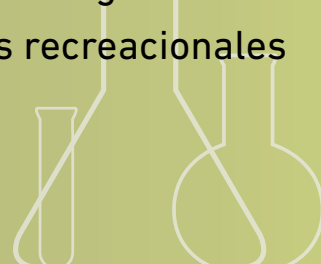


5053UY

Determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales



Técnica de filtración por membrana

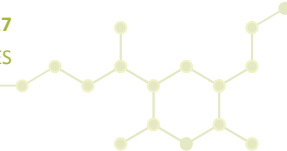
Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales, superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales, filtrando un volumen determinado de la muestra, y obteniendo resultados en 24 horas. Es aplicable también a aguas salobres o salinas. El límite de cuantificación es de 20 ufc/ 100 mL; el límite de detección es de 3 ufc/100 mL.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista”. (5072 UY)
- 2.6. Procedimiento: “Modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis”. (5065 UY)
- 2.7. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02)
- 2.8. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 13, INE 86 y INE 97)
- 2.9. Instructivo de uso balanza (INE 16)
- 2.10. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.11. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.12. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.13. Instructivo de uso analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98)
- 2.14. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44)
- 2.15. Instructivo de uso baño de agua para incubación de coliformes termotolerantes (INE 87)
- 2.16. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.17. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16)
- 2.18. Rutas de análisis (RMB 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El grupo de bacterias coliformes termotolerantes para la técnica de filtración por membrana se define como todos los bacilos gram negativos, aeróbicos y algunos anaeróbicos facultativos, no formadores de endosporas, que cuando se incuban en medio M-FC por 24 h \pm 2 h a 44,5 °C \pm 0,2 °C desarrollan colonias color azul.
- 3.2. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa y su incubación en un medio de cultivo selectivo a 44,5 °C por 24 h. Este medio selectivo y la temperatura de incubación disminuyen el desarrollo de bacterias no coliformes que afectarían negativamente el crecimiento de los coliformes termotolerantes.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El análisis y el recuento deben ser realizados utilizando túnica, anteojos de protección y guantes descartables, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

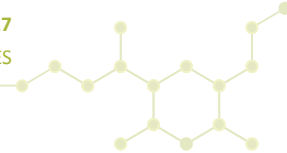
- 5.1. Aguas con gran turbidez y baja densidad de coliformes termotolerantes; presencia de tóxicos orgánicos como fenoles; existencia de una carga de bacterias no coliformes muy grande.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, y estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar.
- 6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas. Referirse al SOP 5065UY, cuando sea necesario realizar la modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis.
- 6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual. Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.
- 6.5. Cuando la muestra posee metales pesados ($> 1,0\text{ mg/L}$), el frasco de muestreo debe contener EDTA a pH 6,5 como agente quelante. Deben agregarse al frasco de muestreo antes de la esterilización del mismo 0,3 mL de una solución de EDTA al 15 % (p/p) cada 120 mL de muestra.

7. INSTRUMENTAL

- 7.1. Equipo de filtración: embudo y portafiltro poroso que se puedan trabar entre sí y se puedan esterilizar; bomba de vacío; kitasato de 1 litro o mayor; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío. En lo posible, la presión de vacío sobre el filtro debe ser de 34 - 51 KPa.
- 7.2. Balanzas de resolución 0,01 g
- 7.3. Baño de agua o incubadora a $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10 a 15X y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de $60\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la placa (de preferencia).
- 7.5. Autoclave
- 7.6. Mecheros
- 7.7. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 47 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado.
- 7.8. Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles de $0,45\text{ }\mu\text{m} \pm 0,02\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro, libre de glicerina y sin áreas hidrofóbicas, de 47 mm de diámetro.
- 7.9. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.
- 7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca.
- 7.11. Pipetas automáticas de 1000 μL y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas.
- 7.12. Material de vidrio estéril para preparación del medio de cultivo.
- 7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.14. Heladera a $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.15. Anzas
- 7.16. Cámara de flujo laminar (de preferencia)
- 7.17. Microondas (de preferencia)
- 7.18. Cinta de revelado de autoclave
- 7.19. Destilador de agua (Barnstead o similar)
- 7.20. Desionizador de agua (Milli-Q o similar)
- 7.21. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)



8. REACTIVOS

- 8.1. Peptona (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.2. Etanol
- 8.3. Medio de cultivo M-FC Agar (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.4. Agua desionizada (grado 2 según norma ISO 3696 en su versión vigente)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en la realización del medio de cultivo, así como en el procedimiento analítico debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y esterilizado.
- 9.2. Las placas de Petri de plástico deben ser estériles.
- 9.3. Los punteros de las pipetas automáticas y los embudos de filtración deben ser esterilizados previo a su utilización.
- 9.4. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANALISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua peptonada al 0,1 %

- 11.1. Adicionar 1 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días.

Preparación del medio de cultivo

- 11.4. El medio de cultivo debe prepararse según instrucciones del fabricante en el envase, en material de vidrio estéril, sin necesidad de ser autoclavado. Disolver y fundir en horno microondas o en baño María. Hervir 1 minuto. El pH final del medio de cultivo debe ser $7,4 \pm 0,2$. Dejar registro en el RPR 16.
- 11.5. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período máximo de 14 días, ya sea en Erlenmeyer, frasco Schott o repartido en las placas.

Preparación de las placas de Petri

- 11.6. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatarlo a 45 °C. Colocar aproximadamente 3 mL de medio por cada placa de 47 mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.
- 11.7. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo.
- 11.8. Almacenar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta su utilización.

Preparación de tubos para diluciones

- 11.9. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar.
- 11.10. Colocar 9 mL \pm 0,2 mL de agua desionizada en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio o papel de embalaje.
- 11.11. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.12. Conservar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis de la muestra

- 11.13. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el

origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1 mL de muestra o de la dilución previa, a los 9 mL de agua desionizada. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra, es conveniente filtrar tres volúmenes diferentes.

- 11.14. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadrículada hacia arriba sobre el portafiltros poroso del embudo utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.
- 11.15. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.
- 11.16. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vortex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.
- 11.17. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo en la placa de Petri sobre el medio, con la parte cuadrículada hacia arriba, evitando la formación de burbujas de aire, pasar suavemente la pinza por el borde del filtro para sacar el aire. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla en la mesada para luego ser incubada.
- 11.18. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua peptonada estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.
- 11.19. Si el volumen a filtrar es poco (1 mL) colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.
- 11.20. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.
- 11.21. Incubar las placas de Petri en posición invertida dentro de bolsas herméticas, en el baño de agua a 44,5 °C ± 0,2 °C durante 24 h ± 2 h.

Recuento

- 11.22. Las colonias típicas de coliformes termotolerantes son de distintas tonalidades de azul. Las colonias grises o crema son consideradas como no coliformes, aunque existen colonias de E. coli atípicas que se presentan de color crema por lo que se recomienda realizar la verificación a posteriori.
- 11.23. El recuento de colonias se realiza, de ser posible, en las placas que contengan entre 20 y 60 colonias de coliformes típicas y no más de 200 colonias de cualquier tipo.

12. ANÁLISIS DE DATOS

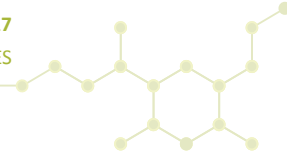
12.1. La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$C. \text{ termotolerantes (ufc/100 mL)} = \frac{\text{colonias de coliformes contadas} \times 100}{\text{mL de muestra filtrados}}$$

donde:

ufc corresponde a Unidades Formadoras de Colonias

- 12.2. Si las colonias crecen uniéndose sobre la membrana, se informa como crecimiento confluyente con o sin presencia de coliformes y se sugiere la realización de otro muestreo del mismo punto.
- 12.3. Si el número de colonias típicas de coliformes termotolerantes fuera entre 20 y 60 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto.
- 12.4. Si el número de colonias típicas es mayor a 60, el recuento se realiza siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación.
 - Dividir la placa en 4 cuadrantes, contar en uno, multiplicar por cuatro.
 - Contar 10 cuadrados del filtro al azar, promediar, multiplicar por el número total de cuadrados del filtro.
- 12.5. Si el recuento es cero, considerar 1 ufc en el mayor volumen filtrado, calcular la densidad de coliformes termotolerantes, y expresar los resultados como < valor obtenido. Si el resultado es menor a 20 ufc/100 mL, expresar como < LC (límite de cuantificación).
- 12.6. Si el número de colonias a contar es menor a 20 se considera el recuento de la placa más cercana al rango



aceptable. Por ejemplo si se examinan 50, 25 y 10 mL, y el conteo es 15, 6 y < 1 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(15 \times 100)}{50} = 30 \text{ coliformes /100 mL}$$

12.7. Si el número de colonias a contar es menor y mayor a 20, se considera el recuento de las placas más cercanas al rango aceptable. Por ejemplo si se examinan 0,1 mL y 0,03 mL, y el conteo es 78 y 21 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(78 + 21) \times 100}{(0,1 + 0,03)} = 76.000 \text{ coliformes /100 mL}$$

12.8. Interpretación de resultados: Al efectuarse la evaluación de datos, se considera que un resultado ha excedido un valor guía o estándar de calidad, cuando el límite inferior para el intervalo de confianza de la incertidumbre de la medición es mayor que tal valor.

Por ejemplo, si el valor guía es de 500 ufc/100 mL, un resultado de (500 ± 50) ufc/100 mL NO excede la guía, ya que el límite inferior (450), es menor a 500. En este ejemplo, el menor recuento que excedería la guía es 551 ufc/100 mL ± 50 ufc/100 mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO

13.1. **Calidad del proceso analítico:** Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis, filtrando al inicio y al final del procesamiento de muestras, 100 mL de agua estéril e incubando la placa con el filtro bajo las mismas condiciones que las muestras. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.

Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control de temperatura de la incubadora).

Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.

Verificación mensual del 5 % de las muestras realizadas en el Sector, aislando de cada muestra ambiental 10 colonias típicas (y en lo posible también colonias no típicas) siguiendo el procedimiento **“Control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista”, 5072 UY.** Cuando corresponda, ajustar el conteo basado en el porcentaje de verificación y expresar el resultado como coliformes termotolerantes verificados. Si no es posible hacer las verificaciones en el momento, aislar las colonias en tripticasa soya agar (TSA) y guardarlas en la heladera a 2-8 °C hasta que se puedan procesar.

13.2. **Control de la precisión:** Para el control de la precisión del método se debe establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC 07).

Al comienzo de nuevos programas de monitoreo hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo criterio de precisión rápidamente. Una vez que está establecido el criterio de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al Sector cada día, por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido.

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

13.4. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista a través de la duplicación de los conteos de una misma placa, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFIA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WPCF, 2012. Método 9222 D Thermotolerant Coliform Membrane Filter Procedure pp. 9-85 a pp. 9-87.

14.2. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for safe recreational water environments. Vol 1: Coastal and fresh waters. 2003. Genova.

14.3. DIRECTIVE 2006/7/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 767160/EEC. Official Journal of the European Union. 2006.