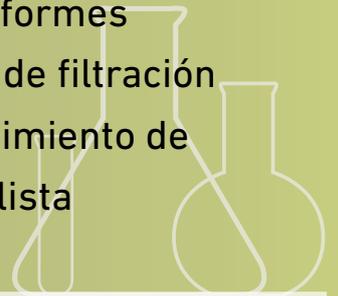


# 5072UY

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

Pruebas bioquímicas



---

**Elaborado** - S. Castro Scarone

---

**Modificado** - G. Pistone

---

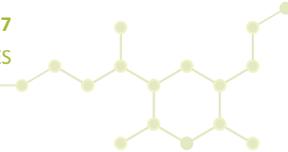
**Revisado** - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

---

**Aprobado** - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

---





## 1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza en el 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. También se aplica para evaluar el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, debiéndose realizar separadamente para cada tipo de matriz ambiental.

## 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: “Determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales” (5053UY)
- 2.6. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.7. Procedimiento Limpieza de materiales (PR 16)
- 2.8. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE13, INE 86 e INE97)
- 2.9. Instructivos de uso balanza plato abierto (INE 16)
- 2.10. Instructivos 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. Instructivos de uso agitador vórtex (INE 44)
- 2.15. Ruta de análisis (RMB 08)

## 3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La verificación de coliformes termotolerantes se basa en la capacidad de los mismos de fermentar la lactosa presente en el caldo lauril triptosa; a su vez la sal biliar presente en el medio de cultivo EC, inhibe el desarrollo de bacterias formadoras de endosporas y bacterias gram positivas.
- 3.2. Se definen como coliformes termotolerantes los bacilos gram negativos, aerobios o anaeróbios facultativos, no formadores de esporas, capaces de fermentar la lactosa con formación de ácido y gas (hidrógeno y dióxido de carbono) cuando se incuban a  $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$  por  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .
- 3.3. En este grupo se incluyen los siguientes géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Las colonias de coliformes termotolerantes verificadas son aquellas colonias que evidencian crecimiento y formación de gas cuando se incuban en caldo lauril triptosa y medio EC.

## 4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Los aislamientos y las verificaciones deben ser realizados de preferencia, en cámara de flujo laminar utilizando guantes descartables y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

## 5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

## 6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. No aplica.

## 7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Incubadora a  $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ .
- 7.2. Baño de agua o Incubadora a  $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ .
- 7.3. Mecheros.

- 7.4. Campanas de Durham de borosilicato de 7mm x 45 mm aproximadamente.
- 7.5. Ansas de inoculación.
- 7.6. Termómetros calibrados para controlar incubadoras.
- 7.7. Material de vidrio estéril para preparación de los medios de cultivo.
- 7.8. Balanzas de resolución 0,01 g.
- 7.9. Placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, esterilizadas.
- 7.10. Autoclave.
- 7.11. Tubos de ensayo de vidrio estériles con tapa de algodón o de rosca.
- 7.12. Gradilla para tubo de ensayos.
- 7.13. Heladera a 2-8 °C.
- 7.14. Cámara de flujo laminar.
- 7.15. Microondas (de preferencia).
- 7.16. Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10mL), con sus respectivos punteros estériles.
- 7.17. Destilador de agua (Barnstead o similar).
- 7.18. Desionizador de agua (Milli-Q o similar).
- 7.19. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

## 8. REACTIVOS

- 8.1. Medio TSA (Tryptic Soy Agar) (marca BBL, Difco u Oxoid)
- 8.2. Caldo Lauril Triptosa (CLT) (marca BBL, Difco u Oxoid)
- 8.3. Medio EC (marca BBL, Difco u Oxoid)
- 8.4. Etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH Nro. CAS 64-17-5)
- 8.5. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)

## 9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en los aislamientos y los procedimientos de verificaciones debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y ser estéril.
- 9.2. Las colonias de coliformes termotolerantes pueden ser aisladas en TSA u otro agar nutritivo antes de realizar la verificación con el objetivo de obtener mayor inóculo para realizar las verificaciones. Este paso no es imprescindible de que sea realizado, aunque se aconseja para asegurar que la verificación sea realizada a partir de una colonia aislada, con buen crecimiento y que tenga entre 18-48 h de crecimiento.

## 10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

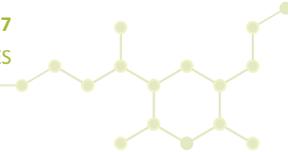
- 10.1. No aplica.

## 11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

### Operaciones previas.

### Obtención de colonias aisladas y puras en TSA

- 11.1. Preparar el medio TSA como lo indica el envase.
- 11.2. Disolver agitando
- 11.3. Luego de disuelto, autoclavar 15 minutos a 121 °C.
- 11.4. Una vez estéril, termostatarlo a 45 °C aproximadamente, y repartirlo en las placas de Petri. Dejar registro en el RPR 16.
- 11.5. Antes de utilizar las placas, dejarlas secar en estufa a 35 °C por 24 horas preferentemente.
- 11.6. En cámara de flujo realizar aislamientos por estrías de colonias típicas y no típicas.
- 11.7. Incubar las placas invertidas en estufa a 35 °C ± 0,5 °C por 24 horas.
- 11.8. Las placas con las colonias aisladas y puras pueden ser selladas con Parafilm y guardadas en heladera a 2-8 °C por 24 horas antes de realizar las pruebas bioquímicas.



### Preparación de los medios de cultivo

- 11.9. Preparar los medios de cultivo CLT y EC como lo indica el envase.
- 11.10. Una vez disueltos, repartir aproximadamente 3-4 mL en tubos de ensayo con campana Durham invertida.
- 11.11. Tapar los tubos con tapa de algodón, colocar en gradilla autoclavable, tapar con papel aluminio o de embalaje y rotular.
- 11.12. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C.
- 11.13. Dejar registro en el RPR 16.
- 11.14. Conservar en heladera a 2-8 °C por un máximo de 14 días.
- 11.15. Dentro de lo posible, si el medio fue conservado en heladera, incubar toda la noche a temperatura ambiente antes de usar. Descartar aquellos tubos que presenten crecimiento y/o burbujas de aire.

### Análisis de la muestra.

- 11.16. Una vez obtenidas las colonias aisladas en TSA, con un ansa de inoculación debidamente flameada y enfriada, transferir cada colonia aislada a ser verificada, a un tubo de ensayo con el medio CLT.
- 11.17. Luego de la transferencia, incubar todos los tubos inoculados a  $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  durante  $24 \pm 2\text{ h}$ . Aquellos tubos que no evidencian crecimiento o producción de gas en 24 horas (dudosos), se recomienda que sean incubados durante 24 h más para asegurar la lectura correcta de los mismos.
- 11.18. Partiendo de las mismas colonias crecidas en TSA que se inocularon en CLT, se realiza el mismo procedimiento, pero esta vez sembrando tubos con medio EC e incubarlos a  $44,5 \pm 0,2\text{ °C}$  por  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .
- 11.19. Luego de la incubación, realizar la lectura de los tubos, siendo positivos aquellos que evidencian crecimiento y producción de gas en ambos medios de cultivo (CLT y EC).

## 12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Sobre el total de colonias no típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos negativos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.
- 12.2. Sobre el total de colonias típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos positivos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

## 13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. No aplica.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WPCF, Washington, DC. Método 9020 B Interlaboratory Quality Control Guidelines pp. 9-4 a 9-24