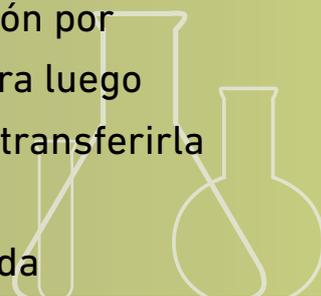


5065UY

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

Técnica de Filtración por Membrana modificada



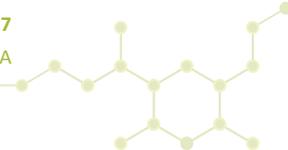
Elaborado - S. Castro Scarone

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 consiste en una modificación de la técnica estándar de filtración por membrana y permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis. Este método puede ser usado cuando resulta impráctico aplicar el método convencional, por ejemplo en casos donde el lugar de muestreo es lejano al laboratorio, cuando el tiempo entre el muestreo y el análisis excede el permitido o cuando no es posible mantener la temperatura deseada de la muestra durante el transporte.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Referirse a la determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales, 5053UY.
- 2.2. Referirse a la determinación de coliformes totales en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales, 5054UY.

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de la muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa; el filtro se dispone en el medio de transporte bacteriostático y se transporta hasta el laboratorio. Se completa la determinación en el laboratorio transfiriendo la membrana, al medio de cultivo correspondiente según la determinación que se quiera realizar (coliformes termotolerantes o coliformes totales) y se incuba según las condiciones especificadas en cada procedimiento. Posteriormente se realiza el recuento de colonias típicas desarrolladas en la placa.
- 3.2. El medio de transporte está compuesto por agentes bacteriostáticos y permite mantener a las bacterias viables evitando el crecimiento de otros organismos durante el período de transporte (máximo 72 h).

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

8. REACTIVOS

- 8.1. Peptona (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.2. Etanol 95 %
- 8.3. Medio de cultivo específico: M-FC Agar o M-Endo Agar, según corresponda.
- 8.4. Agar (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.5. Agua desionizada (grado 2, según norma ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.6. Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 10049-21-5)
- 8.7. Fosfato monoácido de potasio (K_2HPO_4 Nro. CAS 7758-11-4)
- 8.8. Sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ Nro. CAS 63-74-1)
- 8.9. Tris (hidroximetil) aminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ Nro. CAS 77-86-1)

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua peptonada al 0,1 %

11.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

Preparación del Medio de transporte (M-ST)

11.2. La composición del medio M-ST es la siguiente:

Fosfato de sodio monobásico, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
Fosfato monoácido de potasio, K_2HPO_4	3,0 g
Sulfanilamida	1,5 g
Etol (95 %)	10 mL
Tris (hidroximetil) aminometano	3,0 g
Agar	15 g
Agua desionizada.....	.c.s.p. 1 L

11.3. Preparar el medio y rehidratarlo en la cantidad especificada de agua.

11.4. Posteriormente esterilizarlo a 121 °C durante 15 minutos. El pH final debe ser $8,6 \pm 0,2$. Dejar registro en el RPR 16.

11.5. Dispensar 4-5 mL del medio en placas de Petri.

11.6. Almacenar en la heladera y usar dentro de las 96 horas.

Preparación del medio de cultivo específico

11.7. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

Preparación de las placas de Petri

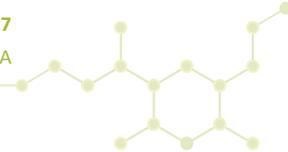
11.8. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

Preparación de tubos para diluciones

11.9. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

Análisis de la muestra

11.10. 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 peptonada estéril. Se recomienda



filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra se recomienda filtrar tres volúmenes

- 11.11. 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.
- 11.12. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.
- 11.13. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vortex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.
- 11.14. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril.
- 11.15. 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.
- 11.16. 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.
- 11.17. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.
- 11.18. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo con el entramado hacia arriba en el medio de transporte (M-ST agar). Mantener refrigerado o a temperatura ambiente por un máximo de 72 horas.
- 11.19. Una vez en el laboratorio, antes de las 72 h del muestreo retirar el filtro del medio de transporte y colocarlo en el medio de incubación específico a la determinación que se quiera realizar, evitando la formación de burbujas de aire, pasando suavemente la pinza por el borde del filtro. 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 invertida en la estufa de incubación correspondiente, durante el tiempo correspondiente.

Recuento

Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 9222 E Delayed Incubation Thermotolerant Coliform Procedure y 9222 C Delayed Incubation Total Coliform Procedure, pp. 9-87 a 9-89 y 9-84 a 9-85.