
	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y *E-coli* POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP




AOXLAB S.A.S

	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

DOCUMENTO CONTROLADO


FOR-TC- 018 Determinación de coliformes totales, fecales y *E-coli* por el método número más probable NMP

Copia controlada No. :1


	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Lorena Correa Restrepo	Líder laboratorio		2023-02-10
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora calidad		2023-02-10
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director técnico		2023-02-10
Localización del documento:		http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/		

Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018-01-19	1	Ninguno (versión original).	LVLS	NBR	YELP
Vigente	2023-02-10	2	Se cambia estilo según manual identidad	LCR	APPP	DPP

	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

ÍNDICE	
Sección	Página
	4
1. OBJETIVO Y ALCANCE.	
1.1 Objetivo.	4
1.2 Alcance.	4
	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.	
2.1 Definiciones.	4
2.2 Notaciones.	6
	6
3. REFERENCIAS.	
	6
4. PATRONES DE MEDIDA.	
4.1 Aparatos y equipos	
4.2 Requisitos técnicos de funcionamiento	
	6
5. INSPECCIÓN VISUAL	
5.1 Revisión general.	6
5.2 Estabilización.	7
5.3 Verificación de patrones y otros equipos	7
	7
6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.	
6.1 Preparación de soluciones	7
6.2 Preparación de la Muestra	8
6.3 Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa	8
6.4 Siembra en la serie de tubos para NMP	8
	9
7. INFORME.	
7.1 Factores a ser controlados	9
7.2 Método de registro (observaciones y resultados)	9
	9
8. RESPONSABILIDADES.	
8.1 Líder de Calidad.	9
8.2 Líder de Laboratorio.	9
8.3 Analistas.	9
	9
9. FORMATOS RELACIONADOS.	
	10
10. ANEXOS.	

	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

1. OBJETIVO Y ALCANCE

1.1 OBJETIVO: Determinar el contenido de unidades formadoras de colonia (UFC) de Coliformes totales, fecales y E-coli mediante la técnica de Número Más Probable NMP

1.2. ALCANCE: Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

2. DEFINICIONES Y ANOTACIONES

2.1 Definiciones generales

Análisis microbiológico [1]: Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

Límites microbiológicos [1]: Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una superficie.

Incubadora [1]: cámara aislada que permite que la temperatura se mantenga estable y uniformemente distribuida dentro del rango de error de temperatura máximo permisible especificado en el método de ensayo.

Calibración [3]: Proceso de comparar los valores obtenidos por un instrumento de medición con la medida correspondiente de un patrón de referencia (o estándar).

Coliformes [2][4]:son un grupo de bacterias habitantes de la región intestinal de los mamíferos y las aves, estos microorganismos cumplen las condiciones antes mencionadas. Pertenecen a la familia de la Enterobacterias, se caracterizan por su capacidad de fermentar la lactosa a 35-37°C. Los géneros que componen este grupo son:*Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, Edwardsiella.*(Ver tabla 1)

Todos los Coliformes pueden existir como saprófitos independientes o como microorganismos intestinales, excepto el género *Escherichia*, que solo puede tener origen fecal. Esto ha hecho necesario distinguir entre Coliformes Totales (Todas las Coliformes de cualquier origen como suelo y vegetación), y Coliformes fecales (Coliformes exclusivas de origen fecal, ó sea el género *Escherichia*). Dentro de todas las coliformes solamente el género *Escherichia* y eventualmente la *Klebsiella*, tienen la capacidad de fermentar la lactosa no solo a 35-37° C, sino también a 44. 5° C.


	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

Tabla 1. Características del grupo coliforme

Prueba	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Citrobacter</i>
Glucosa	+	+	+	+
Gas glucosa	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	d
Indol	+	d	-	-
Rojo metilo	+	-	-	+
Voges-Proskauer	-	+	+	-
Citrato	-	+	+	+
Urea	-	+	+/-	d
Movilidad	+/-	-	+	+

d= dudoso


El hábitat natural de los coliformes es el tracto intestinal humano y animal, aunque también se pueden aislar de muestras medioambientales (tierra, polvo, aguas superficiales y vegetales). Así, su procedencia puede ser tanto fecal como no fecal. Los coliformes son resistentes a condiciones medioambientales adversas, soportan la desecación, pero no condiciones de congelación o refrigeración. Esta última característica hace que su investigación en alimentos congelados no tenga ninguna relevancia. Solamente son útiles como indicadores de la calidad en ciertos tipos de productos terminados o indicativos de la fase de conservación y almacenamiento.

En el grupo coliforme destacan por su mayor significación sanitaria los coliformes fecales, entendiéndose como tales aquellos capaces de desarrollarse entre 44 y 46°C (habitualmente 44,5° o 45,5°C) con producción de ácido y gas a partir de lactosa.

Otros microorganismos Coliformes

Streptococcus fecales como la especie lancefield del grupo D y Q que se encuentra en el intestino de mamíferos y aves. Los *Clostridium sulfito* reductor: bacterias esporuladas causantes de enfermedades como Botulismo, Gangrena gaseosa, Tétano, este género ofrece gran resistencia a los tratamientos de potabilización del agua por esto es de importancia su análisis.

El reglamento técnico sanitario para control de calidad de aguas potables de consumo humano establece como análisis microbiológico mínimo el de coliformes totales y fecales. El análisis normal incluye los dos grupos anteriores, más gérmenes totales. El análisis completo incluye los tres géneros de grupos antes mencionados, más *Streptococcus fecales*, *Clostridium sulfito* reductor y otros gérmenes patógenos.

	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

2.2 Notaciones

“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

“Informe de resultados”: se refiere a los informes de ensayo que emite el Laboratorio.

“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

3. REFERENCIAS.

[1] NTC 4092:2009 Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos-

[2] NTC4458: microbiología de alimentos y de alimentos para animales. metodo horizontal para el recuento de coliformes o escherichia coli o ambos. tecnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogenicos o cromogenicos

[3] Vocabulario internacional de metrología: conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 1er edición en español, 2008

[4] NTC4458: microbiología de alimentos y de alimentos para animales. metodo horizontal para el recuento de coliformes o escherichia coli o ambos. tecnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogenicos o cromogenicos

4. DESARROLLO

4.1 Aparatos y equipos

Tubos de ensayo
Cajas Petri con medio de cultivo
Campanas de Durham
Pipetas de 1 y 10 ml
Gradillas
Stomacher
Incubadora
Cámara o cabina de Siembra
Autoclave


Asa y/o rastrillo microbiológico
Material de vidrio necesario
Lámpara de Luz UV
Reactivo de Kovacs
Goteros y/o pipetasPaster
Mecheros

4.2 Requisitos técnicos de funcionamiento:

- Material debidamente lavado, secado y esterilizado (**Ver PROC-TC 026-027**)
- Especificados en el numeral 7.3

5.INSPECCIÓN VISUAL

5.1 Revisión general.

	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

Al recibirse el ítem en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se recibe en condiciones normales de operación y presentación física; y detectar cualquier anomalía en su recepción. Esta revisión es realizada conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-009 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio

5.2 Estabilización.

Una vez revisado el ítem, se aplican las siguientes instrucciones:

Los patrones de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo y el ítem se mantienen en el lugar de ensayo, y encendidos (si es el caso), por lo menos una hora antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. Se registra la hora de inicio y fin de esta estabilización.

Verificar y registrar en los formatos SOFT-TC-001 "Formato carta de control para humedad" y SOFT-TC-002 "Formato carta de control para temperatura ambiente" que las condiciones ambientales de afectación en el servicio se cumplan durante el ensayo del ítem:

Condición ambiental	Mínima	Máxima
Temperatura ambiente	19,00	27,00
Humedad relativa	35,00	65,00

Estas condiciones ambientales fueron identificadas con un efecto en el servicio realizado y sus límites permisibles fueron definidos en base a de los propios patrones del laboratorio, recomendaciones de normas aplicables y servicios realizados.

5.3 Verificación de patrones y otros equipos.

Antes de cualquier uso de los equipos se debe revisar la carpeta de mantenimientos y calibraciones, verificar que el equipo se encuentra en las condiciones adecuadas para su uso y no requiere alguna intervención.


A fin de confirmar que los patrones de referencia a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se realiza una verificación intermedia de acuerdo a PROC-TC-005 "Procedimiento de verificaciones intermedias de equipo

5.4 Manejo de la muestra.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

5.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: se debe revisar la carpeta de mantenimientos y calibraciones, verificar que el equipo se encuentra en

	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

las condiciones adecuadas para su uso de acuerdo a los manuales de operación de cada equipo (ubicados en el módulo 1 del laboratorio) y no requiere alguna intervención, verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio".

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún parámetro.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC- 015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo IX.

6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

6.1 Preparación de soluciones

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Solvente	Observaciones
Caldo Lauril Sulfato	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 9 ml por cada tubo y esterilizar.
Agua Peptonada estéril	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 9 ml por cada tubo de ensayo y esterilizar.
Agar EMB	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 – 20 ml de medio por cada caja Petri requerida.


Nota: En los tubos con el medio de cultivo Caldo Lauril Sulfato, colocar de forma invertida dentro del tubo la campana de Durham, teniendo la precaución de que no quede aire dentro de la campana.

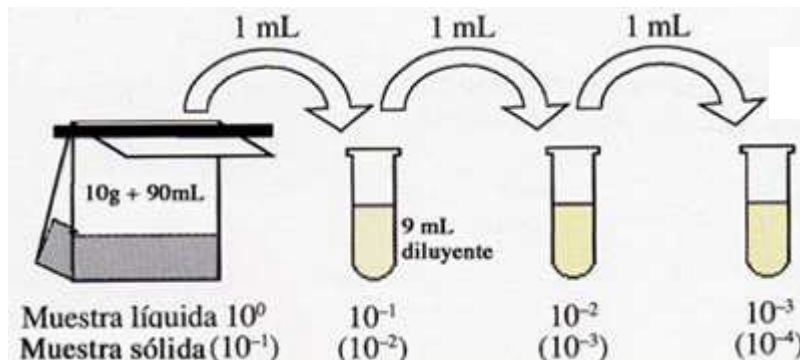
6.2 Preparación de la Muestra

- Seguir los pasos descritos en PROC-TC-015

6.3 Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa

Transfiera 1 ml de la muestra original al tubo 1 con 9 ml de medio de cultivo o solución buferada diluyente. Repita este procedimiento de tubo en tubo hasta obtener la dilución deseada.

	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10



Grafica 1: Diluciones seriadas

Nota: Tenga en cuenta el factor de dilución dependiendo de la naturaleza de la muestra (líquida o sólida).

6.4 Siembra en la serie de tubos para NMP

- Preparar tres series de tres tubos cada una con 10ml de caldo Lauril sulfato y campana Durham.
- Adicionar 1ml de cada una de las diluciones a cada uno de los tres tubos de cada serie:
 - ➔ A tres tubos de la primera serie se adiciona 1ml de dilución 10⁻¹ a cada tubo.
 - ➔ A tres tubos de la segunda serie se adiciona 1ml de dilución 10⁻² a cada tubo.
 - ➔ A tres tubos de la tercera serie se adiciona 1ml de dilución 10⁻³ a cada tubo.
- Incubar a 37°C durante 24 y 48 horas.
- Realice lecturas a las 24 y 48 horas.

Incubación: Debe ser registrada en el formato FOR-TC-017

7. INFORME.


El Laboratorio realiza el registro de los siguientes datos:

- ❖ Condiciones ambientales de influencia (si es necesario),
- ❖ Consecutivo de la muestra

7.1 Factores a ser controlados

El Laboratorio identifica los siguientes factores como sujetos a control durante el muestreo:

- Temperatura de muestreo
- Temperatura de transporte
- Homogenización de la muestra
- Controles de los medios de cultivo

	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y <i>E-coli</i> POR EL MÉTODO NÚMERO MÁS PROBABLE NMP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-018
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

7.2 Método de registro (observaciones y resultados)

Registro manual en los formatos del laboratorio: todas las anotaciones derivadas del desarrollo del método incluyendo cálculos y/o procedimientos anexos a la preparación de muestras, preparación de medios de cultivo, diluciones y/u otros y los resultados en los correspondientes formatos FOR-TC-014 (Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos), FOR-TC-015 (Formato para el control de tiempos y temperaturas de incubación).

8. RESPONSABILIDADES.

8.1 Líder de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

8.2 Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.

8.3 Analistas.

Aplicar el presente documento.

9. FORMATOS RELACIONADOS.

SOFT-TC-001 "Formato carta de control para la humedad"

SOFT-TC-002 "Formato carta de control para la temperatura ambiente"

FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio"

FOR-TC-014 "Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos"

FOR-TC-015 "Formato para el control de tiempos y temperaturas de incubación"

FOR-TC-045 Formato para el registro de información y asignación de lote de las soluciones preparadas para uso en los ensayos

10. ANEXOS.

No aplica