un baño de agua, entre 44 y 46 °C, hasta que sea utilizado.
- 7.6 Mezclar por rotación primero en una dirección y después en otra, en forma de ocho, con cuidado de no mojar el borde de la placa o de regar el medio.
- 7.7 Dejar solidificar el medio durante 10 minutos sobre una superficie plana.
- 7.8 Sembrar controles de esterilidad del medio y del agua de dilución(7.3 a 7.7).
- 7.9 Colocar las placas invertidas en la incubadora a 35 ± 0.5 °C, durante 24-48 horas.
- 8.0 Análisis de datos.**
- 8.1 Resultados
- 8.1.1 Contar todas las colonias de las placas seleccionadas al finalizar el periodo de incubación. Utilizar un contador de colonias Québec para efectuar el conteo manual.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

Si el recuento no se puede efectuar una vez finalizado el período de incubación las placas se deben almacenar entre 5-10 °C durante un período no menor a 24 horas, sin embargo, debe evitarse esta práctica.

- 8.1.2 Escoger las placas que tienen entre 0 y 30 colonias, si se sembró 1 ml de la muestra sin diluir, o entre 30 y 300 colonias, si se sembraron diluciones.
- 8.1.3 Contar las placas que contengan el recuento más cercano a 300, si no hay placas con conteos entre 30 y 300 colonias. En el caso de hacerse diluciones el número promedio de colonias por placa se multiplica por el recíproco de la dilución usada.
- 8.1.4 Cuando el número de colonias excede demasiado 300 colonias, no se debe reportar como " muy numerosas para contar ". Si hay menos de 10 colonias por cm², se hace el recuento en 13 cuadros del contador Québec que tengan una distribución representativa de las colonias. Si es posible seleccione siete cuadros horizontales consecutivos a través de la placa y seis cuadros verticales, tener cuidado de no contar cada cuadro más de una vez. Multiplicar la suma de las colonias en los 13 cm² por 5 para estimar el número de colonias por placas cuando el área de la placa es de 65 cm².
- 8.1.5 Si hay más de 10 colonias por cm², contar cuatro cuadros representativos, sacar el promedio por cm² y multiplicar por el factor apropiado para estimar las colonias por placa. Este factor es 57 para las placas plásticas desechable y 65 para placas de vidrio.
- 8.1.6 Cuando el recuento bacteriano en placa es mayor de 100 colonias por cm² se reporta el resultado como mayor a 6500 veces el recíproco de la más alta dilución sembrada para placas plásticas y 5700 veces si se sembraron en placas de vidrio.
- 8.1.7 Si en la placa se encuentran colonias extendidas "spray" se selecciona una porción representativa donde las colonias estén bien distribuidas y el área del "spray" no exceda la mitad de la placa.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	PÁGINA: __ DE __

8.1.8 Cuando las colonias “spray” tienen que ser contadas, los siguientes tipos se cuentan como:

- Una cadena de colonias que parece ser causada por desintegración de un grumo de bacterias cuando se mezcló el agar y la muestra.
- El “spray” que se desarrolla como una película de crecimiento entre el agar y el fondo de la placa de petri.
- Una colonia que se desarrolla como una película de agua al borde o sobre la superficie del agar.

8.1.9 Los dos últimos tipos se desarrollan ampliamente a causa de acumulación de humedad en el punto desde el cual el “spray” se origina. Ellos frecuentemente cubren más de la mitad de la placa e interfieren en la obtención de un conteo de placa confiable.

8.1.10 Contar como colonias individuales aquellas que tienen apariencia similar y que están muy próximas pero sin pegar una con otra, siempre y cuando la distancia entre ellas es al menos igual al diámetro de la colonia más pequeña.

8.1.11 Contar las colonias compenetrantes que difieren en la apariencia, tales como morfología y color, como colonias individuales.

8.1.12 Si las placas preparadas tienen crecimiento extendido excesivo se debe reportar como “extendido” cuando es incontable. Cuando las placas son incontables por que la dilución falló, hubo goteo accidental y se contaminó, o las placa control indica que el medio o el material estaba contaminado se reporta como accidente de laboratorio.

8.1.13 El término “unidades formadoras de colonias” (UFC) es descriptivo del método usado; por lo tanto, todos los conteos se reportan como unidades formadoras de colonias. Incluir en el reporte el método usado, la temperatura y el tiempo de incubación y el medio. Ejemplo: UFC/mL, método de conteo en placa, 35 °C /48h.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

- 8.1.14 Registrar el recuento de bacterias por mililitros mediante la multiplicación del número promedio de colonias en cada placa por la dilución usada. Los resultados se reportan con dos cifras significativas hasta el momento de convertir el conteo promedio a UFC.
- 8.1.15 Registro de datos
- 8.1.16 El siguiente cuadro esquematiza una hoja de registro de datos para la prueba recuento en placa.
- 8.1.17 En el registro de datos se debe considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora del análisis.
- 8.1.18 Indicar el medio de cultivo utilizado para la prueba.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	PÁGINA: __ DE __

8.1.19 El siguiente cuadro esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes totales en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de __

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Coliforme total UFC/ ml

Observaciones: _____

 Analista

 Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes totales en agua por el método de Recuento total en placa	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivos

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de coliformes fecales, mediante el procedimiento de fermentación en tubos múltiple, es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar y aguas residuales. el límite de confianza es de 95 % cuando se utilizan diversas combinaciones de resultados positivos de series de 10, 1 y 0.1 mL en series de 5 tubos. Los resultados de este método se reportan en Números Más Probable (NMP) de microorganismos existentes.

3.0 Definiciones:

3.1 Grupo fecales

Son bacterias que forman parte del total del grupo coliformes y son definidas como bacilos gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido gas a 44.5 ± 0.2 °C dentro de las 24 ± 2 horas. La mayor especie en el grupo de coliformes fecales es la Escherichia Coli y en menor grado especie de Klebsiella, Enterobacter y Citrobacter.

3.2 Número Más Probable (NMP)

Es el cálculo de la densidad probable de bacterias coliformes basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La precisión de cada prueba depende del número de tubos utilizados. Tres series de dilución son necesarias para la obtención del código de NMP. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de hacer las

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP podrá resultar mayor o menor que el número real de densidad bacteriana. La densidad bacteriana se obtiene a través de la fórmula facilitada o a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor determinado y se expresa como NMP de coliformes/100 ml.

Abreviaciones:

- Número Más probable (NMP)
- Caldo lauril triptosa : (CLT)
- Caldo lactosado verde brillante billis 2% : (CLVBB)

4.0 Resumen del método:

La determinación de coliformes fecales (termo tolerantes) por el método de fermentación de tubos múltiples se realiza a partir de los cultivos positivos de coliformes totales en caldo lauril triptosa, los cuales son inoculados en tubos conteniendo medio EC e incubados a 44.5 ± 0.2 °C en baño maría con agitación y temperatura constante durante 24 horas. La formación de gas en los tubos de Durham así como la presencia de fermentación y turbiedad en los tubos, se considera reacción positiva de coliformes fecales. Los resultados se expresan en término de Número Más Probable (NMP) de microorganismos.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Se recomienda el uso de medios deshidratados o preparados comercialmente. El medio deshidratado debe almacenarse en un lugar fresco y seco. Los medios aglutinados o decolorados deben descartarse, así mismo, el medio debe ser descartado en la fecha de expiración indicada por el fabricante.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

El medio estéril en los tubos debe examinarse para asegurar que los tubos de Durham no tengan burbujas de aire y estén al menos la mitad a dos tercios cubiertos después de agregar la muestra.

6.1 Caldo lauril triptosa

Disolver 35.6 g del medio deshidratado por litro de agua destilada (caldo simple). Ajustar el PH a 6.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio (NaOH 1N) y distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 16 mm x 150 mm provistos en su interior con un tubo de fermentación invertido (Durham), tapar y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Para caldo de doble concentración, disolver 71.2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Ajustar el PH a 6.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio (NaOH 1N). Distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 25 x 150 mm provisto también en su interior con tubos Durham y proceder a esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Cuadro 1 – concentración de caldo lauril triptosa en función al volumen de muestra adecuado

Tubos con CLT ml	Volumen de muestra ml	Concentración del medio	CLT g/l
10	0.1 a 1.0	1 x (simple)	35.6
10	10	2 x (doble)	71.2

6.2 Caldo EC

Disolver 37.0 g de medio EC en un litro de agua destilada, distribuir 10 ml en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm, provisto en su interior con un tubo Durham invertido. Tapar y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

6.3 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C .

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121°C , un volumen de 90 ± 2 ml.

6.4 Tiosulfato de sodio

Disolver 3 g de tiosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.5 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Coliformes fecales

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 7.1.1 Preparar una serie de cinco tubos conteniendo 10 ml de medio EC Colocarlos en una gradilla y codificar los tubos anotando el número asignado a la muestra, volumen (y/o dilución) a inocular y fecha. Correspondiente a cada tubo de caldo lauril triptosa positivo en la prueba presuntiva de coliformes totales.
- 7.1.2 Colocar los tubos de EC en baño María durante 30 minutos a la temperatura de 44.5 ± 0.2 °C.
- 7.1.3 Agitar e incubar el tubo de caldo lauril triptosa para evitar tocar la película superficial.
- 7.1.4 Con un asa de siembra estéril, transferir una o dos asadas de los cultivos positivos de caldo lauril triptosa a los tubos con medio EC.
- 7.1.5 Controlar que el tiempo transcurrido entre la inoculación no exceda de 30 minutos.
- 7.1.6 Incubar los tubos a 44.5 ± 0.2 °C en baño María por 24 ± 2 horas.
- 7.1.7 Retirar los tubos del baño María luego del periodo de incubación. Agitarlos suavemente para observar la producción de gas. Se procede a la lectura considerando positiva toda formación de gas en los tubos Durham, presencia de fermentación y turbiedad en los tubos.
- 7.1.8 Anotar los resultados y calcular el NMP de acuerdo a las porciones y combinaciones empleadas (ver cuadros 2,3)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 2.

No. de tubos con reacción positiva	NMP / 100 ml	Limite de confianza de 95%	
		Inferior	Superior
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.05	6.3
2	2.6	0.3	9.6
3	4.6	0.8	14.7
4	8.0	1.7	26.4
5	>8.0	4.0	Infinito

Cuadro 3.

No. de tubos con reacción positiva	NMP / 100 ml	Limite de confianza de 95%	
		Inferior	Superior
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	>23.0	13.5	Infinito

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.0 Análisis de datos.

8.1 Resultados

8.1.1 El cálculo de la densidad probable de bacterias coliformes fecales está basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La densidad de coliformes fecales se expresa como NMP de coliformes fecales por 100 ml y se obtiene a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor de NMP determinado para ello se necesitan tres diluciones para la obtención del código del NMP, ver cuadro 5

8.1.2 Aunque los códigos presentados en el cuadro anterior se refieran específicamente a la combinación de resultados positivos obtenidos cuando son inoculados volúmenes de 10 ml, 1 ml y 0.1 ml de muestra, éstos pueden ser usados para volúmenes mayores o menores de siembra ajustando con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de NMP en la tabla X} \frac{10}{\text{Vol. dilución inicial de la muestra seleccionada}} = \text{NMP} / 100 \text{ ml}$$

8.1.3 Cuando más de tres diluciones decimales son inoculadas, se debe determinar las tres diluciones significativas para el código. Estas diluciones se pueden determinar de acuerdo a las siguientes reglas:

8.1.3.1 Como primer número del código se seleccionara la mayor dilución en la que todos los tubos resultaran positivos y las dos diluciones subsiguientes para completar el código. (ver cuadro 4 prueba 1 y 2)

8.1.3.2 Si menos de tres diluciones tienen resultados positivos, se seleccionaran las tres mayores diluciones que incluyen los tubos positivos para completar el código. (ver cuadro 4 prueba 3)

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 8.1.3.3 Si resultaran tubos positivos en diluciones mayores que en aquellas seleccionadas para el código, los resultados positivos se desplazan hacia las diluciones seleccionadas a fin de incrementar los tubos positivos en la última dilución seleccionada. (ver cuadro 4 prueba 4)
- 8.1.3.4 Si resultaran tubos negativos en volúmenes mayores de muestra que los escogidos para el código, el primer número del código será el de la mayor dilución en la cual todos los tubos resultaran positivos, con las siguientes diluciones más altas para completar el código. (ver cuadro 4 prueba 5)
- 8.1.3.5 Si todos los tubos resultaran positivos, seleccionar para el código, aquellas tres diluciones mayores. (ver cuadro 4 prueba 6)
- 8.1.3.6 Si todos los tubos resultaran negativos, seleccionar para el código aquellas tres diluciones menores. (ver cuadro 4 prueba 7)
- 8.1.3.7 Si no resultaran tubos positivos en una dilución intermedia, seleccionar para el código la serie de menor dilución con tubos positivos y otra de mayor dilución con tubos positivos. (ver cuadro 4 prueba 8)
- 8.1.3.8 Si solamente la dilución intermedia resultara positiva, escoger para el código la serie de menor dilución y otra de mayor dilución para el código. (ver cuadro 4 prueba 9)

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 4. - Valores para la selección del código

Prueba	Tubos positivos/ml y volumen de muestra					Código
	10	1	0.1	0.01	0.001	
1	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	0	0	5-2-0
2	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	5-2-1
3		<u>3</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	3-1-0
4	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	5-3-2
5	4	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	5-4-0
6		5	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	5-5-5
7		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0-0-0
8		<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	0	4-0-1
9		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0-1-0

8.2 Registro de datos

8.2.1 En el siguiente cuadro se esquematiza una hoja de registro de datos para la prueba de coliformes fecales, fase presuntiva y confirmativa.

8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora de análisis.

8.2.3 Reportar los resultados de las pruebas

8.2.4 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.

8.2.5 Los rangos de dilución a emplearse se dan de acuerdo al tipo de muestra analizada

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Determinación de coliformes fecales método tubos multiples

Prueba presuntiva: Caldo lauril triptosa

Prueba confirmativa: caldo lactosado verde brillante billis 2%

FECHA Y HORA DE MUESTREO	FECHA Y HORA DE ANALISIS	PUNTO DE MUESTREO	MEDIO EC 24 ± 2 HORAS A 44.5 ± 0.2°C (DILUCIONES EN ML)					COLIFORMES FEACLES NMP/100 ML	
			10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
									24 hrs presun.
									48 hrs presun.
									24 hrs confirm.
									48 hrs confirm.
									24 hrs presun.
									48 hrs presun.
									24 hrs confirm.
									48 hrs confirm.
									24 hrs presun.
									48 hrs presun.
									24 hrs confirm.
									48 hrs confirm.

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 En el siguiente cuadro esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes fecales en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Coliforme fecal NMP/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE FILTRO EN MEMBRANA (FM)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de coliformes fecales por la técnica de filtración de membrana es altamente reproducible, puede utilizarse para estudiar volúmenes relativamente grandes de muestras y proporcionan resultados numéricos más rápidos que el método de tubos múltiple.

Esta técnica es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar, es útil para controlar las posibles situaciones de emergencia con el agua

3.0 Definiciones:

3.1 Grupo coliformes

3.2 Las bacterias del grupo coliformes se encuentran, en el intestino, en heces humanas y de animales de sangre caliente. Se denominan organismos coliformes a las bacterias gram-negativas, en forma de bastoncillos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos y oxidasa negativa, capaces de crecer en presencia de sales biliares u otros compuestos tenso activos que fermentan la lactosa a temperaturas de 35 a 37 °C con producción de ácido, gas y aldehído, además desarrollan una colonia roja con brillo metálico en un medio tipo Endo que contenga lactosa tras una incubación entre 24 a 48 horas. Pertenecen a este grupo los géneros: Escherichia, Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella.

3.3 Grupo coliformes fecales

Son bacterias que forman parte del total del grupo coliformes y son definidas como bacilos gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

producción de ácido gas a 44.5 ± 0.2 °C dentro de las 24 ± 2 horas. La mayor especie en el grupo de coliformes fecales es la Escherichia Coli y en menor grado especie de Klebsiella, Enterobacter y Citrobacter.

3.4

Abreviaciones:

- Filtración de membrana : FM
- Ultravioleta : UV
- Unidades Formadoras de Colonias : UFC

4.0 Resumen del método

La determinación de coliformes fecales en aguas se realiza a partir de la colonias positivas de coliformes totales en placas con medio m-Endo, las cuales son transferidas en tubos conteniendo medio EC, durante 24 horas. La formación de gas en tubos Durham, así como la presencia de fermentación y turbiedad en los tubos, se considera reacción positiva de coliformes fecales.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Se recomienda el uso de medios deshidratados o preparados comercialmente. El medio deshidratado debe almacenarse en un lugar fresco y seco. Los medios aglutinados o decolorados deben descartarse, así mismo, el medio debe ser descartado en la fecha de expiración indicada por el fabricante. El medio estéril en los tubos debe examinarse para asegurar que los tubos de Durham no tengan burbujas de aire y estén al menos la mitad a dos tercios cubiertos después de agregar la muestra.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

6.1 Caldo m-Endo

Disolver 48 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada conteniendo 20 ml de etanol al 95%. Calentar evitando la ebullición y el sobrecalentamiento. El PH final debe ser de 7.2 ± 0.1 con hidróxido de sodio (NaOH 1N). No auto clavar el medio.

6.2 Caldo lauril triptosa

Disolver 35.6 g del medio deshidratado por litro de agua destilada (caldo simple). Ajustar el PH a 6.8 ± 0.2 y distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 16 mm x 150 mm provistos en su interior con un tubo de fermentación invertido (Durham), tapar y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Para caldo de doble concentración, disolver 71.2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Ajustar el PH a 6.8 ± 0.2 . Distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 25 x 150 mm provisto también en su interior con tubos Durham y proceder a esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Cuadro 1. Concentración de caldo lauril triptosa en función al volumen de muestra adecuado

Tubos con CLT ml	Volumen de muestra ml	Concentración del medio	CLT g/l
10	0.1 a 1.0	1 x (simple)	35.6
10	10	2 x (doble)	71.2

6.3 Caldo E.C.

Disolver 37.0 g de medio EC en un litro de agua destilada, distribuir 10 ml en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm, provisto en su interior con un tubo Durham invertido. Tapar y auto clavar a 121 °C durante 15 minutos.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

6.4 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121°C .

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121°C , un volumen de 90 ± 2 ml.

6.5 Tíosulfato de sodio

Disolver 3 g de tíosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.6 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento Coliformes fecales

7.1 El análisis de coliformes fecales se realiza a partir de colonias positivas de coliformes totales en placas con medio m-Endo.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

- 7.1.1 Preparar una serie de cinco tubos conteniendo 10 ml de medio EC Colocarlos en una gradilla.
- 7.1.2 Codificar cada uno de los tubos anotando el numero asignado a la muestra, volumen (y/o dilución) a inocular y fecha. Correspondiente a cada colonia roja o con brillo metálico de las placas con medio m-Endo.
- 7.1.3 Colocar los tubos de EC en baño maría durante 30 minutos a la temperatura de 44.5 ± 0.2 °C.
- 7.1.4 Con un asa de siembra estéril, repicar la colonia en estudio y transferirla a un tubo con medio EC.
- 7.1.5 Controlar que el tiempo transcurrido entre la inoculación no exceda de 30 minutos.
- 7.1.6 Incubar los tubos a 44.5 ± 0.2 °C en baño maría por 24 ± 2 horas.
- 7.1.7 Retirar los tubos del baño maría luego del periodo de incubación. Agitarlos suavemente para observar la producción de gas. Se procede a la lectura considerando positiva toda formación de gas en los tubos Durham, presencia de fermentación y turbiedad en los tubos con medio EC.
- 7.1.8 Anotar los resultados y calcular el resultado como en el caso de coliformes totales por el método de filtración de membrana.
- 8.0 Análisis de datos.**
- 8.1 Resultados
- 8.1.1 Para el cálculo de la densidad de coliformes se expresa como el total de coliformes en unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 ml.
- 8.1.2 El recuento se calcula utilizando filtros de membrana que tengan entre 20 a 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias de todos los tipos por membrana.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

8.1.3 Se aplica la siguiente formula:

$$\text{Colonias de coliformes (fecales)/100 ml} = \frac{\text{Colonias de coliformes contadas}}{\text{ml de muestra filtrada}} \times 100$$

8.2 Registro de datos

8.2.1 En el siguiente cuadro 15 esquematiza una hoja de registros de datos para la prueba de coliformes fecales.

8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora del análisis.

8.2.3 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

Registro de datos para la cuantificación de coliformes fecales



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Hoja N° ____ de __

Determinación de coliformes totales Metodo de filtración de membrana

Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Volumen filtrado					Coliformes fecales UFC / 100 ml	Medios de cultivo
			100 ml	50 ml	25 ml	10 ml	10 ⁻¹		
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	EC
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	EC
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	EC
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	EC
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	EC
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	EC

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 En el siguiente cuadro esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes fecales en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Coliforme fecal NMP/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de coliformes fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTREPTOCOCOS FECALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de Estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de Estreptococos fecales, mediante el procedimiento de fermentación en tubos múltiple, es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar y aguas residuales. Los resultados de este método se reportan en Números Más Probable (NMP) de microorganismos existentes. Los Estreptococos fecales generalmente están presentes en las heces de origen humano y animal. Incluye las especies *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundii* y *E. solitarius*, los cuales en su mayoría son de origen fecal y en muchas circunstancias prácticas, pueden considerarse generalmente indicadores específicos de contaminación fecal de origen humano.

3.0 Definiciones:

3.1 Grupo estreptococos fecales.

Los estreptococos fecales generalmente están presente en las heces de origen humano y animal. Taxonómicamente incluye los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus*. Son cocos Gram positivos que forman pares o cadenas y poseen el antígeno del grupo D de Lancefield. Pueden crecer en presencia de sales biliares y de concentraciones de azida de sodio inhibitorias para los organismos coliformes y la mayoría de otras bacterias Gram negativas a una temperatura de 44 ± 0.25 °C. Hidrolizan la esculina y son catalasa negativa. Algunas especies son resistentes al calentamiento a 60 °C por 30 minutos, crecen en caldo nutritivo con 6.5% de NaCl y a un PH de 9.6 . El genero *Enterococcus* comprende ahora todos los estreptococos que comparten determinadas propiedades bioquímicas y toleran bien las condiciones de desarrollo desfavorable. Incluye las especies *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E.*

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CÓDIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

cecorum, E. durans, E. faecalis, E. faecium, E. gallinarum, E. hirae, E. malodoratus, E. mundii y E. solitarius, los cuales en su mayoría son de origen fecal y en muchas circunstancias prácticas, pueden considerarse generalmente indicadores específicos de contaminación fecal de origen humano. Sin embargo también se pueden aislar de las heces de animales algunas especies y subespecies como: E. casseliflavus, E. faecalis, E. liquefaciens, E. malodoratus y E. solitarius, se encuentran principalmente en las materias vegetales. En el género Enterococcus, únicamente S. bovis y S. equimus poseen el antígeno del grupo D.

3.2 Número Más Probable (NMP)

Es el cálculo de la densidad probable de bacterias de estreptococos fecales basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La precisión de cada prueba depende del número de tubos utilizados. Tres series de dilución son necesarias para la obtención del código de NMP. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de hacer las porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP podrá resultar mayor o menor que el número real de densidad bacteriana. La densidad bacteriana se obtiene a través de la fórmula facilitada o a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor determinado y se expresa como NMP de coliformes/100 ml.

Abreviaciones:

- Numero Más probable (NMP)

4.0 Resumen del método:

El método consta de una única etapas debido a que el medio de cultivo que empleamos es selectivo.

La prueba consiste en colocar volúmenes determinados de muestras de agua en una serie en una serie de tubos conteniendo caldo BAGG y luego son incubados a 45 ± 1.0 °C durante 24 horas. Al finalizar la incubación si se observa una coloración

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

amarilla se considera una prueba positiva. Los resultados se expresan en términos de Número Más Probable (NMP) de microorganismos.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Se recomienda el uso de medios deshidratados o preparados comercialmente. El medio deshidratado debe almacenarse en un lugar fresco y seco. Los medios aglutinados o decolorados deben descartarse, así mismo, el medio debe ser descartado en la fecha de expiración indicada por el fabricante.

El medio estéril en los tubos debe examinarse para asegurar que los tubos de Durham no tengan burbujas de aire y estén al menos la mitad a dos tercios cubiertos después de agregar la muestra.

6.1 Caldo BAGG

Disolver 15.0 g de peptona de caseína, 4.8 g de extracto de carne, 7.5 g de D(+) glucosa, 7.5 g de cloruro de sodio, 0.2 g de azida sódica en un litro de agua destilada (esto es equivalente a 35 g del medio disuelto en un litro de agua destilada)

Cuadro 1. concentración de caldo BAGG en función al volumen de muestra adecuado

Tubos con BAGG ml	Volumen de muestra ml	Concentración del medio	BAGG g/l
10	0.1 a 10	1 X (simple)	35
10	10	2 X (doble)	70

6.2 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE__

completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121 °C.

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121 °C, un volumen de 90 ± 2 ml.

6.2.1 Tíosulfato de sodio

Disolver 3 g de tío sulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.2.2 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Preparar una serie de cinco tubos conteniendo 10 ml de caldo BAGG de concentración doble y, series de cinco tubos con 10 ml de caldo BAGG de concentración simple. Colocarlos en una gradilla y codificar los tubos anotando el numero asignado a la muestra, volumen (y/o dilución) a inocular y fecha.

7.1.1 Si las muestras están muy contaminadas se procede a realizar las diluciones respectivas, identificando y codificando los frascos de agua de dilución.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 7.1.2 Las muestras de agua deben agitarse vigorosamente unas 3 veces antes de ser analizadas, para asegurar una buena homogeneización.
- 7.1.3 En caso de realizar diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original.
- 7.1.4 Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra original. Continuar con éste proceso dependiendo del grado de contaminación de la muestra.
- 7.1.5 Ordenar los frasco conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución).
- 7.1.6 Agitar vigorosamente por unas 3 veces el frasco con la última dilución efectuada y con una pipeta estéril, inocular 1 ml de la dilución en cada uno de los tubos con caldo BAGG de concentración simple correspondiente a dicha dilución.
- 7.1.7 Proceder de la misma forma inculando de la muestra más diluida a la más concentrada, utilizando la misma pipeta.
- 7.1.8 Inocular también 1 ml de la muestra original en cinco tubos con caldo BAGG de concentración simple y 10 ml en cinco tubos con caldo BAGG de concentración doble.
- 7.1.9 Incubar los tubos por 24 ± 2 horas a 45 ± 1.0 °C. Examinar y separar los tubos de caldo BAGG positivos, es decir, aquellos que presenten una coloración amarilla lo que indica la presencia de estreptococos fecales. Los tubos que no varían su color púrpura constituyen una prueba negativa.
- 7.1.10 Anotar los resultados y calcular el NMP a partir de los datos obtenidos utilizando el cuadro 2.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.0 Análisis de datos.

8.1 Resultados

8.1.1 El cálculo de la densidad probable de bacterias estreptococos fecales está basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La densidad de coliformes fecales se expresa como NMP de coliformes por 100 ml y se obtiene a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor de NMP determinado para ello se necesitan tres diluciones para la obtención del código del NMP, ver cuadro 4.

8.1.2 Aunque los códigos presentados en el cuadro anterior se refieran específicamente a la combinación de resultados positivos obtenidos cuando son inoculados volúmenes de 10 ml, 1 ml y 0.1 ml de muestra, éstos pueden ser usados para volúmenes mayores o menores de siembra ajustando con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de NMP en la tabla X} \times \frac{10}{\text{Vol. dilución inicial de la muestra seleccionada}} = \text{NMP} / 100 \text{ ml}$$

8.1.3 Cuando más de tres diluciones decimales son inoculadas, se debe determinar las tres diluciones significativas para el código. Estas diluciones se pueden determinar de acuerdo a las siguientes reglas:

8.1.3.1 Como primer número del código se seleccionara la mayor dilución en la que todos los tubos resultaran positivos y las dos diluciones subsiguientes para completar el código. (ver cuadro 1 prueba 1 y 2)

8.1.3.2 Si menos de tres diluciones tienen resultados positivos, se seleccionaran las tres mayores diluciones que incluyen los tubos positivos para completar el código. (ver cuadro 1 prueba 3)

8.1.3.3 Si resultaran tubos positivos en diluciones mayores que en aquellas seleccionadas para el código, los resultados positivos se desplazan hacia las diluciones seleccionadas a fin de incrementar los tubos positivos en la última dilución seleccionada. (ver cuadro 1 prueba 4).

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 8.1.3.4 Si resultaran tubos negativos en volúmenes mayores de muestra que los escogidos para el código, el primer número del código será el de la mayor dilución en la cual todos los tubos resultaran positivos, con las siguientes diluciones más altas para completar el código. (ver cuadro 1 prueba 5).
- 8.1.3.5 Si todos los tubos resultaran positivos, seleccionar para el código, aquellas tres diluciones mayores. (ver cuadro 1 prueba 6).
- 8.1.3.6 Si todos los tubos resultaran negativos, seleccionar para el código aquellas tres diluciones menores. (ver cuadro 1 prueba 7).
- 8.1.3.7 Si no resultaran tubos positivos en una dilución intermedia, seleccionar para el código la serie de menor dilución con tubos positivos y otra de mayor dilución con tubos positivos. (ver cuadro 1 prueba 8).
- 8.1.3.8 Si solamente la dilución intermedia resultara positiva, escoger para el código la serie de menor dilución y otra de mayor dilución para el código. (ver cuadro 1 prueba 9).

Cuadro 1. Valores para la selección del código

Prueba	Tubos positivos/ml y volumen de muestra					Código
	10	1	0.1	0.01	0.001	
1	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	0	0	5-2-0
2	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	5-2-1
3		<u>3</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	3-1-0
4	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	5-3-2
5	4	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	5-4-0
6		5	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	5-5-5
7		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0-0-0
8		<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	0	4-0-1
9		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0-1-0

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.2 Registro de datos

- 8.2.1 En el cuadro 2 se esquematiza una hoja de registro de datos para la prueba de estreptococos fecales, fase presuntiva y confirmativa.
- 8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora de análisis.
- 8.2.3 Reportar los resultados de las pruebas presuntivas de 24 y 48 horas y prueba confirmativa de 24 y 48 horas para cada muestra.
- 8.2.4 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.
- 8.2.5 Los rangos de dilución a emplearse se dan de acuerdo al tipo de muestra analizada

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

CUADRO 2



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

Página N° ____ de ____

Determinación de coliformes fecales método tubos múltiples

Prueba presuntiva: Caldo BAGG

FECHA Y HORA DE MUESTREO	FECHA Y HORA DE ANALISIS	PUNTO DE MUESTREO	PRUEBA PRESUNTIVA 24-48 HORAS (DILUCIONES EN ML)					ESTREPTOCOCOS FECALES NMP/100 ML
			10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
								24 hrs presun.
								24 hrs presun.
								24 hrs presun.
								24 hrs presun.
								24 hrs presun.
								24 hrs presun.

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 En el cuadro 3 esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes fecales en agua.

CUADRO 3



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	estreptococos fecales NMP/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 4. NMP y límites de confianza de 95% cuando se usan diversas combinaciones de resultados positivos de series de 10, 1 y 0.1 ml en series de 5 tubos

Número de tubos con reacción positiva			Índice de NMP/100 ml	Límites de confianza de 95%	
10 ml	1 ml	0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	<2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	25
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	0	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	4	5	>1600	---	---

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE__
--------------------------------------	--	----------------------------------

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE__

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTREPTOCOCOS FECALES EN AGUA POR EL MÉTODO DE FILTRO EN MEMBRANA (FM)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana (FM).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de estreptococos fecales por la técnica de filtración de membrana es altamente reproducible, puede utilizarse para estudiar volúmenes relativamente grandes de muestras es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar y proporcionan resultados numéricos más rápidos que el método de tubos múltiple. Esta técnica es útil para controlar las posibles situaciones de emergencia con el agua y para estudiar distintas aguas naturales.

3.0 Definiciones:

3.1 Grupo estreptococos fecales.

Los estreptococos fecales generalmente están presente en las heces de origen humano y animal. Taxonómicamente incluye los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus*. Son cocos Gram positivos que forman pares o cadenas y poseen el antígeno del grupo D de Lancefield. Pueden crecer en presencia de sales biliares y de concentraciones de azida de sodio inhibitorias para los organismos coliformes y la mayoría de otras bacterias Gram negativas a una temperatura de 44 ± 0.25 °C. Hidrolizan la esculina y son catalasa negativa. Algunas especies son resistentes al calentamiento a 60 °C por 30 minutos, crecen en caldo nutritivo con 6.5% de NaCl y a un PH de 9.6 . Él genero *Enterococcus* comprende ahora todos los estreptococos que comparten determinadas propiedades bioquímicas y toleran bien las condiciones de desarrollo desfavorable. Incluye las especies *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundii* y *E. solitarius*, los cuales en su mayoría son de origen fecal y en muchas circunstancias prácticas, pueden considerarse generalmente indicadores específicos de contaminación fecal de origen humano.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

Sin embargo también se pueden aislar de las heces de animales algunas especies y subespecies como: *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. liquefaciens*, *E. malodoratus* y *E. solitarius*, se encuentran principalmente en las materoas vegetales. En el género *Enterococcus*, únicamente *S. bovis* y *S. equimus* poseen el antígeno del grupo D. Esta prueba puede ser utilizada para la evaluación de muestras de aguas dulces y saladas. Sin embargo, otras técnicas de membrana filtrante no son apropiadas para las aguas con turbiedad alta y aguas residuales cloradas.

3.2 Abreviaciones:

- Filtración de membrana: FM
- Ultravioleta : UV
- Unidades Formadoras de Colonias: UFC

4.0 Resumen del método

El procedimiento de filtración consiste en hacer pasar con ayuda del vacío, la muestra del agua a través de una membrana de celulosa, la cual es colocada luego en una placa de petri conteniendo un medio de cultivo agar KF e incubada a una temperatura determinada. Esta técnica permite examinar volúmenes muy variables de agua y ofrece un resultado directo de la concentración de bacterias coliformes (por el recuento de colonias), en lugar de un estimado estadístico, como en el caso de tubos múltiples.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Se recomienda el uso de medios deshidratados o preparados comercialmente debido al control de calidad. El medio deshidratado debe almacenarse en un lugar fresco y seco. Los medios aglutinados o decolorados deben descartarse, así mismo, el medio debe ser descartado en la fecha de expiración indicada por el fabricante.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

6.1 Agar selectivo para estreptococos KF

Disolver 43 g del medio en un litro de agua destilada, esterilizar a 121 °C por 15 minutos, luego enfriar a 50 °C y distribuirlo en placas de petri.

6.2 Agar cerebro corazón

Disolver 52 g del medio en un litro de agua destilada, esterilizar a 121 °C por 15 minutos, luego enfriar a 50 °C y distribuirlo en placas de petri.

6.3 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121 °C, un volumen de 90 ± 2 ml.

6.4 Tíosulfato de sodio

Disolver 3 g de tíosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

6.5 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Esterilizar el equipo de filtración mediante autoclave.

7.2 Usar una pinza estéril y colocar el filtro de membrana estéril sobre la base del sistema de filtración.

7.3 Colocar con cuidado el embudo o vaso de filtración sobre la base del sistema, fijándolo con una pinza.

7.4 Humedecer la membrana con un pequeño volumen de agua destilada estéril.

7.5 Realizar un control de calidad previo al análisis, filtrando 100 ml de agua destilada estéril, y procediendo como si fuera una muestra más.

7.6 Homogenizar vigorosamente la muestra por lo menos unas 25 veces.

7.7 Proceder a realizar diluciones en caso fuera necesario.

7.7.1 Para las diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original.

7.7.2 Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

original. Continuar con éste proceso dependiendo del grado de contaminación de la muestra.

- 7.7.3 Ordenar los frasco conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución).
- 7.7.4 En caso de trabajar con diluciones, empezar con la más diluida.
- 7.8 Colocar la muestra o diluciones de la misma en un volumen ideal que proporcione alrededor de 80 colonias de estreptococos y no más de 200 colonias de todos los tipos. (Por ejemplo, 10 ml, 25 ml, 50 ml y 100 ml). No se recomienda filtrar volúmenes menores a 10 ml.
- 7.9 Proceder a filtrar la muestra con ayuda de una bomba de vacío.
- 7.10 Luego de la filtración y la desconexión del vacío, retirar el embudo y el filtro de membrana con una pinza estéril.
- 7.11 Colocar la membrana (con ayuda de la pinza estéril) en la placa conteniendo el agar KF, con un movimiento de rotación para evitar la formación de burbujas de aire debajo de la membrana. (Para ello, colocar la almohadilla absorbente previamente esterilizada en la base de la placa, y saturar con 1.7 a 2.0 ml del medio).
- 7.12 Invertir la placa e incubar a 37 ± 1.0 °C por 48 ± 3.0 horas.
- 7.13 Contar las colonias de color rojo ladrillo, violeta o rosa que son típicas o sospechosas de ser estreptococos fecales.
- 8.0 Prueba confirmativa.

Las colonias rojas y rosadas que crecen en el agar KF son estreptococos fecales. Para verificar las colonias se debe usar el procedimiento siguiente:

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

Opción 1:

- 8.1 Picar las colonias típicas en la membrana e inocularlas sobre un slant de agar infusión cerebro corazón. Incubarlas a 35 ± 0.5 °C por 24 a 48 horas.
- 8.2 Transferir una asada del crecimiento del slant a un portaobjeto limpio y agregar unas gotas de peroxido de hidrógeno al 3% (fresco). La presencia de burbujas constituye una prueba catalasa positiva y nos indica que la colonia no pertenece a un miembro del grupo de los estreptococos fecales. Si no aparecen burbujas la prueba de catalasa es negativa, por lo cual, se debe continuar con la confirmación haciendo en otro portaobjeto una tinción de Gram. En la coloración se deben apreciar células redondas, de 0.5 a 1.0 μm de diámetro, generalmente distribuidas en pares o cadenas cortas características de los estreptococos fecales, si es así se debe seguir con la siguiente prueba.
- 8.3 Se transfiere una gota del crecimiento a agar bilis-esculina, una gota a caldo infusión cerebro corazón con NaCl al 6.5% y otra a caldo infusión cerebro corazón, las dos primeras se incuban a 35 ± 0.5 °C por 48 horas y la ultima a 45 ± 0.5 °C por 48 horas.
- 8.4 La prueba catalasa negativa, los cocos Gram positivos en agar bilis esculina y el crecimiento en caldo infusión cerebro corazón a 45 °C confirman que las colonias son estreptococos fecales.
- 8.5 El crecimiento en el caldo infusión cerebro corazón con NaCl al 6.5% a 44.5 °C nos indica que la colonia pertenece al grupo de los enterococos.

Opción 2:

- 8.6 Una prueba alternativa para la verificación de *S. bovis* y *S. equinus* que poseen el antígeno del grupo de deLancefield puede ser realizada utilizando el método de precipitina de lancefield. Esta prueba es altamente especifica para *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, *S. gallinarum*, *S. bovis* y *S. equinus*.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

- 8.7 Preparación del antígeno: Se pica una única colonia del filtro de membrana y se raya para su aislamiento en placa de agar infusión cerebro corazón o agar sangre.
- 8.8 Se pica una colonia bien aislada y se inocula en 30 a 50 mL de caldo Todd-Hewitt, se incuba bajo anaerobiosis a 35 °C por 24 horas.
- 8.9 Concentrar la suspensión de bacteriana por centrifugación (3000 x g por 5 minutos). Regar el supernate y resuspender las células en 0.5 mL de solución salina.
- 8.10 Auto clavar las células resuspendidas por 15 minutos a 121 °C, y luego centrifugar las bacterias y decantar el supernate claro que contiene el grupo antigénico.
- 8.11 Prueba de precipitación capilar: introducir un tubo capilar de 1.2 a 1.5 mm en el antisuero y aspirar 1 cm de suero. Colocar el dedo en el extremo superior del tubo para evitar que se introduzca aire y sacudir con cuidado el exceso de antisuero.
- 8.12 Sumerja el tubo en la solución que contiene el extracto de antígeno y aspire un volumen igual de antígeno. Cuidadosamente sacuda el exceso del extracto.
- 8.13 Colocar el dedo en el extremo superior del tubo e introduzca el extremo inferior en plasticina para sellarlo. Luego, invierta el tubo en una gradilla (con una base de plasticina) para tubos capilares.
- 8.14 Una prueba es positiva cuando aparece un precipitado blanco en la interfase antígeno-anticuerpo dentro de un periodo de 15 minutos, usualmente por 5 minutos.
- 8.15 Si la reacción no ocurre en 30 minutos la prueba es negativa. Los tubos deben ser examinados con una luz roja brillante contra un fondo oscuro.
- 8.16 La identificación de cada uno de los tipos de estreptococos fecales necesita pruebas bioquímicas adicionales, en el cuadro siguiente se presenta un resumen de las reacciones bioquímicas para la identificación de estreptococos fecales, enterococos y las especies dentro de estos dos grupos.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la caracterización de especies de estreptococos en estreptococos fecales y grupo enterococos.

Prueba	S. faecalis	S. Faecium	S. Avium	S. Gallinarum	S. Bovis	S. equinus
Catalasa	-	-	-	-	-	-
40% de bilis	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 45 °C	+	+	+	+	+	+
Crecimiento con 6.5% de NaCl	+	+	+	+	-	-
Crecimiento a 10 °C	+	+	+	+	-	-
Utilización del pirúvato	+	-	-	-	-	-
Fosfatasa activa	+	-	+	+	-	-
Hidrólisis de la arginina	+	+	-d	-	-	-
Fermentación del L-sorbose	-	-	+	-	-	-
Fermentación de L-lactosa	+	+	+	+	+	+
Actividad n-acetyl-B-glucosaminidasa	-d	-	-	+	-	-
Almidón	-	-	-	-	+	-
Arabinosa	-	+	+	-	-	-

9.0 Análisis de datos.

9.1 Resultados

9.1.1 Para el cálculo de la densidad de estreptococos fecales se expresa como el total de coliformes en unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 ml.

9.1.2 El recuento se calcula utilizando filtros de membrana que tengan entre 20 a 60 colonias de estreptococos y no más de 200 colonias de todos los tipos por membrana.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

9.1.3 Se aplica la siguiente formula:

$$\text{Colonias de estreptococos fecales /100 ml} = \frac{\text{Colonias de coliformes contadas}}{\text{ml de muestra filtrada}} \times 100$$

9.2 Registro de datos

9.2.1 En el siguiente cuadro esquematiza una hoja de registros de datos para la prueba de estreptococos fecales.

9.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora del análisis.

9.2.3 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Determinación de estreptococos fecales Metodo de filtración de membrana

Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Volumen filtrado					Coliformes fecales UFC / 100 ml	Medios de cultivo
			100 ml	50 ml	25 ml	10 ml	10 ⁻¹		
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	CLT
								48 hrs verificado	CLT
								24 hrs confirmado	CLVBB
								48 hrs confirmado	CLVBB
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	CLT
								48 hrs verificado	CLT
								24 hrs confirmado	CLVBB
								48 hrs confirmado	CLVBB
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	CLT
								48 hrs verificado	CLT
								24 hrs confirmado	CLVBB
								48 hrs confirmado	CLVBB
								24 hrs	m-Endo
								24 hrs verificado	CLT
								48 hrs verificado	CLT
								24 hrs confirmado	CLVBB
								48 hrs confirmado	CLVBB

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	PÁGINA: __ DE __

9.2.4 Reporte de resultados

9.2.5 En el siguiente cuadro esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de estreptococos fecales en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Estreptococos fecal NMP/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de estreptococos fecales en agua por el método de filtro de membrana	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de clostridium perfringens, mediante el procedimiento de fermentación en tubos múltiple, se utiliza para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar y aguas residuales. Los resultados de este método se reportan en Números Más Probable (NMP) de microorganismos existentes.

La prueba de detección de clostridios reductores de sulfito juegan un papel complementario en el control de la calidad del agua. Estos organismos, a diferencia de otras células vegetativas, forman esporas que son resistentes al calor y que pueden ser utilizadas para la detección de clostridios en agua. El clostridium perfringens es un importante miembro del grupo de los clostridios por que está asociado a contaminación fecal. Como se encuentra cuando otros indicadores no pueden ser detectados, este grupo puede indicar contaminación remota o intermitente.

3.0 Definiciones:

3.1 Clostridium perfringens.

Los clostridios reductores de sulfitos son bacilos Gram positivos, anaeróbicos, que forman esporas y reducen el sulfito a sulfuro. El clostridium perfringens forma un coagulo en medio leche litmus (LMM), Crossley's milk médium (CMM)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

3.2 Número Más Probable (NMP)

Es el cálculo de la densidad probable de bacterias coliformes basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La precisión de cada prueba depende de el número de tubos utilizados. Tres series de dilución son necesarias para la obtención del código de NMP. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de hacer las porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP podrá resultar mayor o menor que el número real de densidad bacteriana. La densidad bacteriana se obtiene a través de la formula facilitada o a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor determinado y se expresa como NMP de coliformes/100 ml.

Abreviaciones:

- Numero Más probable (NMP)

4.0 Resumen del método:

El método consta de una etapas debido a que el medio que utilizamos es se selectivos.

La prueba consiste en colocar volúmenes determinados de muestras de agua en una serie en una serie de tubos conteniendo medio DRCM y luego son incubados a 37 °C durante 48 horas. En esta prueba al finalizar el periodo de incubación si se presenta un oscurecimiento del medio causado por la reducción del sulfito y precipitación de sulfuro de hierro. Los resultados se expresan en términos de Número Más Probable (NMP) de microorganismos.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Se recomienda el uso de medios deshidratados o preparados comercialmente. El medio deshidratado debe almacenarse en un lugar fresco y seco. Los medios aglutinados o decolorados deben descartarse, así mismo, el medio debe ser descartado en la fecha de expiración indicada por el fabricante.

El medio estéril en los tubos debe examinarse para asegurar que los tubos de Durham no tengan burbujas de aire y estén al menos la mitad a dos tercios cubiertos después de agregar la muestra.

6.1 Medio para clostrios reforzado diferencial medio simple((DRCM)

Añada 10.0 g de peptona, 10.0 g de extracto de carne, 5.0 g de acetato de sodio (hidratado), 1.5 g de extracto de levadura a 800 ml de agua destilada, en los 200 ml de agua destilada restante disuelva primero 1.0 g de almidón soluble, y agregue 1.0 g glucosa, 500 mg de hidrocloreuro de L(-) cisteína y mezcle ambas soluciones, ajuste el PH a 7.1 a 7.2 , distribuya 25 ml en botellas con tapón de rosca y autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Para concentración doble se duplican las cantidades del medio simple y se distribuyen en 10 ml en las botellas con tapón de rosca. El día que se utilice el medio mezcle volúmenes iguales de las dos soluciones. Para dar una concentración final de 0.04% de sulfito de sodio y 0.07% de citrato de hierro III añada 0.5 ml a cada 25 ml del medio basal a concentración simple recientemente auto clavado y enfriado para excluir el oxígeno disuelto. Para 10 ml y 50 ml de medio de doble concentración agregue 0.4 ml y 2.0 ml respectivamente, de la mezcla sulfito.hierro.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 1 - concentración de medio DRCM en función al volumen de muestra adecuado

Tubos con DR CM ml	Volumen de muestra ml	Concentración del medio	DRCM g/l
10	0.1 a 10	1 x (simple)	10.0 g de peptona 10.0 g de extracto de carne 5.0 g de acetato de sodio (hidratado) 1.5 g de extracto de levadura 1.0 g de almidón soluble 1.0 g glucosa 500 mg de hidrocloreuro de L(-) cisteína
10	10	2 x (doble)	20.0 g de peptona 20.0 g de extracto de carne 10.0 g de acetato de sodio (hidratado) 3.0 g de extracto de levadura 2.0 g de almidón soluble 2.0 g glucosa 1.0 g de hidrocloreuro de L(-) cisteína

6.2 Medio de leche Crossley (CMM)

Agregar 100 g de leche descremada en polvo, 10 g de peptona, 100 mg de púrpura de bromoresol en un litro de agua destilada, creme los ingredientes con una pequeña cantidad de agua destilada y gradualmente diluya hasta un litro (se debe agitar continuamente). El pH final del medio debe ser de 6.8 ± 0.2 .

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

6.3 Medio leche litmus (LMM)

Prepare leche líquida de leche descremada en polvo y añada solución acuosa de litmus al 10% hasta obtener una coloración azul-púrpura. Distribuya volúmenes de 5 ml en botellas tapadas con tapón de rosca y autoclave a 115 °C por 10 minutos.

6.4 Soluciones de sulfito de sodio y citrato de hierro III

Preparar soluciones de sulfito de sodio anhidro al 4% (P/V) y citrato de hierro III al 7% (P/V) en agua destilada. La última de estas soluciones se calienta hasta disolverla. Se esteriliza por filtración. Almacenar las soluciones a 4°C por 14 días.

6.5 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121 °C.

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121 °C, un volumen de 90 ± 2 ml.

6.6 Tíosulfato de sodio

Disolver 3 g de tíosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.7 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Prueba presuntiva

7.1.1 La muestra se calienta a 75 °C por 10 minutos en un baño de agua. El tiempo necesario para alcanzar esta temperatura puede ser determinado sumergiendo una botella similar, conteniendo el mismo volumen de agua y un termómetro, en el baño de agua.

7.1.2 Si las muestras están muy contaminadas se procede a realizar las diluciones respectivas, identificando y codificando los frascos de agua de dilución.

7.1.3 Las muestras de agua deben agitarse vigorosamente unas 3 veces antes de ser analizadas, para asegurar una buena homogeneización.

7.1.4 En caso de realizar diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original.

7.1.5 Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra original. Continuar con éste proceso dependiendo del grado de contaminación de la muestra.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 7.1.6 Ordenar los frasco conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución).
- 7.1.7 Prepara una serie de cinco botellas conteniendo 10 ml de medio DRCM de concentración doble y, series de cinco botellas con 25 ml de medio DRCM de concentración simple. Colocarlos en una gradilla y codificar los tubos anotando el numero asignado a la muestra, volumen (y/o dilución) a inocular y fecha.
- 7.1.8 Agitar vigorosamente por unas 3 veces el frasco con la última dilución efectuada y con una pipeta estéril, inocular 1 ml de la dilución en cada uno de las botellas con medio DRCM de concentración simple correspondiente a dicha dilución llene la botella para eliminar al mínimo el espacio de aire.
- 7.1.9 Proceder de la misma forma inculando de la muestra más diluida a la más concentrada, utilizando la misma pipeta.
- 7.1.10 Inocular también 1 ml de la muestra original en cinco botellas con medio DRCM de concentración simple y 10 ml en cinco botellas con medio DRCM de concentración doble.
- 7.1.11 Incubar los tubos por 48 horas a 37 °C. Una reacción positiva se evidencia por oscurecimiento del medio causado por la reducción del sulfito y precipitación de sulfuro de hierro II. El conteo hecho en esta etapa representa el NMP de esporas de clostridios reductores de sulfito.
- 7.1.12 Anotar los resultados y calcular el NMP a partir de los datos obtenidos en la prueba presuntiva.
- 7.2 Prueba confirmativa
- 7.2.1 De cada botella con reacción positiva se transfiere una asada a un tubo que contenga 10 ml de medio LMM o CMM frescamente auto clavado y enfriado, Para evitar que haya oxígeno disuelto.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 7.2.2 El crecimiento puede ser mejorado agregando a cada tubo una pequeña cantidad de hierro, esterilizado calentándolo al rojo vivo en el mechero
- 7.2.3 Los tubos se incuban en jarras o cabinas anaerobia a 37 °C por 48 horas.
- 7.2.4 Los tubos que contienen clostridium perfringens muestran una reacción tormentosa de coagulación.
- 7.2.5 Como resultado de la fermentación de la lactosa, la leche es acidificada, coagulada, el coagulo es desintegrado por el gas por lo que finalmente se derrama fuera del tubo.

8.0 Análisis de datos.

8.1 Resultados

- 8.1.1 El cálculo de la densidad probable de clostridium perfringens está basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La densidad de clostridium perfringens se expresa como NMP de clostridium perfringens por 100 ml y se obtiene a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor de NMP determinado para ello se necesitan tres diluciones para la obtención del código del NMP, ver el cuadro 4.

Aunque los códigos presentados en el cuadro anterior se refieran específicamente a la combinación de resultados positivos obtenidos cuando son inoculados volúmenes de 10 ml y 1.0 ml de muestra

8.2 Registro de datos

- 8.2.1 En el cuadro 2 se esquematiza una hoja de registro de datos para la prueba clostridium perfringens, fase presuntiva y confirmativa.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora de análisis.
- 8.2.3 Reportar los resultados de las pruebas presuntivas de 24 horas para cada muestra.
- 8.2.4 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.
- 8.2.5 Los rangos de dilución a emplearse se dan de acuerdo al tipo de muestra analizada

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

CUADRO 2



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Determinación de Clostridium perfringens método tubos múltiples

Prueba presuntiva: Medio DRCM

Prueba confirmativa: Medio LMM o CMM

FECHA Y HORA DE MUESTREO	FECHA Y HORA DE ANALISIS	PUNTO DE MUESTREO	PRUEBA PRESUNTIVA Y CONFIRMATIVA 24-48 HORAS (DILUCIONES EN ML)					CLOSTRIDIUM PERFRINGENS NMP/100 ML
			10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 En el cuadro 3 esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de Clostridium perfringens en agua.

CUADRO 3



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Clostridium perfringens NMP/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laborato

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 4. NMP y límites de confianza de 95% cuando se usan diversas combinaciones de resultados positivos de series de 10, 1 y 0.1 ml en series de 5 tubos

Número de tubos con reacción positiva			Índice de NMP/100 ml	Límites de confianza de 95%	
10 ml	1 ml	0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	<2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	25
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	0	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	4	5	>1600	---	---

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EN AGUA POR EL MÉTODO DE FILTRO EN MEMBRANA (FM)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de clostridium perfringes por la técnica de filtración de membrana es altamente reproducible, puede utilizarse para estudiar volúmenes relativamente grandes de muestras y proporcionan resultados numéricos más rápidos que el método de tubos múltiple.

La prueba de detección de clostridios reductores de sulfito es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar. Estos organismos, a diferencia de otras células vegetativas, forman esporas que son resistentes al calor y que pueden ser utilizadas para la detección de clostridios en agua. El clostridium perfringes es un importante miembro del grupo de los clostridios por que está asociado a contaminación fecal. Como se encuentra cuando otros indicadores no pueden ser detectados, este grupo puede indicar contaminación remota o intermitente.

3.0 Definiciones:

3.1 Clostridium perfringens.

Los clostridios reductores de sulfitos son bacilos Gram positivos, anaeróbicos, que forman esporas y reducen el sulfito a sulfuro. El clostridium perfringens forma un coagulo en medio leche litmus (LMM), Crossley's milk médium (CMM)

3.2 Abreviaciones:

- Filtración de membrana : FM
- Ultravioleta : UV
- Unidades Formadoras de Colonias : UFC
- Agar tryptosa-sulfito-cicloserina (TSCA)
- Medio leche litmus (LMM)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

- Crossley's milk medium (CMM)

4.0 Resumen del método

Este método consiste en destruir por medio de calor todas las bacterias vegetativas, filtrar un volumen de muestra a través de una membrana y luego incubar anaerobicamente en un agar que contenga sulfito. Finalmente se cuentan las colonias negras que se desarrollaron y se realizan subcultivos de estas en un medio confirmativo con el objeto de demostrar las colonias de clostridium perfringens.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

6.1 Agar tryptosa-sulfito-cicloserina (Harmon, Kautter y Peeler 1971; Hauschild and Hillsheimer 1974)

Agregar 15.0 g de tryptosa, 5.0 g de peptona de soya, 5.0 g extracto de levadura, 1.0 g de metilsulfito de sodio, 1.0 g de citrato de hierro (III) y amonio, 12.0 g de agar, en un litro de agua destilada, llevar a PH final de 7.6 ± 0.2 , dispense en cantidades de 100 ml en botellas con tapón de rosca y esterilice por auto clavado a 121°C por 10 minutos, luego enfríe a 50°C para uso inmediato o almacene en lugar frío y oscuro. Agregue 4 ml de emulsión de yema de huevo a cada botella de 100 ml de medio, previo a agregar el medio a las placas de petri agregar 4 ml solución de antibiótico por cada 100 ml del medio.

6.2 Solución de antibiótico

En agua destilada prepare una solución al 1% P/V de D-Cicloserina, esterilice por filtración y añada 4 ml de esta solución a cada 100 ml del medio antes de agregarlo en las placas de petri (la concentración final de antibiótico es de 400 ugml^{-1}). Esta solución se puede guardar a 4°C por dos semanas.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

6.3 Medio de leche Crossley (CMM)

Agregar 100 g de leche descremada en polvo, 10 g de peptona, 100 mg de púrpura de bromoresol en un litro de agua destilada, creme los ingredientes con una pequeña cantidad de agua destilada y gradualmente diluya hasta un litro (se debe agitar continuamente). El pH final del medio debe ser de 6.8 ± 0.2 .

6.4 Medio leche litmus (LMM)

Prepare leche líquida de leche descremada en polvo y añada solución acuosa de litmus al 10% hasta obtener una coloración azul-púrpura. Distribuya volúmenes de 5 ml en botellas tapadas con tapón de rosca y autoclave a $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

6.5 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, un volumen de 90 ± 2 ml.

6.6 Tiosulfato de sodio

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

Disolver 3 g de tiosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.7 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Esterilizar el equipo de filtración mediante autoclave.

7.2 Usar una pinza estéril y colocar el filtro de membrana estéril sobre la base del sistema de filtración.

7.3 Colocar con cuidado el embudo o vaso de filtración sobre la base del sistema, fijándolo con una pinza.

7.4 Humedecer la membrana con un pequeño volumen de agua destilada estéril.

7.5 Realizar un control de calidad previo al análisis, filtrando 100 ml de agua destilada estéril, y procediendo como si fuera una muestra más.

7.6 Homogenizar vigorosamente la muestra por lo menos unas 3 veces.

7.7 La muestra se calienta a 75 °C por 10 minutos en un baño de agua. El tiempo necesario para alcanzar esta temperatura puede ser determinado sumergiendo una botella similar, conteniendo el mismo volumen de agua y un termómetro, en el baño de agua.

7.8 Proceder a realizar diluciones en caso fuera necesario.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

- 7.8.1 Para las diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original.
- 7.8.2 Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra original. Continuar con éste proceso dependiendo del grado de contaminación de la muestra.
- 7.8.3 Ordenar los frasco conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución).
- 7.8.4 En caso de trabajar con diluciones, empezar con la más diluida.
- 7.9 Colocar la muestra o diluciones de la misma en un volumen ideal que proporcione alrededor de 80 colonias de Clostridium perfringens y no más de 200 colonias de todos los tipos. (Por ejemplo, 10 ml, 25 ml, 50 ml y 100 ml). No se recomienda filtrar volúmenes menores a 10 ml.
- 7.10 Proceder a filtrar la muestra con ayuda de una bomba de vacío.
- 7.11 Luego de la filtración y la desconexión del vacío, retirar el embudo y el filtro de membrana con una pinza estéril.
- 7.12 Colocar la membrana (con ayuda de la pinza estéril) en la placa conteniendo el agar tryptosa-sulfito-cicloserina a 50°C con un movimiento de rotación para evitar la formación de burbujas de aire debajo de la membrana. (Para ello, colocar la almohadilla absorbente previamente esterilizada en la base de la placa, y saturar con 1.7 a 2.0 ml del medio). Agregar de 15 a 20 ml de agar enfriado a 50°C el agar debe ser agregado de tal forma que se evite el lavado de las esporas bacterianas y deje solidificar el medio.(esto ayudara a mejorar el resultado)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

- 7.13 Invertir la placa e incubar a 37 ± 1.0 °C por 24 y 48 horas.
- 7.14 Contar las colonias de color negro que son típicas o sospechosas de ser clostridium perfringens.
- 8.0 Prueba confirmativa.
- 8.1 Usando un asa en punta bacteriológica subcultivar cada colonia a ser evaluada en un tubo o botella que contenga 10 ml de medio LMM o CMM frescamente auto clavado y enfriado, Para evitar que haya oxígeno disuelto.
- 8.2 El crecimiento puede ser mejorado agregando a cada tubo una pequeña cantidad de hierro, esterilizado calentándolo al rojo vivo en el mechero.
- 8.3 Los tubos se incuban en jarras o cabinas anaerobia a 37 °C por 48 horas.
- 8.4 Los tubos que contienen clostridium perfringens muestran una reacción tormentosa de coagulación.
- 8.5 Como resultado de la fermentación de la lactosa, la leche es acidificada, coagulada, él coagulo es desintegrado por el gas por lo que finalmente se derrama fuera del tubo.
- 8.6 También las colonias negras pueden ser subcultivadas en dos placas de agar nutritivo, una para ser incubada aeróbicamente a 37 °C por 48 horas para excluir la presencia de Bacillus, que son anaerobios facultativos.
- 8.7 La otra placa se incuba en condiciones anaeróbicas para comprobar su pureza.
- 9.0 Análisis de datos.**
- 9.1 Resultados
- 9.1.1 Para el cálculo de la densidad de clostridium perfringens se expresa como el total de clostridium perfriges en unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 ml.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

9.1.2 El recuento se calcula utilizando filtros de membrana que tengan entre 20 a 60 colonias de clostridium y no más de 200 colonias de todos los tipos por membrana.

9.1.3 Se aplica la siguiente formula:

$$\text{Colonias de estreptococos fecales /100 ml} = \frac{\text{Colonias de clostridium contadas}}{\text{ml de muestra filtrada}} \times 100$$

9.2 Registro de datos

9.2.1 En el siguiente cuadro esquematiza una hoja de registros de datos para la prueba de Clostridium perfringens.

9.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora del análisis.

9.2.3 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.
El siguiente es un registro de datos para la cuantificación de clostridium perfringens.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ___ de ___

Determinación de clostridium perfringens Método de filtración de membrana

Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Volumen filtrado					clostridium perfringens UFC / 100 ml	Medios de cultivo
			100 ml	50 ml	25 ml	10 ml	10 ⁻¹		
								24 hrs	Agar TSCA
								48 hrs verificado	Agar TSCA
								24 hrs confirmado	LMM O CMM
								48 hrs confirmado	Agar TSCA
								48 hrs confirmado	Agar TSCA

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

9.3 Reporte de resultados

9.3.1 En el siguiente cuadro esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de clostridium perfringens en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Clostridium UFC/100 ml

Observaciones: _____

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Clostridium perfringens en agua por el método de filtro de membrana (FM)	PÁGINA: __ DE __

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE PSEUDOMONAS AERUGINOSAS EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUI M I C A Y FARMACIA	PROCEDI MI ENTO NORMALI ZADO DE OPERACI ÓN	CODI GO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGI NA: __ DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de Pseudomonas aeruginosa, mediante el procedimiento de fermentación en tubos múltiple, es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago y aguas residuales. La Pseudomonas aeruginosa puede derivarse de las heces de humanos o animales pero su presencia en estas no es universal. No puede ser utilizado como indicador de contaminación fecal debido a su capacidad de multiplicarse en las aguas que contienen suficiente cantidad de nutrientes. No se recomienda su enumeración como un procedimiento de rutina. Pueden ser de valor en ciertas industrias, por ejemplo en la manufactura de alimentos, bebidas o productos farmacéuticos, donde se requiere agua de una pureza microbiológica excepcional. Los resultados de este método se reportan en Números Más Probable (NMP) de microorganismos existentes.

3.0 Definiciones:

3.1 Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo Gram negativo, monotrico que pertenece a la familia Pseudomonadaceas. Puede ser reconocido por la producción de un pigmento verde azulado fluorescente llamado piocianina, el cual puede difundir en medios de cultivo con agar algunas cepas de Pseudomonas aeruginosa recuperadas de muestras clínicas pueden no producir este pigmento y también pierden esta propiedad en subcultivos. Al igual que otras Pseudomonas fluorescentes presentes en aguas naturales, las cepas de Pseudomonas aeruginosa producen catalasa y oxidasa.

FACULTAD DE QUI M I CA Y FARMACIA	PROCEDI MI ENTO NORMALI ZADO DE OPERACI ÓN	CODI GO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGI NA: __ DE __

3.2 Número Más Probable (NMP)

Es el cálculo de la densidad probable de bacterias Pseudomonas basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La precisión de cada prueba depende del número de tubos utilizados. Tres series de dilución son necesarias para la obtención del código de NMP. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de hacer las porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP podrá resultar mayor o menor que el número real de densidad bacteriana. La densidad bacteriana se obtiene a través de la formula facilitada o a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor determinado y se expresa como NMP de Pseudomonas /100 ml.

4.0 Resumen del método:

El método consta de dos etapas: prueba presuntiva y confirmativa.

La presuntiva consiste en colocar volúmenes determinados de muestras de agua en una serie en una serie de tubos conteniendo caldo aspara gina y luego son incubados a $35 \text{ ó } 37 \pm 0.5 \text{ °C}$ durante 24-48 horas. En esta prueba presuntiva se examinan los tubos bajo luz ultravioleta, en un cuarto oscuro. La producción de un pigmento verde fluorescente constituye una prueba positiva.

La prueba confirmativa consiste en transferir un inculo de cada tubo positivo de la prueba presuntiva, a tubos conteniendo caldo acetamida o en tubos inclinados con agar acetamida e incubados posteriormente a $35 - 37 \pm 0.5 \text{ °C}$ durante 24-36 horas. Cuando la prueba es positiva desarrolla un color púrpura en el medio.

Los resultados se expresan en términos de Número Más Probable (NMP) de microorganismos.

Abreviaciones:

- Numero Más probable (NMP)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Estos medios no están disponibles en forma deshidratada y se requiere de los ingredientes básicos para su preparación

6.1 Caldo Asparagina

Disolver 3.0 g de Asparagina, 1.0 g de fosfato de potasio monobásico anhidro, 0.5 g de sulfato de magnesio hepta hidratado en 1 litro de agua destilada, luego ajustar el PH entre 6.9 y 7.2 antes de esterilizar (caldo simple). y distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 16 mm x 150 mm, tapar y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Para caldo de doble concentración, Disolver 6.0 g de Asparagina, 2.0 g de fosfato de potasio monobásico anhidro, 1.0 g de sulfato de magnesio hepta hidratado en 1 litro de agua destilada luego ajustar el PH entre 6.9 y 7.2 antes de esterilizar. Distribuir 10 ml del medio en tubos de ensayos de 25 x 150 mm y proceder a esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 1 - concentración de caldo Asparagina en función al volumen de muestra adecuado

Tubos con caldo Asparagina ml	Volumen de muestra ml	Concentración del medio	Caldo Asparagina g/l
10	0.1 a 1.0	1 x (simple)	Asparagina DL 3.0g KH ₂ PO ₄ 1.0g MgSO ₄ *7H ₂ O 0.5g
10	10	2 x (doble)	Asparagina DL 6.0g KH ₂ PO ₄ 2.0g MgSO ₄ *7H ₂ O 1.0g

6.2.1 Caldo Acetamida

Disolver 10.0g de acetamida, 5.0g cloruro de sodio (NaCl), 1.39g de anhídrido de potasio monobásico (KHPO), 0.73g de sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄*7H₂O), 0.0012g de rojo de fenol en un litro de agua destilada, ajustar el PH entre 6.9 a 7.2 ± 0.2 antes de esterilizar y distribuir 10 ml en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm. Tapar y auto clavar a 121 °C durante 15 minutos. Se pueden preparar tubos de agar acetamida inclinado para lo cual se debe agregar a los ingredientes anteriores 15 g de agar, se calienta el medio para disolver el agar y se dispensan 8 ml del medio en tubos de 16 mm. Se auto clavan, luego mientras aún los tubos están calientes se deben inclinar para lograr un slant de gran superficie.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

6.2.2 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C .

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121°C .

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121°C , un volumen de 90 ± 2 ml.

6.2.3 Tiosulfato de sodio

Disolver 3 g de tiosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.2.4 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

FACULTAD DE QUI M I C A Y FARMACIA	PROCEDI MI ENTO NORMALI ZADO DE OPERACI ÓN	CODI GO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGI NA: __ DE __

7.0 Procedimiento

7.1 Prueba presuntiva

- 7.1.1 Prepara una serie de cinco tubos conteniendo 10 ml de caldo Asparagina de concentración doble y, series de cinco tubos con 10 ml de caldo Asparagina de concentración simple. Colocarlos en una gradilla y codificar los tubos anotando el número asignado a la muestra, volumen (y/o dilución) a inocular y fecha.
- 7.1.2 Si las muestras están muy contaminadas se procede a realizar las diluciones respectivas, identificando y codificando los frascos de agua de dilución.
- 7.1.3 Las muestras de agua deben agitarse vigorosamente unas 3 veces antes de ser analizadas, para asegurar una buena homogeneización.
- 7.1.4 En caso de realizar diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original.
- 7.1.5 Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra original. Continuar con éste proceso dependiendo del grado de contaminación de la muestra.
- 7.1.6 Ordenar los frasco conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución).
- 7.1.7 Agitar vigorosamente por unas 3 veces el frasco con la última dilución efectuada y con una pipeta estéril, inocular 1 ml de la dilución en cada uno de los tubos con caldo Asparagina de concentración simple correspondiente a dicha dilución.

FACULTAD DE QUI M I CA Y FARMACIA	PROCEDI MI ENTO NORMALI ZADO DE OPERACI ÓN	CODI GO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGI NA: __ DE __

- 7.1.8 Proceder de la misma forma inoculando de la muestra más diluida a la más concentrada, utilizando la misma pipeta.
- 7.1.9 Inocular también 1 ml de la muestra original en cinco tubos con caldo Asparagina de concentración simple y 10 ml en cinco tubos con caldo Asparagina de concentración doble.
- 7.1.10 Incubar los tubos por 24 - 48 horas de 35 -37 °C. Examinar los tubos bajo luz ultra violeta en un cuarto oscuro. La producción de un pigmento verde fluorescente constituye una prueba presuntiva positiva.
- 7.2 Prueba confirmativa
- 7.2.1 De los tubos con resultado positivo se toma 0.1 ml del crecimiento, se inocula en caldo acetamida o en un tubo de agar acetamida inclinado.
- 7.2.2 Incubar los tubos inoculados a 35 ± 2 °C por un periodo de 24 a 36 horas.
- 7.2.3 Cuando la prueba es positiva se desarrolla un color púrpura en el medio debido al incremento en el PH.
- 7.2.4 Anotar los resultados y calcular el NMP a partir de los datos obtenidos en la prueba confirmativa.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 2. NMP y límites de confianza de 95% cuando se usan diversas combinaciones de resultados positivos de series de 10, 1 y 0.1 ml en series de 5 tubos

Número de tubos con reacción positiva			Índice de NMP/100 ml	Límites de confianza de 95%	
10 ml	1 ml	0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	<2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	25
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	0	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	4	5	>1600	---	---

FACULTAD DE QUI M I C A Y FARMACIA	PROCEDI MI ENTO NORMALI ZADO DE OPERACI ÓN	CODI GO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGI NA: __ DE __

8.0 Análisis de datos.

8.1 Resultados

8.1.1 El cálculo de la densidad probable de bacterias de Pseudomona aeruginosas está basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La densidad de Pseudomona aeruginosas se expresa como NMP de Pseudomonas por 100 ml y se obtiene a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor de NMP determinado para ello se necesitan tres diluciones para la obtención del código del NMP, ver cuadro 2.

8.1.2 Aunque los códigos presentados en el cuadro anterior se refieran específicamente a la combinación de resultados positivos obtenidos cuando son inoculados volúmenes de 10 ml, 1 ml y 0.1 ml de muestra, éstos pueden ser usados para volúmenes mayores o menores de siembra ajustando con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de NMP en la tabla X} \frac{10}{\text{Vol. dilución inicial de la muestra seleccionada}} = \text{NMP} / 100 \text{ ml}$$

8.1.3 Cuando más de tres diluciones decimales son inoculadas, se debe determinar las tres diluciones significativas para el código. Estas diluciones se pueden determinar de acuerdo a las siguientes reglas:

8.1.3.1 Como primer número del código se seleccionara la mayor dilución en la que todos los tubos resultaran positivos y las dos diluciones subsiguientes para completar el código. (ver cuadro 3 prueba 1 y 2)

8.1.3.2 Si menos de tres diluciones tienen resultados positivos, se seleccionaran las tres mayores diluciones que incluyen los tubos positivos para completar el código. (ver cuadro 3 prueba 3)

FACULTAD DE QUI M I C A Y FARMACIA	PROCEDI MI ENTO NORMALI ZADO DE OPERACI ÓN	CODI GO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGI NA: __ DE __

- 8.1.3.3 Si resultaran tubos positivos en diluciones mayores que en aquellas seleccionadas para el código, los resultados positivos se desplazan hacia las diluciones seleccionadas a fin de incrementar los tubos positivos en la ultima dilución seleccionada. (ver cuadro 3 prueba 4)
- 8.1.3.4 Si resultaran tubos negativos en volúmenes mayores de muestra que los escogidos para el código, el primer número del código será el de la mayor dilución en la cual todos los tubos resultaran positivos, con las siguientes diluciones más altas para completar el código. (ver cuadro 3 prueba 5)
- 8.1.3.5 Si todos los tubos resultaran positivos, seleccionar para el código, aquellas tres diluciones mayores. (ver cuadro 3 prueba 6)
- 8.1.3.6 Si todos los tubos resultaran negativos, seleccionar para el código aquellas tres diluciones menores. (ver cuadro 3 prueba 7)
- 8.1.3.7 Si no resultaran tubos positivos en una dilución intermedia, seleccionar para el código la serie de menor dilución con tubos positivos y otra de mayor dilución con tubos positivos. (ver cuadro 3 prueba 8)
- 8.1.3.8 Si solamente la dilución intermedia resultara positiva, escoger para el código la serie de menor dilución y otra de mayor dilución para el código. (ver cuadro 3 prueba 9)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 3 Valores para la selección del código

Prueba	Tubos positivos/ml y volumen de muestra					Código
	10	1	0.1	0.01	0.001	
1	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	0	0	5-2-0
2	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	5-2-1
3		<u>3</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	3-1-0
4	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	5-3-2
5	4	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	5-4-0
6		5	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	5-5-5
7		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0-0-0
8		<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	0	4-0-1
9		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0-1-0

8.2 Registro de datos

8.2.1 En el siguiente cuadro se esquematiza una hoja de registro de datos para la prueba de Pseudomonas aeruginosa, fase presuntiva y confirmativa.

8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora de análisis.

8.2.3 Reportar los resultados de la prueba presuntiva de 24 y 48 horas y prueba confirmativa de 24 y 48 horas para cada muestra.

8.2.4 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.

8.2.5 Los rangos de dilución a emplearse se dan de acuerdo al tipo de muestra analizada

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Determinación de Pseudomonas aeruginosa método tubos múltiples

Prueba presuntiva: Caldo Asparagina

Prueba confirmativa: caldo Acetamida

FECHA Y HORA DE MUESTREO	FECHA Y HORA DE ANALISIS	PUNTO DE MUESTREO	PRUEBA PRESUNTIVA Y CONFIRMATIVA 24-48 HORAS (DILUCIONES EN ML)					PSEUDOMONAS AERUGINOSA NMP/100 ML
			10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.

Analista: _____

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 En el siguiente cuadro esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes totales en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Pseudomonas aeruginosa NMP/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUI M I C A Y FARMACIA	PROCEDI MI ENTO NORMALI ZADO DE OPERACI ÓN	CODI GO: _____
	Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGI NA: __ DE __

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUI M I CA Y FARMACIA	PROCEDI MI ENTO NORMALI ZADO DE OPERACI ÓN Determinación de Pseudomonas aeruginosa en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODI GO: _____ PÁGI NA: __ DE __
---	---	-------------------------------------

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR I SO/I EC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA SP. EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de Salmonella Sp, mediante el procedimiento de fermentación en tubos múltiple, es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar y aguas residuales.

3.0 Definiciones:

3.1 Salmonella Sp

Género bacteriano móvil, gran negativo y con forma de bastón.

3.2 Número Más Probable (NMP)

Es el cálculo de la densidad probable de bacterias coliformes basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La precisión de cada prueba depende del número de tubos utilizados. Tres series de dilución son necesarias para la obtención del código de NMP. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de hacer las porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP podrá resultar mayor o menor que el número real de densidad bacteriana. La densidad bacteriana se obtiene a través de la fórmula facilitada o a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor determinado y se expresa como NMP de coliformes/100 ml.

Abreviaciones:

- Numero Más probable (NMP)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

4.0 Resumen del método:

El método consta de dos etapas: prueba presuntiva y confirmativa.

La presuntiva consiste en colocar volúmenes determinados de muestras de agua en una serie en una serie de tubos conteniendo agua peptonada y luego son incubados a 35 ó 37 ± 0.5 °C durante 24-48 horas. La prueba confirmativa consiste en transferir un inóculo de cada tubo positivo de la prueba presuntiva, a tubos conteniendo caldo Rappaport e incubados posteriormente a 42 ± 0.5 °C durante 24-horas. Extender sobre una superficie seca de agar verde brillante y agar SS a la cual se le debe agregar 1.0 ml de solución de novobiocina al 4% por litro de medio. Incubar a 35 °C durante toda la noche. Se deben seleccionar las colonias incoloras o rosadas, translucidas o ligeramente opacas en el agar SS y transplantar a agar nutritivo en plano inclinado y a tubos que contengan caldo de urea. Incubar durante una noche a 35 °C. Del agar nutritivo transplantar los cultivos urea-negativo a agar de TSI y LIA Incubarlos a 35 °C durante 24 horas.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Estos medios no están disponibles en forma deshidratada y se requiere de los ingredientes básicos para su preparación

- 6.1 Agua peptonada amortiguadora (Buffer) 1%
- 6.2 Caldo Rappator vassiliadis
- 6.3 Agar verde brillante
- 6.4 Agar SS
- 6.5 Agar hierro tres azucres (TSI)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 6.6 Agar hierro lisisna (LIA)
- 6.7 Agar nutritivo
- 6.8 Solución acuosa de novobiocina al 4%
- 6.9 Antisuero polivalente O y H
- 6.10 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C .

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121°C .

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121°C , un volumen de 90 ± 2 ml.

- 6.9.1 Tíosulfato de sodio

Disolver 3 g de tíosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

6.9.2 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Prueba presuntiva

7.1.1 Prepara una serie de cinco tubos conteniendo 10 ml de agua peptonada amortiguadora. Colocarlos en una gradilla y codificar los tubos anotando el número asignado a la muestra, volumen (y/o dilución) a inocular y fecha.

7.1.2 Si las muestras están muy contaminadas se procede a realizar las diluciones respectivas, identificando y codificando los frascos de agua de dilución.

7.1.3 Las muestras de agua deben agitarse vigorosamente unas 3 veces antes de ser analizadas, para asegurar una buena homogeneización.

7.1.4 En caso de realizar diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original.

7.1.5 Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra original. Continuar con éste proceso dependiendo del grado de contaminación de la muestra.

7.1.6 Ordenar los frasco conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución).

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 7.1.7 Agitar vigorosamente por unas 3 veces el frasco con la última dilución efectuada y con una pipeta estéril, inocular 1 ml de la dilución en cada uno de los tubos con agua peptonada de concentración simple correspondiente a dicha dilución.
- 7.1.8 Proceder de la misma forma inoculando de la muestra más diluida a la más concentrada, utilizando la misma pipeta.
- 7.1.9 Inocular también 1 ml de la muestra original en cinco tubos con agua peptonada de concentración simple y 10 ml en cinco tubos con agua peptonada de concentración doble.
- 7.1.10 Incubar los tubos por 24 - 48 horas de 35 -37 °C. Examinar los tubos bajo luz ultra violeta en un cuarto oscuro. La producción de un pigmento verde fluorescente constituye una prueba presuntiva positiva.
- 7.2 Prueba confirmativa
 - 7.2.1 De los tubos con resultado positivo se toma 0.1 ml del crecimiento, se inocula en caldo Rappaport .
 - 7.2.2 Incubar los tubos inoculados a 42 ± 2 °C por toda la noche.
 - 7.2.3 Extender sobre una superficie seca de agar verde brillante y agar SS a la cual se le debe agregar 1.0 ml de solución de novobiocina al 4% por litro de medio.
 - 7.2.4 Incubar a 35 °C durante toda la noche.
 - 7.2.5 Se deben seleccionar las colonias incoloras o rosadas, translucidas o ligeramente opacas en el agar SS y transplantar a agar nutritivo en plano inclinado y a tubos que contengan caldo de urea.
 - 7.2.6 Incubar durante una noche a 35 °C

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

7.2.7 Del agar nutritivo transplantar los cultivos urea-negativo a agar de TSI y LIA

7.2.8 Incubarlos a 35 °C durante 24 horas.

8.0 Análisis de datos.

8.1 Resultados

8.1.1 Los cultivos que presenten una base amarilla o amarilla con gas en agar TSI ,H₂S positivas, rebordes sin alteración o rojo y en agar LIA base y borde violeta, con formación de H₂S, deben someterse a prueba de Antisuero O y H.

8.1.2 Calcular el número de UFC/ml multiplicando el número de colonias en la placa por el factor de dilución.

8.2 Registro de datos

8.2.1 En el siguiente cuadro se esquematiza una hoja de registro de datos para la prueba de Salmonella , fase presuntiva y confirmativa.

8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora de análisis.

8.2.3 Reportar los resultados de la prueba presuntiva de 24 y 48 horas y prueba confirmativa de 24 y 48 horas para cada muestra.

8.2.4 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.

8.2.5 Los rangos de dilución a emplearse se dan de acuerdo al tipo de muestra analizada

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Determinación de Salmonella Sp.

Prueba presuntiva: Agua peptonada

Prueba confirmativa: caldo Rappaport

FECHA Y HORA DE MUESTREO	FECHA Y HORA DE ANALISIS	PUNTO DE MUESTREO	PRUEBA PRESUNTIVA Y CONFIRMATIVA 24-48 HORAS (DILUCIONES EN ML)					UFC/ ML	
			10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
									24 hrs presun.
									48 hrs presun.
									24 hrs confirm.
									48 hrs confirm.
									24 hrs presun.
									48 hrs presun.
									24 hrs confirm.
									48 hrs confirm.
									24 hrs presun.
									48 hrs presun.
									24 hrs confirm.
									48 hrs confirm.

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 En el siguiente cuadro esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes totales en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Salmonella UFC/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Salmonella Sp. en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE VIBRIÓN CHOLERA E EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralia Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

1.0 Objetivo

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de Vibrión cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP).

2.0 Alcance y aplicación

La determinación de Vibrión cholerae, mediante el procedimiento de fermentación en tubos múltiple, es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar y aguas residuales. el límite de confianza es de 95 % cuando se utilizan diversas combinaciones de resultados positivos de series de 10, 1 y 0.1 mL en series de 5 tubos. Los resultados de este método se reportan en Números Más Probable (NMP) de microorganismos existentes.

3.0 Definiciones:

3.1 Vibrio Cholerae.

Los miembros del género Vibrio son bacilos Gram negativos curvos o rectos en forma de coma anaeróbios facultativos, no motiles, que no forman esporas y móviles. Los vibriones pueden requerir para crecer o estimular su crecimiento de la adición de sal. Todos los miembros del género Vibrio, con excepción del V. Metschnikovii y V. Gazogenes, son catalas positivos y reducen los nitratos a nitritos. El cual es causante de producir la enfermedad del cólera.

3.2 Número Más Probable (NMP)

Es el cálculo de la densidad probable de bacterias coliformes basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La precisión de cada prueba depende del número de tubos utilizados. Tres series de dilución son necesarias para la obtención del código de NMP. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

hacer las porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP podrá resultar mayor o menor que el número real de densidad bacteriana. La densidad bacteriana se obtiene a través de la fórmula facilitada o a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor determinado y se expresa como NMP de coliformes/100 ml.

Abreviaciones:

- Numero Más probable (NMP)
- Agua peptonada alcalina (APA)
- Agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS)
- Agar tristoná-sal (TINI)

4.0 Resumen del método:

Preparar una serie de cinco tubos conteniendo 10 ml de agua peptonada alcalina. Colocarlos en una gradilla y codificar los tubos anotando el número asignado a la muestra, volumen (y/o dilución) a inocular y fecha. Si las muestras están muy contaminadas se procede a realizar las diluciones respectivas, identificando y codificando los frascos de agua de dilución. Las muestras de agua deben agitarse vigorosamente unas 25 veces antes de ser analizadas, para asegurar una buena homogeneización. En caso de realizar diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original. Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra original. Continuar con este proceso dependiendo del grado de contaminación de las muestras hasta la dilución 10^{-5} . Ordenar los frascos conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución). Agitar vigorosamente por unas 25 veces el frasco con la última dilución efectuada y con una pipeta estéril, inocular 1 ml de la dilución en cada uno de los tubos con APA de concentración simple correspondiente

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

a dicha dilución. Proceder de la misma forma inoculando de la muestra más diluida a la más concentrada, utilizando la misma pipeta. Inocular también 1 ml de la muestra original en cinco tubos con APA de concentración simple. Incubar los tubos por 6 a 8 horas de 42 °C. De los tubos con resultado positivo se toma de la superficie del crecimiento, se inocula en agar TCBS. Incubar los tubos inoculados a 35 ± 2 °C por un periodo de 24 a 30 horas. De las placas de TCBS aislar en Agar TINÍ de 3 a 5 colonias sacarosa-positiva (o negativa). Incubar a 35 °C durante 18 a 24 horas. Realizar prueba de oxidasa sobre papel filtrito con los cultivos que se muestren puros en TINÍ, usando el reactivo tetrametil-p-fenilendiamina. El V cholerae es oxidasa positivo y la reacción se caracteriza por la aparición de un intenso color rojo en el punto de contacto del cultivo con el reactivo. Los cultivos oxidasa positivos se trasladan a agar nutritivo en plano inclinado, incubarse a 35 °C por 18 a 24 horas y someterlo a prueba de antisuero polivalente.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Estos medios no están disponibles en forma deshidratada y se requiere de los ingredientes básicos para su preparación

- 6.1 Agua peptonada alcalina (APA)
- 6.2 Agar tío sulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS)
- 6.3 Agar tristona-sal (TINI)
- 6.4 Agar nutritivo
- 6.5 Tetrametil-p-fenilendiamina
- 6.6 Suero polivalente anti-V. cholerae

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

6.7 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C .

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121°C .

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121°C , un volumen de 90 ± 2 ml.

6.8 Tíosulfato de sodio

Disolver 3 g de tíosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.9 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

7.0 Procedimiento

7.1 Prueba presuntiva

7.1.1 Prepara una serie de cinco tubos conteniendo 10 ml de agua peptonada alcalina. Colocarlos en una gradilla y codificar los tubos anotando el número asignado a la muestra, volumen (y/o dilución) a inocular y fecha.

7.1.2 Si las muestras están muy contaminadas se procede a realizar las diluciones respectivas, identificando y codificando los frascos de agua de dilución.

7.1.3 Las muestras de agua deben agitarse vigorosamente unas 3 veces antes de ser analizadas, para asegurar una buena homogeneización.

7.1.4 En caso de realizar diluciones, transferir con una pipeta estéril 10 ml de la muestra original a un frasco con 90 ± 2 ml de agua de dilución. De esta manera se tiene la primera dilución (10^{-1}), siendo que 1 ml de la muestra diluida corresponde a 0.1 ml de la muestra original.

7.1.5 Homogeneizar el frasco que contiene la dilución (10^{-1}) y con una nueva pipeta estéril transferir 10 ml a un nuevo frasco de dilución, teniendo así la segunda dilución (10^{-2}), siendo que 1 ml de la misma corresponde a 0.01 ml de la muestra original. Continuar con éste proceso dependiendo del grado de contaminación de la muestras hasta la dilución 10^{-5} .

7.1.6 Ordenar los frasco conteniendo las diluciones, en secuencia decreciente de concentración (de mayor a menor dilución).

7.1.7 Agitar vigorosamente por unas 25 veces el frasco con la última dilución efectuada y con una pipeta estéril, inocular 1 ml de la dilución en cada uno de los tubos con APA de concentración simple correspondiente a dicha dilución.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

- 7.1.8 Proceder de la misma forma inoculando de la muestra más diluida a la más concentrada, utilizando la misma pipeta.
- 7.1.9 Inocular también 1 ml de la muestra original en cinco tubos con APA de concentración simple.
- 7.1.10 Incubar los tubos por 6 a 8 horas de 42 °C.
- 7.2 Prueba confirmativa
- 7.2.1 De los tubos con resultado positivo se toma de la superficie del crecimiento, se inocular en agar TCBS.
- 7.2.2 Incubar los tubos inoculados a 35 ± 2 °C por un periodo de 24 a 30 horas.
- 7.2.3 De las placas de TCBS aislar en Agar TIN I de 3 a 5 colonias sacarosa-positiva (o negativa).
- 7.2.4 Incubar a 35 °C durante 18 a 24 horas.
- 7.2.5 Realizar prueba de oxidasa sobre papel filtro con los cultivos que se muestren puros en TIN I, usando el reactivo tetrametil-p-fenilendiamina. El V cholerae es oxidasa positivo y la reacción se caracteriza por la aparición de un intenso color rojo en el punto de contacto del cultivo con el reactivo.
- 7.2.6 Los cultivos oxidasa positivos se trasladan a agar nutritivo en plano inclinado, incubarse a 35 °C por 18 a 24 horas y someterlo a prueba de antisuero polivalente.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

8.0 Análisis de datos.

8.1 Resultados

8.1.1 Los resultados se deberán informar de la siguiente manera:

- ❖ $< 10^3$ / g cuando no se detecta V. Cholerae en ninguna dilución
- ❖ 10^4 a 10^5 / g cuando se detecte en dichas diluciones.
- ❖ Mayor o igual a 10^5 / g cuando se detecte en todas las diluciones investigadas.

8.2 Registro de datos

8.2.1 El siguiente cuadro esquematiza una hoja de registro de datos para la prueba de Pseudomonas aeruginosa, fase presuntiva y confirmativa.

8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora de análisis.

8.2.3 Reportar los resultados de la prueba presuntiva de 24 y 48 horas y prueba confirmativa de 24 y 48 horas para cada muestra.

8.2.4 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.

8.2.5 Los rangos de dilución a emplearse se dan de acuerdo al tipo de muestra analizada

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Determinación de Vibrio cholerae por el método de tubos múltiples

Prueba presuntiva: Agua peptonada alcalina

Prueba confirmativa: Agar TCBS

FECHA Y HORA DE MUESTREO	FECHA Y HORA DE ANALISIS	PUNTO DE MUESTREO	PRUEBA PRESUNTIVA Y CONFIRMATIVA 24-48 HORAS (DILUCIONES EN ML)					VIBRIO CHOLERAЕ /G
			10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.
								24 hrs presun.
								48 hrs presun.
								24 hrs confirm.
								48 hrs confirm.

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 El siguiente cuadro esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes totales en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	Vibrio cholerae/g

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Vibrio cholerae en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	--	-----------------------------------

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE AGUAS**



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	
PARA LA DETERMINACIÓN DE ESCHERICHIA COLI EN AGUA POR EL MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)	
Elaborado por :	Ricardo Ernesto Hernández
CODIGO:	
VALIDO PARA:	
VIGENTE A PARTIR DE:	
VIGENTE HASTA:	
DOCUMENTOS RELACIONADOS:	
AUTORIZADO POR:	

<u>Lic. Coralía Figueroa de Murillo /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA
<u>Lic. Evelyn Sánchez de Ramos /</u> NOMBRE /CARGO DEL DEPARTAMENTO	_____ FIRMA Y FECHA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

1.0 Objetivos

Establecer un procedimiento de operación para la determinación de Escherichia coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP).

2.0 Alcance y aplicación

Las pruebas para la determinación de E. Coli, es aplicable para evaluar la calidad del agua potable, agua purificada de uso farmacéutico no estéril, agua de pozo, agua de río, agua de lago, agua de mar y aguas residuales. La E. Coli es un miembro de la flora fecal del hombre y de los animales de sangre caliente. Su ocurrencia es considerada como un indicador específico de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos entéricos.

3.0 Definiciones:

3.1 Escherichia coli

En este método E. Coli se define como bacteria coliforme que posee la enzima β -d glucuronidasa y es capaz de romper el sustrato 4-metil umbeliferil glucorónico (MUG) con la correspondiente producción de fluorescencia cuando crece en los medios EC-MUG a 44.5 ± 0.2 °C en 24 ± 2 horas o menos; y en agar nutritivo con MUG a 35 ± 0.5 °C en 4 horas.

3.2 Número Más Probable (NMP)

Es el cálculo de la densidad probable de bacterias coliformes basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La precisión de cada prueba depende de el número de tubos utilizados. Tres series de dilución son necesarias para la obtención del código de NMP. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de hacer las porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

podrá resultar mayor o menor que el número real de densidad bacteriana. La densidad bacteriana se obtiene a través de la fórmula facilitada o a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor determinado y se expresa como NMP de coliformes/100 ml.

Abreviaciones:

- Numero Más probable (NMP)
- Metil umbeliferil glucorónido (MUG)
- Escherichia coli (E.coli)
- Caldo Lauril Triptosa (CLT)

4.0 Resumen del método:

La determinación de E. Coli en agua se aplica como una prueba confirmativa. Al utilizar el método de tubos múltiples a partir de los cultivos presuntivos positivos de coliformes totales en caldo lauril triptosa, alícuotas del caldo son inoculadas en tubos conteniendo medio EC-MUG e incubadas durante 24 horas luego de las cuales los tubos se someten a la acción de una luz ultravioleta de 366 nm, con un bulbo de 6 vatios en un lugar oscuro. En caso de utilizar el método de filtración por membrana, las colonias típicas de coliformes (cinco colonias mínimas) de las placas del medio m-Endo, son inoculadas en tubos conteniendo medio EC-MUG y se procede como en el caso anterior. La fluorescencia en los tubos se considera como reacción positiva de E. Coli y su densidad se calcula de igual forma que en la metodología de coliformes totales y fecales. Para cada lote de medios y análisis, se deben realizar controles de calidad inoculando agua estéril con una cepa de E. Coli MUG-positivo y una muestra MUG- negativa.

5.0 Responsabilidades.

Es responsabilidad de la persona asignada y capacitada la correcta aplicación de este procedimiento.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

6.0 Medios de cultivos y reactivos

Se recomienda el uso de medios deshidratados o preparados comercialmente debido al control de calidad. El medio deshidratado debe almacenarse en un lugar fresco y seco. Los medios aglutinados o decolorados deben descartarse, así mismo, el medio debe ser descartado en la fecha de expiración indicada por el fabricante.

El medio estéril en los tubos debe examinarse para asegurar que los tubos de Durham no tengan burbujas de aire y estén al menos la mitad a dos tercios cubiertos después de agregar la muestra.

6.1 Caldo E.C-MUG

Disolver 37 g de medio E.C. en un litro de agua destilada. Distribuir 10 ml en tubos de ensayos provisto con tubos Durham invertidos (opcional). Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

6.2 Agua de dilución

Para el agua de dilución, es necesaria la preparación de soluciones Stock A y B.

Solución Stock A: Disolver 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el PH a 7.2 ± 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH 1N), y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Solución Stock B: Disolver 81.1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada. Auto clavar por 15 minutos a 121 °C.

Agua de dilución: Agregar 1.25 ml de la solución stock A de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 5 ml la solución stock B de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades que aseguren, luego de llevarlo al autoclave por 15 minutos a 121 °C, un volumen de 90 ± 2 ml.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

6.3 Tiosulfato de sodio

Disolver 3 g de tiosulfato de sodio en 100 ml de agua destilada para obtener una concentración del 3% para agua clorada, colocar en los frascos de muestreo 0.1 ml de esta solución (antes de su esterilización), por cada 100 ml de capacidad del frasco.

6.4 Solución de alcohol yodado

Disolver 2 g de yodo y 2.5 g de yoduro de potasio en 100 ml de alcohol al 50% hasta disolución completa del yodo. Agregar 3 ml de esta solución en 100 ml de alcohol comercial.

7.0 Procedimiento

7.1 Prepara una serie de cinco tubos conteniendo 10 ml de medio EC-MUG

7.1.1 Entibiar los tubos de EC-MUG en baño de maría durante 30 minutos a la temperatura de $44.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.1.2 Codificar cada tubo anotando el número asignado a la muestra, volumen inoculado y fecha, correspondiente a cada tubo de caldo lauril triptosa positivo en la prueba presuntiva de coliformes totales o a cada colonia típica en las placas de m-Endo.

7.1.3 En el caso del método de tubos múltiples, agitar e inclinar el tubo de caldo lauril triptosa para evitar tocar la película superficial y con un asa de siembra estéril, transferir unas asadas a los tubos con medio EC-MUG.

7.1.4 En el caso del método de filtración de membrana, tomar con el asa de siembra una porción de las colonias típicas (cinco colonias mínimas) y sembrar en los tubos con medio EC-MUG.

7.1.5 Incubar los tubos inoculados a $44.5 \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño maría por 24 ± 0.2 horas.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CÓDIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

- 7.1.6 Retirar los tubos del baño maría luego del periodo de incubación. Observar la presencia de turbiedad, fermentación y gas como tubos positivos y someterlos bajo la acción de la luz ultravioleta en un lugar oscuro para la observación de fluorescencia.
- 7.1.7 Se procede a la lectura considerando positiva la emisión de fluorescencia.
- 7.1.8 Anotar los resultados y calcular el NMP a partir de los datos obtenidos.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 1. NMP y límites de confianza de 95% cuando se usan diversas combinaciones de resultados positivos de series de 10, 1 y 0.1 ml en series de 5 tubos

Número de tubos con reacción positiva			Índice de NMP/100 ml	Límites de confianza de 95%	
10 ml	1 ml	0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	<2	-	-
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	25
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	410
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	0	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1300
5	5	2	500	200	2000
5	5	3	900	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	4	5	>1600	---	---

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.0 Análisis de datos.

8.1 Resultados

8.1.1 El cálculo de la densidad probable de bacterias E. Coli está basado en la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos en cada dilución. La densidad de E. Coli se expresa como NMP de E. Coli por 100 ml y se obtiene a través de tablas en las que se presenta el límite de confianza de 95% para cada valor de NMP determinado para ello se necesitan tres diluciones para la obtención del código del NMP, ver el cuadro 1.

8.1.2 Aunque los códigos presentados en el cuadro anterior se refieran específicamente a la combinación de resultados positivos obtenidos cuando son inoculados volúmenes de 10 ml, 1 ml y 0.1 ml de muestra, éstos pueden ser usados para volúmenes mayores o menores de siembra ajustando con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de NMP en la tabla} \times \frac{10}{\text{Vol. dilución inicial de la muestra seleccionada}} = \text{NMP} / 100 \text{ ml}$$

8.1.3 Cuando más de tres diluciones decimales son inoculadas, se debe determinar las tres diluciones significativas para el código. Estas diluciones se pueden determinar de acuerdo a las siguientes reglas:

8.1.3.1 Como primer número del código se seleccionara la mayor dilución en la que todos los tubos resultaran positivos y las dos diluciones subsiguientes para completar el código. (ver cuadro 2 prueba 1 y 2)

8.1.3.2 Si menos de tres diluciones tienen resultados positivos, se seleccionaran las tres mayores diluciones que incluyen los tubos positivos para completar el código. (ver cuadro 2 prueba 3)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

- 8.1.3.3 Si resultaran tubos positivos en diluciones mayores que en aquellas seleccionadas para el código, los resultados positivos se desplazan hacia las diluciones seleccionadas a fin de incrementar los tubos positivos en la última dilución seleccionada. (ver cuadro 2 prueba 4)
- 8.1.3.4 Si resultaran tubos negativos en volúmenes mayores de muestra que los escogidos para el código, el primer número del código será el de la mayor dilución en la cual todos los tubos resultaran positivos, con las siguientes diluciones más altas para completar el código. (ver cuadro 2 prueba 5)
- 8.1.3.5 Si todos los tubos resultaran positivos, seleccionar para el código, aquellas tres diluciones mayores. (ver cuadro 2 prueba 6)
- 8.1.3.6 Si todos los tubos resultaran negativos, seleccionar para el código aquellas tres diluciones menores. (ver cuadro 2 prueba 7)
- 8.1.3.7 Si no resultaran tubos positivos en una dilución intermedia, seleccionar para el código la serie de menor dilución con tubos positivos y otra de mayor dilución con tubos positivos. (ver cuadro 2 prueba 8)
- 8.1.3.8 Si solamente la dilución intermedia resultara positiva, escoger para el código la serie de menor dilución y otra de mayor dilución para el código. (ver cuadro 2 prueba 9)

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Cuadro 2. Valores para la selección del código

Prueba	Tubos positivos/ml y volumen de muestra					Código
	10	1	0.1	0.01	0.001	
1	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	0	0	5-2-0
2	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	5-2-1
3		<u>3</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	3-1-0
4	5	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	5-3-2
5	4	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	5-4-0
6		5	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	5-5-5
7		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0-0-0
8		<u>0</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	0	4-0-1
9		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0-1-0

8.2 Registro de datos

8.2.1 En el siguiente cuadro se esquematiza una hoja de registro de datos para la prueba de E. Coli, para el método de tubos múltiples, y el Anexo 20 para el método de filtración de membrana.

8.2.2 En el registro de datos se deben considerar los siguientes aspectos: Número de muestra, punto de muestreo, fecha y hora de muestreo, fecha y hora de análisis.

8.2.3 Indicar los medios de cultivo utilizados para cada prueba.

8.2.4 Los rangos de dilución a emplearse se dan de acuerdo al tipo de muestra analizada

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Determinación de E.coli método tubos múltiples

Prueba presuntiva: Caldo lauril triptosa

Prueba de diferenciación: Medio EC-MUG

Muestra #	Fecha , hr muestreo	Fecha , hr análisis	Punto de Muestreo	Medio EC-MUG 24 hr a 44.5 ± 0.2 °C (Diluciones en ml)					E.coli NMP/ 100ml
				10 ml	1 ml	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	

Analista: _____

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

8.3 Reporte de resultados

8.3.1 En el siguiente cuadro se esquematiza una hoja de reporte de resultados para la prueba de coliformes totales en agua.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Página N° ____ de ____

Resultado de análisis bacteriológicos de muestras de agua

Fecha : _____

N° de muestra	Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	Punto de muestreo	E.coli NMP/100 ml

Observaciones: _____

Analista

Jefe de laboratorio

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	CODIGO: _____ PÁGINA: __ DE __
--------------------------------------	---	-----------------------------------

Registro de cambios / Histórico

Edición anterior	Descripción del cambio	Edición nueva	Fecha de modificación	Responsable del cambio
Nueva	----	-----	-----	-----

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN	CODIGO: _____
	Determinación de Escherichia Coli en agua por el método de tubos múltiples (NMP)	PÁGINA: __ DE __

Referencias

- 1.0 American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de aguas y aguas Residuales. 17 va Ed. (Publicación en Español). 1992.
- 2.0 American Public Health Association et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. 1995-
- 3.0 CESPI S-PAHO. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la determinación de Coliformes Totales por el Método de Tubos Múltiples (NMP) en Agua Potable. 1999.
- 4.0 CEPI S. Métodos Simplificados de Análisis Microbiológicos de aguas residuales.1983
- 5.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración. 1999.
- 6.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable 1997.
- 7.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua Envasada. 1998.
- 8.0 CONACYT. Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Agua. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 2000.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Solo un 5% de los laboratorios acreditados por el CONACYT, realizan análisis microbiológicos de aguas, el alcance de dicha acreditación es de ocho pruebas.

2. Dentro de los Procedimientos Estándar de Operación establecidos para el análisis microbiológicos de aguas se establecen trece los cuales son:
 - ❖ Determinación de coliformes totales por el método de tubos múltiples (NMP)
 - ❖ Determinación de coliformes totales por el método de filtro de membrana (FM)
 - ❖ Determinación de coliformes totales por el método de recuento en placa
 - ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
 - ❖ Determinación de coliformes fecales por el método de filtro de membrana (FM)
 - ❖ Determinación de Estreptococos fecales por el método de tubos múltiples (NMP)
 - ❖ Determinación de Estreptococos fecales por el método de filtro de membrana (FM)

- ❖ Determinación de *Clostridium perfringens* por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de *Clostridium perfringens* por el método de filtro de membrana (FM)
- ❖ Determinación de *Pseudomonas aeruginosa* por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de *Salmonella* Sp. por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de *Vibrio cholerae* por el método de tubos múltiples (NMP)
- ❖ Determinación de *Escherichia Coli* por el método de tubos múltiples (NMP)

3. La acreditación es un proceso que puede tardar muchos años y que involucra una gran inversión económica, siendo estas las dos limitantes más significativas. Sin embargo, las ganancias que se logran al alcanzar la acreditación hacen que el esfuerzo valga la pena, puesto que a la larga se recupera el tiempo y la inversión por la sistematización, el respaldo y credibilidad que la acreditación otorga.

4. La acreditación de laboratorios requiere la intervención de personal especializado en sistemas de calidad y en aspectos técnicos, tanto por parte del organismo acreditador, como el laboratorio que desea acreditarse. Esto implica que los auditores y los encargados del departamento de garantía de calidad del laboratorio,

además de poseer un grado académico que corresponda a los conocimientos técnicos requeridos.

5. El alcance de la acreditación será definido por el laboratorio desde que se hace la solicitud y se refiere a uno o más tipos de ensayos en los que el CONACYT le dará su reconocimiento formal. En cuanto al campo de aplicación de la norma se refiere a que la acreditación puede ser solicitada por cualquier laboratorio oficial o privado que se dedique a la realización de pruebas, ensayos, análisis y mediciones científicas, investigativas, industriales o de cualquier otra índole.
6. Para que un laboratorio se acredite es importante que todo el personal esté convencido de la necesidad de ser reconocido formalmente por el ente acreditador, pero es imperante el apoyo total e incondicional de la máxima autoridad del laboratorio. Después de lograrlo, el laboratorio debe compenetrarse en la importancia de la norma y prepararse basándose en los requerimientos que esta exige.
7. Las Normas Salvadoreñas tienen por objeto especificar los requisitos generales que determinan la competencia técnica de los laboratorios de ensayo y calibración y puede ser utilizado por:

- ❖ Laboratorios que se dedican a calibración o realizar ensayos.
- ❖ Organismos acreditados
- ❖ Demás entidades a las que les concierne la competencia técnica de los laboratorios.

8. Se establece una guía en la cual se desarrollan los pasos y requisitos para la acreditación de un laboratorio de análisis microbiológico de aguas. Dichos requisitos se orientan básicamente a cinco aspectos los cuales son:

- ❖ Documentación
- ❖ Procedimientos
- ❖ Registros
- ❖ Instalaciones
- ❖ Personal

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

- Utilizar la presente investigación como punto de partida para iniciar un proceso de acreditación, especialmente el laboratorio de análisis microbiológico de aguas, debido a que el trabajo proporciona información importante a utilizar para que un laboratorio de análisis microbiológico de aguas pueda acreditarse.
- Utilizar los Procedimientos Normalizados de operación, necesarios para la acreditación del laboratorio de análisis microbiológico de aguas.
- El laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador debe hacer la validación de los métodos de análisis microbiológicos de aguas presentados en este trabajo.
- La acreditación es una necesidad y una obligación es por eso que los laboratorios deben destinar parte de sus ingresos a un programa de acreditación. Inicialmente se podría considerar como un gasto, pero a mediano y largo plazo es una gran inversión ya que el laboratorio será más organizado, planificado, y eficiente. Por lo tanto recuperará su inversión y mejorara sus ingresos.

- La comunicación es sumamente importante en cualquier organización y en este caso no es la excepción. Partiendo de este punto, los laboratorios que deseen acreditarse deben establecer adecuadas líneas de comunicación con sus empleados para que estos tomen conciencia de la importancia de la acreditación. Solo con trabajo en equipo dentro del laboratorio es posible llegar a conseguir el reconocimiento formal dado por la acreditación.

- Todo el personal empleado debe recibir un entrenamiento regular en las tareas correspondientes para su correcto desarrollo

- La vigilancia en el cumplimiento de la acreditación de un laboratorio de análisis corresponde al CONACYT, en sus respectivos ámbitos de competencia.

- El uso y aprovechamiento sustentable del agua depende, además de las prácticas de manejo, de múltiples factores entre los que destacan: la educación o cultura de la sociedad con relación al agua; las formas de organización, características y la eficacia de las instituciones que atienden los asuntos hídricos, así como las

características, modalidades y alcances de las políticas públicas relacionadas con el agua; la participación ordenada y organizada de los usuarios y de la sociedad en su cuidado y preservación; los sistemas de información, administración y planificación que se ponen en práctica para ordenar sus usos; los recursos financieros que se destinan a su aprovechamiento, manejo y la calidad de los recursos humanos que participan en estas actividades y es en la educación en donde la Universidad de El Salvador puede colaborar.

BIBLIOGRAFIA

1. American Public Health Association et al. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales. 17va ED. (Publicación en español). 1992.
2. Alvarado Artiga Sandra Delia. Manual de Calidad Físico-Químicos para ser utilizado en el laboratorio de aguas de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, 1999.
3. Batres Portillo Cintya Carolina. Medidas de Aseguramiento de la calidad microbiológica en la fabricación de Inyectables en la industria farmacéutica nacional. UES 2001.
4. Caballero. Pedro. Métodos Estándar para el Examen de aguas y aguas de Desecho. 11a Edición, Edición Interamericana S.A. México D.F. 1963.

5. Calderón, Gloria Ruth. Organización del Recurso Laboratorio que realizan análisis de calidad del agua para consumo humano, 1992.

6. CONACYT. Norma Salvadoreña agua. Agua potable (NSO 13.07.01:99) 1999.

7. EPA. Manual para la certificación de Laboratorios de Análisis de Agua potable. EPA 815-B-97-001. 1997.

8. Guzmán Julián, Oscar David. Propuesta de un Sistema de Acreditación para un laboratorio de Evaluación Microbiológica de producción farmacéutica. UES. 2000.

9. Norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97 Agua. Agua Potable. 1ra edición, editada por el Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, 1998, El Salvador.

10. Norma Salvadoreña NSO 13.07.02:98 Agua. Agua envasada. 1ra edición, editada por el Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, 2000, El Salvador.

11. Norma Salvadoreña NSR ISO/IEC 17025:1999 Requisitos Generales para la competencia de laboratorios de prueba y calibración 2° edición editada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, 1999, El Salvador.

12. Anteproyecto de Norma Salvadoreña NSO 13.07.03:00 Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. 1ra edición, editada

por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, 2002, El Salvador.

13. OMS. Guías para la calidad del agua potable. Volúmenes 1,2 y 3 Recomendaciones OMS. 1995.
14. Casemore, D.P. (1991). La epidemiología de la criptosporidiosis humana y la ruta de agua de la infección. Ciencia y tecnología de agua.

Internet:

15. <http://www.fortunecity.es/expertos/profesor/171/#> El AGUA

ANEXOS

ANEXO N° 1

Norma Salvadoreña.

Título:	Agua. Agua Potable.		
Código:	NSO 13.07.01:97	ICS:	13.060.20
Tipo:	Norma Salvadoreña Obligatoria	Estado:	Norma Oficial Vigente
Acuerdo:	414	Comité:	Comité Técnico de Normalización de Agua
N° Diario Oficial:	148 Tomo: 340	Fecha Diario Oficial:	13 de Agosto de 1998
Sustituida por:	-	Sustituye a:	NSO 13.07.01:98 - Agua. Agua Potable
Fecha de sustitución:		Documento completo:	Disponible
Referencias internacionales y relación con otras normas:	Esta norma es una adaptación de la Guía para la Calidad del Agua Potable. OMS Volumen 1, 2 y 3		
Resumen:	Esta norma tiene por objeto el establecimiento de características con sus valores recomendados, procedimientos, registros, frecuencia mínima de muestreo y métodos estandarizados a ser usados para aguas municipales o de servicio público, en la República de		

ANEXO N° 2

Norma Salvadoreña.

Título:	Agua. Agua Envasada.		
Código:	NSO 13.07.02:98	ICS:	13.060.20
Tipo:	Norma Salvadoreña Obligatoria	Estado:	Norma Oficial Vigente
Acuerdo:	445	Comité:	Comité Técnico de Normalización de Agua - Subcomité de Agua Envasada
N° Diario Oficial:	29 Tomo: 346	Fecha Diario Oficial:	10 de Febrero de 2000
Sustituida por:	-	Sustituye a:	-
Fecha de sustitución:		Documento completo:	Disponible
Referencias internacionales y relación con otras normas:	Para la elaboración de esta norma se tomaron como referencia: NSO 13.07.01:98 Agua. Agua Potable y la Norma de la Asociación Internacional de Embotelladores de Agua (IBWA)		
Resumen:	Esta norma tiene por objeto establecer los requisitos físicos, químicos, microbiológicos, radiológicos y de control de las buenas prácticas de manufactura que debe cumplir el agua envasada destinada para el consumo humano. Esta norma se aplicará al agua e		

ANEXO N° 3

Norma Salvadoreña.

Título:	Aguas Residuales Descargadas a un cuerpo Receptor		
Código:	NSO 13.07.03:00	ICS:	13.060.20
Tipo:	Norma Salvadoreña Obligatoria	Estado:	Norma Oficial Anteproyecto de norma
Acuerdo:	445	Comité:	Comité Técnico de Normalización de Agua - Subcomité de Agua Envasada
N° Diario Oficial:		Fecha Diario Oficial:	
Sustituida por:	-	Sustituye a:	-
Fecha de sustitución:		Documento completo:	Disponible
Referencias internacionales y relación con otras normas:	Propuesta de norma de las Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor. El Salvador, 1996. MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL		
Resumen:	Esta norma tiene por objeto establecer los requisitos físicos, químicos, microbiológicos, radiológicos que debe cumplir el agua residual descargada a un cuerpo receptor. Para proteger y rescatarlos		

ANEXO 4

GUÍA DE ACREDITACIÓN DE

UN LABORATORIO DE

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

DE AGUAS

1.0 Guía para la evaluación y acreditación de laboratorios de análisis microbiológico de aguas

RESUMEN:

Esta guía describe todas las actividades a realizar para evaluar el cumplimiento de los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayos que desean ser acreditados por el CONACYT

1.1. OBJETIVO

Describir las acciones establecidas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para evaluar la conformidad de un Laboratorio de Análisis microbiológico de agua con los requisitos establecidos en las Normas y otorgar, mantener, extender, suspender o cancelar la acreditación.

1.2. ALCANCE

El alcance está limitado sólo a Laboratorios de Análisis, que cumplan con los requisitos fijados en la Norma Salvadoreña NSR vigente, o su equivalente la Norma ISO/IEC 17025 más los reglamentos y procedimientos establecidos por el CONACYT.

1.3. RESPONSABILIDADES

Las responsabilidades están descritas en el Manual de la Calidad, Cáp. 4 ítem 4.4 y en el punto 4 Descripción de esta guía.

1.4. DESCRIPCIÓN

1.4.1. SOLICITUD DE ACREDITACIÓN

1.4.1.1 El procedimiento se inicia con la presentación de la Solicitud completa y el pago del arancel correspondiente.

1.4.1.2 El Laboratorio de análisis solicitante debe entregar como documentación adjunta a la Solicitud:

- a) Manual de la Calidad del Laboratorio confeccionado en conformidad con los requerimientos fijados en la Norma NSR vigente (Norma ISO/IEC 17025)
- b) Procedimientos generales y específicos de ensayo para los que se solicita la acreditación;
- c) La conformidad por escrito del cumplimiento, con el pago de los aranceles correspondientes.

1.4.2 ANÁLISIS FORMAL DE LA DOCUMENTACIÓN

1.4.2.1 El CONACYT inicia el trámite de acreditación, con un análisis formal de la presentación, si surge del análisis que la documentación se encuentra incompleta o es inadecuada, se notifica al solicitante para que complete o modifique su presentación.

1.4.3 EVALUACIÓN

1.4.3.1 Designación del Equipo Evaluador

1.4.3.1.1 El Coordinador del departamento de Normalización, Metrología y Certificación con el acuerdo de la Gerencia Operativa selecciona del Registro de Evaluadores del CONACYT y designa el Equipo Evaluador, teniendo en cuenta que dicho equipo posea la capacidad adecuada para evaluar al Laboratorio a acreditar.

1.4.3.1.2 El Equipo Evaluador está formado por un Evaluador Coordinador y Evaluador/es Técnico/s. El número de Evaluadores Técnicos puede variar en función del alcance solicitado por el Laboratorio.

1.4.3.1.3 El Laboratorio de Ensayo que solicita la acreditación es notificado de los nombres de los integrantes del Equipo Evaluador.

1.4.3.1.4 El Laboratorio, una vez recibida la información, debe responder por escrito y en el lapso de una semana si acepta la nómina de Evaluadores. El Laboratorio puede apelar por alguno de ellos con causa fundada, en cuyo caso es reemplazado, a criterio del CONACYT.

1.4.3.2 Estudio de la documentación

1.4.3.2.1 Los Evaluadores realizan el estudio de la documentación dentro de los términos y lapsos acordados entre el Equipo Evaluador y el Coordinador del departamento de Normalización, Metrología y Certificación. A los efectos del estudio, los Evaluadores deben:

- a) Evaluar si la documentación es satisfactoria en forma y contenido;
- b) Evaluar la necesidad de documentación adicional;
- c) Evaluar si el o los ensayos bajo acreditación están expresamente individualizados;
- d) El Evaluador Coordinador consigna los hallazgos en el documento Informe Estudio de Documentación.

1.4.3.2.2 El Informe Estudio de Documentación se envía al Laboratorio. Éste debe dar respuesta al mismo en un lapso máximo de 30 días.

Cuando del estudio de la documentación surjan carencias tales que impidan la

prosecución del procedimiento de acreditación, ello será claramente indicado en el ítem conclusiones del Informe.

1.4.3.2.3 Del estudio de la documentación, puede surgir a criterio del Equipo Evaluador o del Coordinador del departamento de normalización la necesidad de realizar una visita previa al Laboratorio.

1.4.3.3 Preparación de la Visita de Evaluación

1.4.3.3.1 Una vez verificada la adecuación de la documentación se procede a planificar la

Visita de Evaluación:

El CONACYT envía al Laboratorio el Programa de Visita de Evaluación, como mínimo 48 horas antes, una vez acordada la fecha de realización de la misma. Se comunica al Laboratorio el arancel correspondiente a la Visita.

1.4.4. VISITA DE EVALUACIÓN

1.4.4.1 Reunión Inicial

La Visita de Evaluación comienza con una Reunión Inicial en la cual deben estar presentes como mínimo, por el Laboratorio, el Director Técnico y el Responsable de

la Calidad y por el CONACYT el Equipo Evaluador.

En el curso de la reunión, el Evaluador Coordinador debe:

- a) Presentar los miembros del Equipo Evaluador a la Dirección del Laboratorio;
- b) Exponer la finalidad de la visita;
- c) Definir los ensayos a presenciar;
- d) Definir el tiempo y la modalidad para la verificación de eventuales actividades fuera de la sede;
- e) Confirmar la hora y la fecha para la Reunión Final y cualquier otra reunión intermedia del Equipo Evaluador y la Dirección del Laboratorio.

1.4.4.2 Evaluación

Para la evaluación se utiliza la Lista de Verificación para Laboratorios de Ensayo y / o Calibración, con el fin de verificar la conformidad del Laboratorio con los requisitos establecidos por el CONACYT . El Equipo Evaluador procede a la verificación de acuerdo a lo definido en el Programa, en conformidad con lo descrito en la Norma Salvadoreña NSR vigente y los Requisitos para Certificados de Calibración. Los Evaluadores registran las evidencias objetivas de las No Conformidades y Observaciones efectuadas en el transcurso de la visita.

Si los Evaluadores lo consideran oportuno efectúan durante la visita de evaluación reuniones intermedias

1.4.4.3 Reunión Final

Al terminar la Visita de Evaluación, se realiza la Reunión Final, en la que participan el Equipo Evaluador, el Responsable del Laboratorio, el Responsable de la Calidad y el personal que ha colaborado en la Visita, si fuera necesario. En la reunión final el Evaluador Coordinador y los Evaluadores Técnicos presentan al Responsable del Laboratorio, el Informe Final de Evaluación con las No Conformidades y Observaciones.

El Responsable del Laboratorio debe:

- a) Firmar el Informe de las No Conformidades y Observaciones;
- b) Testimoniar su eventual reserva o discrepancia.

Una copia del Informe Final de Evaluación se entrega al Responsable del Laboratorio, firmada por el Equipo Evaluador.

1.4.5. NO CONFORMIDADES Y ACCIONES CORRECTIVAS

1.4.5.1 El Equipo Evaluador presenta el Informe de Evaluación al Coordinador del departamento de normalización del CONACYT, indicando las acciones desarrolladas, y si las hubiese, las No Conformidades encontradas.

1.4.5.2 Si como resultado de la Visita de Evaluación surgieran No Conformidades, el Responsable del Laboratorio dispondrá como máximo de un plazo de 60 días para

enviar al CONACYT la Propuesta de Levantamiento de No Conformidades.

El Equipo Evaluador realiza la Evaluación de la Propuesta de Levantamiento de No Conformidades, y si lo considera necesario recomienda una visita de verificación.

En el caso en que el Laboratorio no cumpla con el plazo establecido para el envío de la Propuesta de Levantamiento de No conformidades, el CONACYT puede disponer si lo considera adecuado, la suspensión o anulación del proceso de acreditación.

1.4.6 RECOMENDACIÓN DE ACREDITACIÓN

1.4.6.1 Cuando el resultado de las Visitas de Evaluación, y de Verificación si la hubiera, es satisfactorio, el Coordinador del departamento de Normalización, Metrología y Certificación coordina la Reunión del Comité de Acreditación de Laboratorios de Ensayo en reunión ordinaria, para su tratamiento.

Si la decisión es favorable, dicho Comité recomienda la Acreditación del Laboratorio a la Junta Directiva del CONACYT a través de la Gerencia Operativa. El Comité solicita información adicional en caso de considerarlo necesario.

1.4.6.2 La Junta Directiva otorga la Acreditación del Laboratorio de acuerdo con la recomendación del Comité de Acreditación.

1.4.7 OTORGAMIENTO DE LA ACREDITACIÓN

1.4.7.1 Una vez otorgada la acreditación, se firma el "Convenio entre el CONACYT y el Laboratorio de Ensayo Acreditado" por el plazo de 1 año. Esta autorización puede ser renovada cada año, siempre y cuando no haya incumplimiento a las disposiciones de este reglamento

1.4.7.2 El CONACYT entrega un Certificado de Acreditación, en el cual establece el alcance de la acreditación en un Anexo al mismo.

1.4.7.3 El CONACYT incorpora en el "Registro de Entidades Acreditadas", bajo un único número, el nombre y la dirección del Laboratorio Acreditado, el alcance de la acreditación, incluyendo: los ensayos o tipos de ensayos para los cuales se otorgó la acreditación, los materiales o productos ensayados, los métodos de ensayo, las normas y documentos de referencia, el nombre de la persona que ha sido reconocida por el CONACYT como Responsable Técnico de los ensayos o informes de ensayo, la fecha efectiva de la acreditación y el término de la misma.

1.5. PLAN DE SEGUIMIENTO

1.5.1 La verificación de que un Laboratorio continúe cumpliendo con los requisitos que dieron origen a su acreditación, se hace a través de un "Plan de Seguimiento". Para su cumplimiento el CONACYT establece el cronograma de Evaluaciones

1.5.2 Si existieran razones para dudar de la competencia técnica de un Laboratorio Acreditado, se pueden realizar evaluaciones no planificadas. El arancel relativo a esta visita adicional de seguimiento esta a cargo del Laboratorio.

1.6. EXTENSIÓN DE LA ACREDITACIÓN

1.6.1 El Laboratorio de Ensayo Acreditado puede solicitar formalmente y con la debida aclaración una extensión para ensayos adicionales en el mismo laboratorio, o modificación de ciertos ensayos por cambio de materiales, equipamiento, de normas, etc, debiendo complementar el formulario de solicitud.

1.6.2 Con la presentación de la solicitud formal, y el pago del estudio de documentación, se procede con el procedimiento descrito en el presente documento. La visita de evaluación puede limitarse únicamente a aquellos aspectos específicos relacionados con los ensayos solicitados en la extensión. El costo de la visita es determinado en virtud de la extensión solicitada.

1.6.3 En el caso de que la extensión sea otorgada, se emite un Anexo complementario.

1.7. SUSPENSIÓN

1.7.1 El CONACYT puede suspender, total o parcialmente la acreditación de un Laboratorio de Ensayo en caso de verificarse el incumplimiento de cualquiera de los puntos de la norma Salvadoreña NSR.

1.7.2 Cumplido el plazo de la suspensión, el CONACYT verifica el cumplimiento de las exigencias para el restablecimiento de la acreditación con una Visita de Evaluación, a cargo del Laboratorio. Si el informe es satisfactorio se notifica por escrito al laboratorio el levantamiento de la suspensión, el nuevo Plan de Seguimiento y sólo después de haber recibido la notificación, el Laboratorio procede a la emisión de Informes de Ensayo con la mención de la acreditación otorgada por el CONACYT. Si en el plazo acordado no cumple con las exigencias, el CONACYT procede a cancelar la acreditación.

1.8. CANCELACIÓN

1.8.1 Cuando el Informe de la Visita de Verificación, luego de una suspensión, evidencie la no superación de las No Conformidades encontradas, se da intervención al Departamento de Normalización, Metrología y certificación de la Calidad, a los efectos de evaluar los antecedentes y elevar una propuesta de cancelación a la Junta Directiva, la cual toma la resolución.

1.8.2 La Junta Directiva dispone la cancelación de la Acreditación cuando es verificada alguna de las causas establecidas en la Norma Salvadoreña NSR.

1.8.3 El Gerente Operativo notifica por escrito al Laboratorio para que éste reintegre el Certificado de Acreditación otorgado y se rescinda el Convenio. Luego se da de baja al laboratorio en el Registro.

1.9. RENOVACIÓN DE LA ACREDITACIÓN

1.9.1 Finalizado el período de acreditación (1 año) el Laboratorio de Ensayo Acreditado que no desee continuar en el Registro, debe notificar al CONACYT, por escrito, con lo cual caduca el Convenio. De lo contrario se renueva automáticamente dando lugar a una visita de reevaluación completa, previo pago del arancel correspondiente.

ANEXO 5

INSTALACIONES Y

ORGANIZACIÓN DE UN

LABORATORIO DE ANÁLISIS

MICROBIOLÓGICO DE AGUAS

1.0 ORGANIZACIÓN Y GESTIÓN

Organización puede ser utilizada como un sustantivo, cuando hace referencia a la empresa, la institución, el negocio, la estructura o ente social en el que se realizan una serie de actividades de lo más variada; entre ellas, las organizativas.

Por otro lado, en su forma verbal organización se refiere a la acción propiamente de organizar, es decir, de establecer un orden, una interrelación funcional entre las partes, en su búsqueda de un objetivo o fin determinado. Para nuestra finalidad utilizaremos este último significado.

En sí, la fase de organización se refiere a la estructuración técnica de las relaciones que deben darse entre las funciones, jerarquías y obligaciones individuales necesarias, así como al ordenamiento racional de los medios requeridos para el logro de los objetivos.

La organización es necesaria siempre que dos o más personas deban combinar sus esfuerzos hacia el mismo fin.

En cuanto a los laboratorios es indispensable que el laboratorio esté legalmente identificado, el laboratorio debe ser competente para realizar los ensayos correspondientes, debe estar organizado y funcionar de tal forma que sus instalaciones fijas provisionales cumplan con los requisitos establecidos.

El laboratorio debe estar organizado de modo tal, que cada miembro del personal esté informado del alcance y limitaciones de su área de responsabilidad. Es por eso que es indispensable un organigrama del laboratorio así como también, una descripción del puesto, en donde se ha establecido y documentado la responsabilidad, autoridad e interrelación de todo el personal que dirige, ejecuta o verifica las tareas determinadas.

Un organigrama propuesto se presenta a continuación.

1.1 Descripción de puesto

La descripción de puesto debe contar de 3 elementos:

- ❖ Un párrafo de introducción en el que figure una descripción concisa del puesto, indicando exactamente el lugar que ocupa en la estructura orgánica general.
- ❖ Una descripción detallada de todos los deberes y responsabilidades del analista.
- ❖ Una indicación del grado general de supervisión del supervisor y la medida en que el analista podrá llevar a cabo la labor con independencia.

El laboratorio debe tomar medidas que permitan asegurar que su personal está libre de presiones comerciales, financieras o cualquier otra que pueda influir en la calidad de sus trabajos.

El laboratorio debe contar con supervisión de personas que conozcan perfectamente los procedimientos y métodos de ensayo. El laboratorio debe tener un ejecutivo técnico que

tenga responsabilidad total de las operaciones técnicas del laboratorio y además un suplente que lo reemplace en caso de ausencia.

Por otra parte es importante un responsable de la función de calidad el cual es el responsable del sistema de calidad y su aplicación. El responsable de la función de calidad debe tener una estrecha relación con el responsable de la función técnica. Incluso, la norma hace referencia a que en algunos casos el responsable de la función de calidad puede ser el mismo director técnico, sin embargo no es recomendable. Además es necesario un suplente que lo reemplace en caso de ausencia, lo cual debe ser mencionado en el manual de calidad, pero se recomienda que el nombre de este suplente no este escrito en dicho manual para prevenir complicaciones que puedan darse a largo plazo, en caso que este deje de ser parte de la empresa.

Existe mucha información confidencial así como también derechos de propiedad de los clientes, por lo que el laboratorio debe tener procedimientos documentados que permitan asegurar la protección de la información.(8)

DESCRIPCIÓN DEL PUESTO

Título: Técnico

Reporta a : Profesionales especializados

Requisitos: Debe tener un grado académico o escolaridad solicitado para el puesto y la experiencia suficiente para realizar el trabajo con eficiencia.

Responsabilidades:

Debe responsabilizarse de las actividades y tareas que le sean asignadas, obedeciendo las disposiciones de seguridad y aplicando correctamente las normas establecidas en su unidad.(8)

Actividades

ACTIVIDAD	FRECUENCIA		
	DIARIO	PERIÓDICO	EVENTUAL
Lavado de cristalería.	X		
Preparación de medios de cultivos.	X		
Preparación de material estéril.	X		
Limpieza del área.	X		
Anotación en el kardex.	X		
Comunicar las necesidades de compra de material.			X
Presencia en la realización de los análisis microbiológicos.		X	X
Muestreo de superficies y medio ambiente.	X		
Controlar el funcionamiento del equipo.	X		

1.2 Instalaciones

Según las normas de buenas practicas de manufactura en las instalaciones de un laboratorio de análisis microbiológico de aguas debe existir un mínimo de salas. Esta normativa establece que como mínimo tendrá que haber las siguientes salas:

- ❖ Entrada de personas y materiales a través de esclusas. El acceso del personal a la zona de análisis debe de realizarse a través de una sala de vestuario, en donde la persona se quita sus zapatos de uso normal, se quita la ropa de calle, cuelga sus prendas y viste la ropa adecuada para la entrada al laboratorio de análisis.
- ❖ Sala para la preparación de medios y reactivos.
- ❖ Sala de almacenaje y preparación de muestras
- ❖ Sala de análisis microbiológico

Las salas deberán estar separadas del resto y deberá seguirse una limpieza sistemática de las mismas, ya que se trata de áreas de análisis microbiológicos.

El área de análisis deberá comunicar al área donde se encuentra la estufa y el autoclave, con el fin de tener un mínimo manipuleo de los tubos y las placas de petri.

En cuanto al diseño estructural que deben poseer las diferentes áreas que conforman el laboratorio de análisis microbiológico, se recomienda que las

superficies deben ser lisas, impermeables y sin fisuras a fin de reducir la acumulación de bacterias y de permitir la fácil aplicación de productos de limpieza y desinfección.

Para reducir esta acumulación de polvos y para facilitar la limpieza no deben existir rincones de difícil acceso y debe de haber un mínimo de salientes, estanterías y armarios. Es conveniente redondear las uniones techo-pared y pared-suelo para evitar acumulaciones de polvo estas uniones se recomiendan que tengan un radio de curvatura de 5 centímetros aproximadamente.

Con respecto a las puertas, estas deben de ser de tal manera que puedan ser limpiadas fácilmente y no deberán poseer rincones difíciles de limpiar. Se rechaza el uso de puertas deslizantes.(3)

1.3 Pisos

Los revestimientos de pisos recomendados para áreas de análisis microbiológicos tenemos:

- ❖ Cerámica con junta epoxi : Muy resistente al peso y al ataque químico.
- ❖ Capas de poliuretano alifático: Muy adecuado frente a tensiones estructurales de dilatación-contracción. Muy resistentes a la abrasión.(3)

1.4 Paredes

Es recomendable el recubrimiento plástico vinílico.(3)

1.5 Techos

Los techos deben reunir condiciones análogas a las de las paredes, a fin de garantizar que no se acumule polvo y facilitar la limpieza. Suelen construirse a menor altura de la normal.(3)

1.6 Calidad del aire (filtración) dentro de las áreas de análisis microbiológico

Se recomienda la utilización de filtros de alta eficiencia (HEPA) en las áreas de análisis microbiológico.

La distribución del aire que entra a dicha área deberá ser de la siguiente manera:

- ❖ Cabinas de flujo laminar dentro de las áreas de análisis

En donde el aire filtrado hace un barrido total del área ya que se desplaza siguiendo una línea de flujo paralelas y a la velocidad uniforme con lo cual desplaza a todos los contaminantes hacia el exterior del área de análisis.

- ❖ Flujo turbulento

Las renovaciones de aire, recomendadas están entre 5 y 20 renovaciones por hora, dicha renovación se hará de manera que la entrada del aire sea por el techo y la salida lo más cerca posible del suelo.(3)

1.7 Higrometría

La humedad relativa deberá ser de 15 a 40%. Los niveles de humedad relativa del área serán monitoreados por termohigrómetros.(3)

1.8 Iluminación

Se utilizarán cajas estancas insertas en el techo y a su nivel, con una intensidad luminosa como mínimo 300 luxes (medida de luz). Las áreas donde se realicen análisis deberán tener suficiente iluminación para facilitar la manipulación del personal.(3)

1.9 Vestuario

Las características del vestuario a utilizar en áreas de análisis microbiológico es el siguiente:

- ❖ Mínimo de costuras. Estas deben estar firmemente cubiertas por la raíz del borde del material.
- ❖ Ausencia de bolsillos, cinturones
- ❖ Los filamentos individuales del material deben ser fuertes, de manera que no se rompan con facilidad.
- ❖ El tejido debe ser cerrado para reducir el paso de microorganismos contaminantes del personal al exterior y viceversa.

- ❖ Se deberá cubrir el cabello y la barba (si la hubiera). Se debe llevar un traje de una o dos piezas, con pantalones, recogido en las muñecas y con cuello alto. El calzado deberá ser el adecuado o con cubre zapatos.
- ❖ Antes del trabajo. Lavado de manos y antebrazos antes de entrar al área de análisis y después de salir de dicha área.(3)

1.10 Tipos de agentes desinfectantes

Los tipos de desinfectantes a utilizar en las diferentes zonas, materiales y equipos a desinfectar, son variados de los cuales el adecuado deberá aportar (efectividad, seguridad y costo. Estos desinfectantes están en el comercio disponibles y es necesario que halla una rotación de los mismos para evitar bacterias resistentes.

Para cada desinfectante debe establecerse:

- ❖ Identificación (nombre, presentación, número de registro, casa comercial, etc).
- ❖ Fabricante
- ❖ Composición (propiedades físicas y químicas).
- ❖ Hoja de seguridad (información de primeros auxilios, inflamabilidad y precauciones de uso).
- ❖ Fecha de expiración.
- ❖ Modo de aplicación.

- ❖ Concentraciones de uso.
- ❖ Almacenamiento, usos específicos.

Los agentes desinfectantes deben de prepararse justo antes de ser utilizados.

Para la evaluación de los desinfectantes, por lo general, todos los fabricantes de este tipo de productos se ocupan de evaluar su eficacia. Debe de efectuarse una evaluación microbiológica a dichos desinfectantes.

Para la elección de un agente desinfectante deben tomarse en cuenta los siguientes aspectos:

- ❖ Su efectividad
- ❖ Concentración adecuada para utilizarse
- ❖ Tiempo de contacto
- ❖ Residuos que pueden dejar y en su caso como pueden eliminarse
- ❖ Si puede ser utilizado con seguridad por las personas
- ❖ Si las superficies a trabajar pueden verse alteradas

Estos desinfectantes pueden utilizarse de diferentes formas:

- ❖ Inmersión o inundación. Según se trate de pequeñas partes de superficies
- ❖ Fregado. Aplicable tanto en superficies grandes como pequeñas en las que se pueden utilizar paños.

- ❖ Aerosol izado. Aplicable en áreas
- ❖ Fumigación. Los agentes químicos cuya acción se ejerce en estado gaseoso se aplican por fumigación.(3)

1.11 Realización de limpieza y desinfección de áreas.

Deberá de elaborarse un programa de limpieza y desinfección de áreas por escrito por el jefe del laboratorio. Se deberá tomar en cuenta los siguientes puntos; Se deberá tomar en cuenta las diferentes áreas del laboratorio, por ejemplo: esclusas, área de análisis, área de preparación de medios y reactivos, detallando dentro de ellas las diferentes partes que la constituyen como suelos, techos, paredes, puertas, ventanas, mobiliarios y el orden en que se debe realizar la limpieza. Siendo este, primero los techos, luego paredes, ventanas, suelos y la limpieza del mobiliario; todo en un solo día.(3)