



Regional Distrito Capital
Sistema de Gestión de la Calidad

PRÁCTICA DE LABORATORIO
DETERMINACIÓN DE MESOFILOS, COLIFORMES, Y *E.coli* EN AGUA POTABLE
MEDIANTE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

CÓDIGO:
Versión 01

Centro de Gestión Industrial
MAYO 2020

 <p>Sistema de Gestión de la Calidad</p>	<p>POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS</p> <p>Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial</p>	<p>Fecha: Mayo 2020</p> <p>Versión: 01</p> <p>Página 2 de 7</p>
--	---	---

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

- Determinar la calidad del agua potable de acuerdo con los resultados del recuento microbiológico de Mesofilos, Coliformes y E.coli .

1.2 Objetivos específicos

- .
- Realizar Las diluciones de la muestra de acuerdo con la naturaleza de esta.
- Realizar la filtración por membrana de acuerdo con el protocolo establecido.
- Realizar la siembra e incubación de los mesofilos, coliformes y E.coli
- Realizar los recuentos microbiológicos de los microorganismos indicadores en la muestra procesada.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

El crecimiento de la población a nivel mundial ha incrementado los niveles de contaminación. Esta contaminación esta relacionada con el vertido de agua o suelo de desecho de origen doméstico e industrial a los cuerpos diferentes ecosistemas. En el caso de los residuos de origen doméstico, la carga contaminante esta representada por altos

porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal.

El control de la calidad microbiológica del agua de consumo requiere de análisis dirigidos a determinar la presencia de microorganismos patógenos; los agentes involucrados en la transmisión hídrica son las bacterias, virus y protozoos, que pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde gastroenteritis simple hasta casos fatales de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea. El diagnóstico de estos microorganismos, requiere laboratorios especializados y representa varios días de análisis y costos elevados. Como alternativa a estos inconvenientes, se ha propuesto el uso de indicadores microbianos como los Colimormes, *E.coli* y mesofilos que se puedan identificar mediante el uso de métodos sencillos, como la filtración por membrana para determinar así las caliddad microbiológica del agua potable.

 Sistema de Gestión de la Calidad	<p align="center">POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS</p> <p align="center">Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial</p>	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 3 de 7
---	---	---

Los mesofilos son aquellas que nos indican calidad higiénica del agua, estos microorganismos crecen a temperaturas de 35 °C dentro de estos microorganismos se encuentran bacterias, hongos y levaduras.

Los coliformes totales y *E.coli* indican contaminación fecal del agua, la presencia de estos microorganismos en el agua indican que el agua no es apta para el consumo humano y por lo tanto no reuniría las características especificadas en la legislación colombiana para el agua potable

3. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

3.1 Medios de cultivo

- 2 cajas de agar ChromoCult®
- 2 cajas con agar PDA
- 2 cajas de agar Plate Count.
- 2 frasco con 90 ml de agua peptonada estéril
- 1 Frasco con 99 mL de caldo agua peptonada estéril

3.2 Materiales por grupo proyecto

- 4 pipetas de 1 ml estériles
- 1 pipeta de 1 mililitro estéril (solo para los grupos que tienen muestra de agua)
- 1 espátula (solo para los grupos que tienen muestras sólidas o lodos)
- 1 gradilla plástica
- 3 espátulas de Digrafsky
- Pipeteador de pera o regla

3.3 Equipos

- Equipo para la filtración en membrana
- Filtros de membrana
- Pinzas estériles para la manipulación de los filtros
- Probeta estéril
- Incubadora a 35 °C para bacterias
- Incubadora a 25 °C para hongos
- Contador de colonia
- Baño termostático

3.4 Material del aprendizaje

- Muestra a analizar tomada con anterioridad

 Sistema de Gestión de la Calidad	POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 4 de 7
---	---	---

- Bata, cofia, tapabocas, guantes, monogafas, marcador de vidrio, toallas de papel, toalla de tela, encendedor o fósforos, jabón de manos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Preparación de las diluciones seriadas 10^{-1} y 10^{-2} ,

- Marque el frasco con los 90 ml como dilución 10^{-1} y el frasco con 99 mL con la dilución 10^{-2} .
- Para realizar la dilución 10^{-1} , agite el frasco donde se encuentra la muestra y tome 10 mL de la muestra, lleve los 10 mL a 90 mL de agua peptonada, sosteniendo la pipeta en un ángulo de 45 grados sobre la parte interior del cuello del frasco.
- Agite el frasco vigorosamente, deje en reposo de 2 a 5 minutos.
- Para la dilución 10^{-2} transfiera 1 mililitro de la muestra a 99 mL del diluyente. (esta dilución se realizara en caso de que basado en las condiciones del agua se sospeche un crecimiento mayor a 200 colonias en la membrana del filtro).
- Repetir estos pasos hasta obtener el número de diluciones deseadas, cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.
- Guardar una contramuestra para eventuales verificaciones, en condiciones de refrigeración,

4.2 filtración por membrana para determinar bacterias mesofilos

- Conecte el matraz a la bomba de vacío
- Prenda el mechero.
- Coloque el portafiltro estéril sobre la base del manifold,
- Con unas pinzas estériles, coloque la membrana de celulosa estéril sobre el sistema de filtración, con la cuadrícula hacia arriba.
- Con mucho cuidado coloque el embudo sobre el sistema y fíjelo.
- Llene el embudo con los 100 mL de la dilución 10^{-1} .
- Filtre los 100 mL de la muestra 10^{-1} .
- Una vez se hallan filtrado los 100 mL de agua, cierre las llaves del manifold y apague la bomba de vacío.
- Retire el embudo y tome la membrana con las pinzas estériles y colóquela sobre una caja de Petri que contenga Agar Plate Count que haya marcado con anterioridad (código de la muestra, y la dilución correspondiente).

 Sistema de Gestión de la Calidad	POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 5 de 7
---	---	---

- Incube la caja en posición invertida a 36°C por 24 a 48 horas.
- Una vez retire el filtro, coloque una nueva y filtre 100 mL de la dilución 10^{-1}

4.3 filtración por membrana para determinar Coliformes y *E.coli*

- Con unas pinzas estériles, coloque la membrana de celulosa estéril sobre el sistema de filtración, con la cuadrícula hacia arriba.
- Con mucho cuidado coloque el embudo sobre el sistema y fíjelo.
- Llene el embudo con los 100 mL de la muestra pura.
- Una vez se hallan filtrado los 100 mL de agua, cierre las llaves del manifold y apague la bomba de vacío,
- Retire el embudo y tome la membrana con las pinzas estériles y colóquela sobre una caja de Petri que contiene el agar ChromoCult® que haya marcado con anterioridad (código de la muestra, y la dilución correspondiente).
- Incube la placa en posición invertida a 36°C por 24 horas.

4.4 Recuento en profundidad de hongos y levaduras mesofilas

- Realice la filtración por membrana de 100 mL de la muestra, siguiendo los pasos mencionados anteriormente.
- Con pinzas estériles coloque el filtro sobre la superficie de una caja de agar PDA
- Incube la caja en posición invertida a 25 °C por 5 días

4.5 Lectura y reporte de los resultados para Coliformes y *E.coli*.

- Después de el tiempo de incubación saque las cajas de agar ChromoCult® de la incubadora.
- Identifique las colonias de los coliformes. Los coliformes producen B- D-galactosidasa y su producción se evidencia por la formación de colonias de rosa a rojo. Este tipo de colonias serán presuntas coliformes.
- Las colonias que presentan producción de B- D-galactosidasa y B D-glucoronidasa se evidenciarán mediante una coloración azul y pertenecen a *E.coli*
- Cuente el número de colonias de coloración rosado a rojo y el número de colonias azules.
- Para un recuento efectivo el número de colonias a contar en el filtro debe estar en el rango de 10 a 200 colonias.
- Sume el número de colonias azules y rojas y este corresponderá al número de colonias de coliformes totales
- Reporte los resultados:
UFC de Coliformes/ 100 mL de muestra = N° de colonias rosa a rojo + N° de colonias azul violeta

 Sistema de Gestión de la Calidad	POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 6 de 7
---	---	---

Reporte este resultado como el número de bacterias coliformes por cada 100mL de muestra
UFC *E. coli*/100mL de muestra= N° de colonias azul violeta

- En el caso de haber aplicado diluciones a la muestra, para hacer el reporte se tiene que tener en cuenta el factor de dilución:

$$\text{Coliformes/ 100 mL} = (\text{Número de colonias}) * (\text{inverso de la dilución}) = \text{UFC de coliformes / 100mL de muestra}$$
Reporte el resultado de manera exponencial utilizando un decimal:

4.6 Lectura y reporte de microorganismos mesófilos

- Saque las cajas de agar PDA y Plate count de la incubadora
- Revise que en el filtro de cada caja haya un rango de colonias entre 10 a 200
- Cuente el número de colonias presente en la caja de PDA y reporte este resultado como número de colonias de mohos y levaduras (MyL)
- Cuente el número de colonias presentes en el agar Plate count y registre estas como el número de bacterias mesófilas.
- Realice los cálculos para reportar el número de microorganismos por cada 100 ml de muestra:

UFC bacterias mesófilas/ 100mL = N° de colonias bacterianas * inverso de la dilución

UFC mohos y levaduras/ 100 ml: colonias de M y L* inverso de la dilución

5. RESULTADOS

- De acuerdo con los resultados obtenidos, elabore el informe de laboratorio en la plantilla asignada por el Instructor.

6. BIBLIOGRAFÍA

-
- IDEAM (2007). Determinación de *Escherichia coli* y Coliformes totales en agua por el método de filtración por Membrana en Agar Chromocult
- Madigan, M. (2015). Brock. Biología de los microorganismos. (14a. ed.) Pearson Educación. Tomado de <http://www.ebooks7-24.com.bdigital.sena.edu.co/?il=5285>

 <p>Sistema de Gestión de la Calidad</p>	<p>POTABILIZAR AGUA DE ACUERDO CON NORMAS TÉCNICAS</p> <p>Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial</p>	<p>Fecha: Mayo 2020</p> <p>Versión: 01</p> <p>Página 7 de 7</p>
--	---	---

- NTC- ISO 4772 (2008). Calidad del Agua. Detección y Recuento de Escherichia coli y de bacterias coliformes. Parte 1: método de filtración por membrana. <https://e-collection-icontec-org.bdigital.sena.edu.co/pdfview/viewer.aspx?locale=es-US&Q=3A56347690A65AB0693C5BE6797B0EA4&Req=>
-
-
-