


aoxlab	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

Determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana




AOXLAB S.A.S


	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-246 Procedimiento para la determinación de la calidad del agua potable por la técnica de filtración por membrana


Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yeris Mercedes Rinaldy Mojica Duván Felipe Torrado García	Analistas de microbiología		2023-09-27
Revisó:	Lorena Correa Restrepo	Líder de laboratorio		2024-02-21
Aprobó:	Laura Stefanía Guerra Foronda	Director Técnico		2024-02-28
Localización del documento:	http://107.190.135.130/~aoxlabsgc/sig			

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29


Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Vigente	2022-11-19	1	Ninguno (Versión original)	YMRM/YLCR	APPP	DPP
Obsoleto	2023-05-24	2	Se detalla más la realización del ensayo y de los diferentes equipos e insumos utilizados	YMRM/DFT	YLCR	DPP
Obsoleto	2023-07-10	3	Se actualiza como debe ser el reporte de resultados	YMRM/DFT	YLCR	DPP
Obsoleto	2023-10-02	4	se actualiza el control de calidad acorde los lineamientos establecidos en la nueva versión del documento normativo	YMRM/DFT	YLCR	DPP
Vigente		5	Se especifica el recuento de mesófilos según la última edición del SM, se indica como se debe hacer el reporte en UFC/mL cuando sea requerido. Se actualiza la frecuencia de realización de controles positivos y negativos por cada cambio de lote de agar preparado.	DFT	YLCR	LSGF

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

ÍNDICE

1.	OBJETIVO Y ALCANCE	5
1.1.	Objetivo	5
1.2.	Alcance	5
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES	6
2.1.	Definiciones	6
2.2.	Notaciones	7
3.	REFERENCIAS	8
4.	DESARROLLO	8
4.1	Actividades previas	8
4.1.1	Inspección de la muestra	8
4.1.2	Estabilización	9
4.1.3	Verificación de equipos y áreas de ensayo	10
4.1.4	Manejo de la muestra	10
4.2	Patrones y equipos de medición	11
4.3	Materiales y consumibles	11
4.4	Medios de cultivo	11
5.	INSTRUCCIONES DE ENSAYO	12
5.1	Preparación de soluciones de trabajo	12
5.2	Procedimiento de ensayo	13
5.3	Lectura de placas	15
6.	ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	17
7.	RESPONSABILIDADES	19
8.	FORMATOS RELACIONADOS	20
9.	ANEXOS	20

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

1. OBJETIVO Y ALCANCE


1.1. Objetivo

Facilitar a través del siguiente instructivo las herramientas necesarias para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable, mediante la búsqueda y/o enumeración de microorganismos indicadores tales como aerobios mesófilos, coliformes totales, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, mohos y levaduras, utilizando la técnica de filtración por membra.

1.2. Alcance

Este método de detección o aislamiento se aplica a las muestras de agua potable que presuntivamente tienen baja carga microbiológica mediante el análisis de los siguientes ítems de ensayo.

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Determinación de aerobios mesófilos	Standard methods for the examination of water and wastewater 9215 D, 42023	Filtración por membrana: <ul style="list-style-type: none"> Filtros de 0,45 µm x 47mm (bacterias)
Determinación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Standard methods for the examination of water and wastewater 9213 E, 24:2023	
Determinación de coliformes totales Determinación de <i>E. Coli</i> .	ISO 9308-1:2014 ISO 9308-1:2014	
Determinación de mohos y levaduras.	Standard methods for the examination of water and wastewater 9610 D, 24:2023	Filtración por membrana: <ul style="list-style-type: none"> Filtros de 0,8 µm x 47 mm (mohos y levaduras)

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES

2.1. Definiciones

Análisis microbiológico del agua [1]: Procedimiento que se sigue para determinar la calidad microbiológica de una muestra de agua, mediante la identificación y enumeración de microorganismos indicadores y patógenos.

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.


Filtración por membrana [2]: Mecanismo mediante el cual por el paso de un fluido (agua) a través de una membrana, se atrapan microorganismos en la superficie de tal membrana porosa de celulosa, cuyo tamaño es mayor al tamaño del poro (0.45 μm), utilizando una bomba peristáltica eléctrica que ejerce una presión diferencial negativa sobre la muestra de agua permitiendo la retención de partículas mayores a 0.45 μm . Los contaminantes de menor tamaño al poro atraviesan la membrana mientras las bacterias quedan retenidas en el poro de la superficie de membrana.

Unidades de filtración [3]: Conjunto de sujeción del filtro (construido en vidrio, plástico autoclavable, porcelana o acero inoxidable) que consiste en un embudo sin costuras sujeto a una base que porta una membrana mediante un dispositivo de bloqueo o fuerza magnética. El diseño permite que el filtro de membrana se sostenga de forma segura en la placa porosa del receptáculo sin daño mecánico y permitir además el paso del fluido a través de la membrana durante la filtración.

Filtros de membrana de celulosa [3]: Filtro elaborado en celulosa, de naturaleza porosa, que permite la retención y recuperación de microorganismos con tamaños mayores iguales a los nominales. Algunos poseen una cuadrícula de puntos que facilita la retención y cuantificación de colonias bacterianas, levaduras, mohos, entre otros, con poros (mesh) de 0.45 μm de 47mm a mohos y levaduras se utilizan de 0.8 μm de 47 mm.

Colonia [4]: Acumulación visible localizada de masa microbiana, desarrollada sobre una superficie o dentro de un medio nutritivo sólido, a partir de una partícula viable. Para efectos técnicos la llamaremos UFC (Unidades Formadoras de Colonia) (unidad formadora de colonia), que es la unidad de cuantificación.

Coliformes [5]: Grupo de bacterias que presentan ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación de aguas y alimentos. Se encuentran comúnmente en plantas, suelos y animales, incluyendo los humanos. El grupo

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

coliforme está con conformado por géneros de patógenos tales como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*.

***Escherichia Coli* [5]:** Bacilo corto Gram negativo que forma parte de la flora normal de intestino de animales de sangre caliente. Es aerobio facultativo, de metabolismo fermentativo, con un punto óptimo de crecimiento a 37°C. Algunas cepas pueden producir enterotoxinas y tienen otros factores de virulencia de colonización e invasión, por lo cual pueden producir enfermedades diarreicas, así como infecciones urinarias y nosocomiales. Puede ser multirresistente a antibióticos. En casos graves, puede formar quistes en los intestinos, causando cáncer, puede alcanzar el hígado y llegar así al cerebro, volviéndose intratable.

Bacterias mesófilas aerobias y facultativas viables [6]: Grupo de Microorganismos que crecen en presencia de oxígeno o en tensiones menores de oxígeno, a temperaturas de incubación de entre 15 y 40°C.

***Pseudomonas aeruginosa* [2]:** bacilo corto Gram negativo que no forma parte de la flora normal humana, es un nosocomial multirresistente y patógeno emergente declarado actualmente por la OMS de importancia igual a los coliformes.

***Candida albicans* [4]:** levadura unicelular y/o filamentosa que produce infecciones nosocomiales tanto en órganos como en glándulas y tractos como el urogenital, donde se puede localizar. Puede presentar multi-resistencia a anti-micóticos.

Hongos filamentosos [4]: mohos (término en desuso) que crecen de forma micelar por efecto del crecimiento de hifas, que crece en la caja de Petri de forma peluda, seca y pulvirulenta que puede causar múltiples infecciones en la piel y los pulmones, los géneros más peligrosos son: *Aspergillus penicillum*, *Fusarium*, *Mucor*, entre otros.


UFC [2]: Unidad Formadora de Colonia. Es la unidad de medida de las colonias obtenidas de un microorganismo y sólo es aplicable para bacterias y levaduras unicelulares, no para mohos.

2.2. Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“Laboratorio”: se refiere al laboratorio de experimentación y análisis de muestras que para nuestro caso está ubicado en nuestro laboratorio AOXLAB S.A.S.

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

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

“Servicios”: se refiere a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece. Proceso de oferta a los clientes.

“Análisis”: procedimiento realizado a las muestras de los clientes para determinar la presencia de microorganismos patógenos o no.

“Cultivo”: resultado del procedimiento a la muestra de análisis, que permite el conteo de UFC y establece positividad o negatividad en lo referente a la presencia de microorganismos en la muestra.

3. REFERENCIAS.

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

[2] Lipps, W R., Baxter, T. & Braun E. (2023). Standard methods for the examination of water and wastewater. 24th edition. Washington, D.C., SM 9215 D Eterotrophic plate count – Membrane filter method.

[3] Determinación de *Escherichia coli* y coliformes totales en agua por el método de filtración por membrana en agar chromocult. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales

[4] AOAC 995.21-1999, Yeast and mold counts in foods Hydrophobic grid membrane filter.

[5] BS EN ISO 9308-1:2014 Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora

[6] NTC 3906:2017 - AZÚCAR. RECUENTO DE BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA


4. DESARROLLO.

4.1 Actividades previas.

4.1.1 Inspección de la muestra.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, ésta es inspeccionada a fin de asegurar que se garanticen las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 “Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio”.

Las muestras de agua a analizar pueden estar depositadas en botellas de vidrio estériles (proveídas por el cliente o por nosotros) con tiosulfato de sodio al 5% (0,5g por cada 100 mL) y

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

un volumen efectivo de al menos 400 mL, o también en bolsas plásticas *whirl pak* estériles con pastillas de tiosulfato sódico (proveídas por el cliente). El volumen mínimo para el análisis microbiológico de agua potable no envasada es de 400 mL, garantizando que se cuente con al menos 100 mL por cada microorganismo o parámetro a evaluar y 100 mL de muestra para cada duplicado. Para el agua envasada se debe contar con al menos 250mL de muestra por cada parámetro a evaluar y 250mL para su respectivo duplicado; así mismo, en los casos que se realicen tomas de muestras en frascos Schott y se requiera mayor o menor cantidad se debe ajustar la concentración de tiosulfato al volumen de muestreo; por último, antes de proceder con el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada, sellada herméticamente y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio (FOR-TC-124 “Formato de etiqueta para toma de muestras”)

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones exigidas, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

4.1.2 Estabilización.


Una vez revisada la muestra, se aplican las siguientes instrucciones:

- 4.1.2.1 Los patrones y equipos de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo como son las balanzas se mantienen encendidas en el sitio del análisis, antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. Las muestras objeto de análisis que están en refrigeración a una temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, se sacan y procesan inmediatamente para evitar desviaciones en el resultado. En casos excepcionales, la muestra refrigerada se puede almacenar máximo 24 horas antes de su análisis.

Condición ambiental	Mínima	Máxima	Observación
Temperatura ambiente	18,00 °C	25,00 °C	Condiciones establecidas por el laboratorio
Humedad relativa	20,00 °C	70,00 °C	Condiciones establecidas por el laboratorio

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

Estas condiciones son monitoreadas y registradas automáticamente por el software 3sense del laboratorio.

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

4.1.3 Verificación de equipos y áreas de ensayo

Para garantizar las condiciones óptimas del análisis, se debe realizar una adecuada limpieza y desinfección de mesones, implementos de ensayo y aspersion de ambiente, teniendo en cuenta la frecuencia y tiempo de uso de los agentes desinfectantes establecidos en el laboratorio de microbiología. Para la realización de aspersiones de las diferentes áreas: alcohol al 70%, amonio cuaternario a 200 mg/L, acido peracético a 200 mg/L, y para la desinfección de superficies con amonio cuaternario a 400 mg/L, hipoclorito de sodio a 500 mg/L y acido peracético a 300 mg/L, tal como se describe en el PROC-TC-031.

4.1.4 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.

Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar en refrigeración en bolsas whirl pak que contengan pastillas de tiosulfato de sodio o frascos estériles.

4.1.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio:

- 4.1.5.1 Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento del equipo se encuentre vigente (ubicados en el módulo 1 del laboratorio) y no requiere alguna intervención.
- 4.1.5.2 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" y garantizar que ninguno se encuentre vencido y que no presenten contaminación en caso de los medios de cultivo.
- 4.1.5.3 En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.
- 4.1.5.4 Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún parámetro.
- 4.1.5.5 Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC- 015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XIII.

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

4.2 Patrones y equipos de medición.

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:


- Balanza digital código 170 capacidad máxima 2000 g
- Bomba de vacío de diafragma presión máxima 95Kpa y flujo de aire de 24L/m
- Incubadora de aire calibrada a 35 ± 1 °C
- Incubadora de aire calibrada a 25 ± 2 °C
- Equipo de filtración por membrana
- Probeta volumétrica tipo A de 50 y 100 mL

4.3 Materiales y consumibles

- Guantes de nitrilo
- Mascarilla, tapabocas, gafas protectoras
- Filtros de membrana de 0.45 µm para recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa
- Filtros de membrana de 0.8 µm para recuento de mohos (hongos filamentosos) y levaduras
- Bolsas whirl pak estériles con tiosulfato de sodio
- Transferpipeta de 10 mL
- Cajas de Petri plásticas estériles de 60 x15 mm
- Pinzas metálicas de 12 cm
- Etanol al 70%
- Lámpara convencional ≥ 1000 Lux
- Lámpara ultravioleta 253.7 nanómetros
- Mechero de bunsen para gas propano y natural
- Recipiente de polisulfona de 400 mL
- Embudo de vidrio para filtración
- Sistema de filtración múltiple Manifold de tres puestos EZ- Fit™
- Matraces con desprendimiento lateral de 500 mL y 1000 mL.
- Reactivo kovac´s
- Tirilla indicadora de oxidasa
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Cepas patrón de Escherichia coli ATCC 25922, Klebsiella aerogenes ATCC: 13048, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27583 y Candida albicans ATCC 10231

El material reutilizable debe haber sido previamente lavado secado y esterilizado (Ver PROC-TC 026-027)

4.4 Medios de cultivo

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

- Agar YGC servido en cajas de Petri
- Agar Cromogénico *Escherichia coli* servido en cajas de Petri
- Agar Cetrimida servido en cajas de Petri
- Agar Plate Count servido en cajas de Petri


Preparados según PROC-TC- 206 “Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo”

- Las suspensiones bacterianas para los controles positivos de *Escherichia coli* ATTC 25922, *Klebsiella aerogenes* ATTC: 13048, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 deben estar a un nivel de concentración de aproximadamente 25 – 80 UFC. La preparación de las suspensiones debe realizarse según los lineamientos establecidos según el PROC-TC-207 “procedimiento para la preparación de suspensiones microbianas”.

5. INSTRUCCIONES DE ENSAYO

5.1 Preparación de soluciones de trabajo

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Diluyente (Agua destilada)	Observaciones
Agar YGC	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Servir de 10 a 15 ml en caja Petri pequeña (60mm)
Agar Cromogénico <i>Escherichia coli</i>	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Servir de 10 a 15 ml en caja Petri pequeña (60mm)
Agar Plate Count	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Servir de 10 a 15 ml en caja Petri pequeña (60mm)
Agar cetrimida	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Servir de 10 a 15 ml en caja Petri pequeña (60mm) o de 15 a 20 mL en caja grande (90 mm)
Agua Peptona estéril	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar frascos schott de 90 mL o de 1000 mL

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

El registro de la preparación de estas soluciones se diligencia en el FOR-TC 045 en la plataforma analítica

5.2 Procedimiento de ensayo

Antes de iniciar con el análisis de las muestras, se debe desinfectar completamente el área de trabajo mediante aspersiones con amonio cuaternario a 200 mg/L o etanol al 70%. Una vez se encuentren marcadas las placas de Petri con el correspondiente código de la muestra a analizar, se debe conectar la bomba de vacío a una fuente de energía de 120 V y a su vez, conectar la manguerilla de silicona del sistema de filtración, al embudo sobre el que se filtrarán las muestras.

1. Ensamblar el sistema de filtración manifold con la bomba de vacío cuando se requiera realizar el proceso de manera múltiple o se puede realizar el montaje de forma individual conectando la bomba de vacío con un matraz volumétrico de 500 mL o 1000 mL.



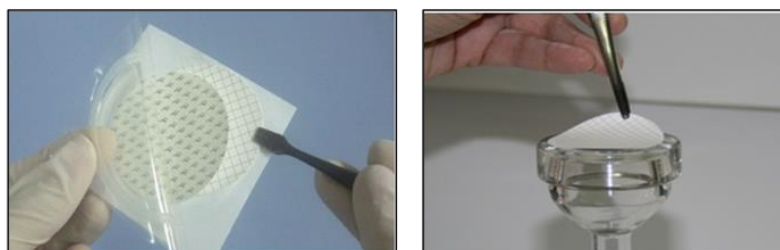
2. Conecte el mechero de bunsen a la fuente de gas propano o natural y encienda la llama la cual puede ser regulada por el tornillo de paso de aire.



3. Una vez se encuentre listo el sistema de filtración, se debe aflojar la tapa del embudo receptor sobre el que se depositará la muestra de agua y desenroscarlo de la base para después facilitar la manipulación con la membrana de celulosa.
4. A continuación, es necesario ubicar la membrana estéril sobre el porta filtros, mediante el uso de una pinza que se debe desinfectar flameando con etanol al 70%; además, se


aoxlab	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

debe tener en cuenta que la cuadrícula de la membrana siempre debe estar en posición hacia arriba y el anillo plástico debe estar fijo como base en el embudo al momento de depositarla.



5. Una vez ubicada la membrana de celulosa en el embudo receptor, se debe enroscar el embudo a la base del sistema de filtración, con la precaución de no romper los bordes de la membrana durante el ajuste.
6. Antes de abrir la muestra homogenice suavemente de forma manual para facilitar la distribución uniforme de la carga natural microbiana y desinfecte la parte externa de la bolsa o el recipiente contenedor con alcohol al 70%.
7. Verter 100mL de la muestra en una probeta volumétrica de 100 mL por cada parámetro a analizar, es decir, se deben filtrar máximo 100 mL de la muestra por cada filtro de celulosa.
8. Posterior a esto, se debe encender la bomba de vacío de 95 Kpa para llevar a cabo el proceso de filtrado y una vez haya pasado completamente el líquido sobre la membrana, se debe apagar inmediatamente el equipo antes de retirar el filtro de membrana con la pinza previamente esterilizada.
9. Es importante recalcar que, dentro del análisis de cada muestra, se debe realizar un lavado al embudo de filtración con 20 a 30 mL de agua destilada estéril, por cada 100mL de muestra o parámetro a analizar.
10. Retire el filtro del sistema y coloque la membrana con la parte de la cuadrícula hacia arriba sobre la superficie del medio de cultivo, evitando la formación de burbujas poniendo en contacto la membrana con el agar, inicialmente formando un ángulo de 45° y deslizar suavemente sobre la superficie del medio de cultivo.
11. Finalmente, dejar reposando las cajas de Petri mínimo 5 minutos y máximo 30 minutos en el mesón, para permitir la adhesión de la membrana al medio de cultivo, antes de llevarlas a la incubadora, y como paso preliminar a la incubación de forma invertida en los tiempos y temperaturas que correspondan a cualquiera de los microorganismos a evaluar y que se resumen en la siguiente tabla:

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
----------------	------------------	---------------------------	----------------------

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

<i>E. coli</i> , coliformes totales	Agar cromogénico	36°C ± 2°C	18-24 h
Aerobios mesófilos	Agar PCA, TSA	35°C ± 0,5°C	48 h±3h
Mohos y levaduras	Agar YGC, Rosa Bengala; Sabouraud	20°C – 25 °C	5 días
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar cetrimide	35°C ± 1°C	24-48 h

5.3 Lectura de placas


La lectura de placas se realiza utilizando una fuente de luz amplificada que proporcione una visión óptica que no produzca reflejos. Para *Pseudomonas* se usa lámpara ultravioleta

5.3.1 Determinación de aerobios mesófilos: seleccione todas las colonias visibles de en el filtro de membrana que contengan de 20 a 200 UFC.

5.3.2 Determinación de mohos y levaduras: seleccione las placas que contengan de 20 a 100 UFC dentro del filtro de membrana, diferenciando entre levadura y hongos por morfología de colonias, las cuales pueden variar en tamaños y tonalidades, el color de las levaduras puede variar desde beige, cremas, rosadas o naranjas; las colonias de mohos son grandes con bordes difusos y de colores variables según el género de microorganismo. Para confirmar las colonias de levaduras realice de ser necesario una tinción de Gram y observar en el microscopio en el objetivo de 40x, según el PROC-TC-078, las cuales se observan células grandes con núcleo visible y generalmente en proceso de gemación.

5.3.3 Determinación de coliformes totales y *Escherichia coli*: seleccione las placas que contengan de 20 a 80 UFC dentro del filtro de membrana. El conteo de bacterias de coliformes totales se determina con la suma de las colonias rosadas a rojas más todas las colonias de color azul oscuro a violeta, las cuales corresponden a las colonias diferenciadas de *E. coli* dependiendo del indicador del medio de cultivo utilizado. Realice la verificación de las colonias de *E. Coli*, de acuerdo con el numeral 5.4 utilizando la prueba rápida de citocromo oxidasa con una tirilla indicadora, tomando al menos 10 colonias sospechosas, (las cuales dan una reacción negativa), y además realizar prueba de indol que debe ser positiva

5.3.4 Determinación de *Pseudomonas aeruginosa*: seleccione las placas que contengan de 20 a 80 UFC dentro del filtro de membrana, las cuales se observan rodeadas de un pigmento azul-verdoso y presentan fluorescencia con luz ultravioleta de 254 nm. Confirmar las colonias presuntivas con prueba de catalasa y oxidasa.

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

5.4 Pruebas confirmatorias:

5.4.1 Prueba de indol: Para los casos en los que se requiera confirmar colonias, se deben tomar de ser posible todas las colonias típicas de cada uno de los microorganismos descritas el numeral 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3, 5.3.4 o en su defecto mínimo 10 colonias sospechosas y transferirlas a un tubo que contiene agua peptona con triptófano. Incubar por $21h \pm 3h$ a $44,0^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$ y posterior adicionar entre 4-8 gotas de reactivo kovac's y observar presencia de coloración del anillo: la reacción es positiva si el anillo es de color rojo cereza y es negativa si el anillo es amarillo-marrón.


5.4.2 Prueba de oxidasa: Para los casos en los que se requiera confirmar colonias, se deben tomar de ser posible todas las colonias típicas de cada uno de los microorganismos descritas el numeral 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3, 5.3.4 o en su defecto mínimo 10 colonias sospechosas y ponerlas sobre una tirilla indicadora de oxidasa durante 20-60 segundos y observar la reacción negativa característica con la coloración en la tirilla. La reacción es positiva si la tirilla toma color morado o púrpura y si es negativa la coloración no vira o es amarilla.

5.4.3 Prueba de catalasa: Para los casos en los que se requiera confirmar colonias, se deben tomar de ser posible todas las colonias típicas de cada uno de los microorganismos descritas el numeral 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3, 5.3.4 o en su defecto mínimo 10 colonias sospechosas, extender sobre una placa portaobjetos y adicionar 1-2 gotas de peróxido de hidrogeno. La reacción característica debe ser positiva y por ende se deben evidenciar la presencia inmediata de burbujas producto de la reacción.

5.5 Expresión de resultados

Para llevar a cabo el conteo y la emisión de resultados sobre las colonias obtenidas en cada muestra, es esencial examinar el desarrollo de las colonias dentro de cada cuadrante de los filtros de celulosa.

- En situaciones en las cuales se identifiquen menos de 2 colonias por cada cuadrante, se debe realizar el conteo de todos los cuadrantes con colonias y reportar los resultados en unidades formadoras de colonias por cada 100 mililitros (UFC/100mL).
- En el caso de las muestras que presenten entre 3 y 10 colonias por cuadrante, es necesario contar de manera aleatoria 10 cuadrantes, sumar todas las colonias obtenidas,

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

dividir la suma por el número de cuadrantes (10), y luego multiplicar el resultado por el volumen filtrado de 100 mL. El resultado se debe reportar en unidades formadoras de colonias por cada 100 mililitros (UFC/100mL).


- Para muestras en las cuales se registren entre 10 y 20 colonias por cada cuadrante, se procederá a contar de forma aleatoria 5 cuadrantes. Posteriormente, se sumarán todas las colonias obtenidas, se dividirá esta suma por el número de cuadrantes contados (5), y finalmente, el resultado se multiplicará por el volumen filtrado de 100 mL. La información resultante se deberá reportar en unidades formadoras de colonias por cada 100 mililitros (UFC/100mL).
- Para las muestras que tengan más de 20 colonias por cuadrante se debe reportar mayor al límite de conteo del método (>200 UFC/100mL)
- En los casos donde no se observan colonias se reportará como <1 UFC/100 mL (No detectable)
- Para las muestras que por su naturaleza requieran diluirse, es necesario además de lo mencionado anteriormente, multiplicar por el inverso del factor de dilución empleado.
- En los casos que por especificación del cliente u otras directrices se deba reportar en UFC/mL, se divide el total de las colonias obtenidas en la placa y se divide por el volumen filtrado.

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{colonies counted}}{\text{actual volume of sample plated, mL}}$$

6. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, se debe realizar control de esterilidad del material para cada lote de análisis. De igual manera, se debe llevar a cabo el proceso de limpieza los embudos y mangueras, así como también realizar un control de esterilidad filtrando el diluyente empleado en los casos que se requieran diluciones para llevar a cabo el ensayo. Se debe realizar controles positivos y negativos por cada cambio de lote de agar preparado.

Como controles positivos se pueden contaminar porciones de agua potable de 100mL con suspensión bacteriana de los siguientes microorganismos para los diferentes ensayos y analizarlos por duplicado para tener en cuenta el control y la desviación estadística de los resultados de las muestras y sus respectivos duplicados.

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

CULTIVO	Recuento de aerobios	Coliformes totales	<i>E. Coli</i>	Y&M	<i>Pseudomonas aureuginosa</i>
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231				X	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922,	X		X		
<i>Klebsiella aerogenes</i> ATCC: 13048	X	X			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					X


Estas suspensiones deben prepararse de acuerdo con las instrucciones establecidas en el procedimiento PROC-TC-207 procedimiento para la preparación de suspensiones microbianas.

Como control negativo se filtran 100mL de agua destilada estéril. Los controles se realizan semanalmente de acuerdo con cada parámetro a ensayar de las muestras con una concentración de aproximadamente de 20 a 80 UFC en 100 mL. La totalidad de cada una de estas porciones se filtran y se incuban según corresponda.

Variabilidad del recuento de colonias: para evaluaciones de desempeño de rutina, los analistas deben repetir los recuentos en una o más muestras positivas al menos una vez al mes y registrar los resultados. Sólo se realiza un conteo oficialmente durante el ensayo. Al comparar recuentos entre 2 analistas, cada analista cuenta la misma placa una vez. Al comparar 3 o más analistas, utilice un método de evaluación estadística. Los recuentos replicados por 1 analista deben coincidir dentro del 5% (repetibilidad); los recuentos realizados por 2 o más analistas deben coincidir dentro del 10% (reproducibilidad).

Precisión de los métodos: La precisión (repetibilidad) de los resultados analíticos cuantitativos al contar colonias en placas se evalúa mediante análisis repetidos. Utilice recuentos repetidos de solo 1 dilución para determinar la precisión. Para el ensayo de mesófilos aerobios, analice el 10 % de las muestras de rutina por duplicado o una por lote. Para los ensayos de mohos y levaduras, coliformes totales y *E. Coli*, semanalmente enriquecer una muestra con los microorganismos apropiados y realizar los ensayos por duplicado, para el caso de *Pseudomonas aureuginosa*, el día que se analice se debe montar por duplicado y se debe montar un control positivo con adición de este microorganismo. Si la RPD supera el límite de control, existe un 99% de probabilidad de que la variabilidad del laboratorio sea excesiva. Descarte todos los resultados analíticos desde la última verificación de precisión.

Participación en ensayos de aptitud: Debe participarse con un desempeño satisfactorio por lo menos una vez al año en un ensayo de aptitud que cubra el intervalo de operación de los ensayos, microorganismos y matrices. Este debe ser provisto por un proveedor competente, de

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-011 Procedimiento para la selección y participación en ensayos de aptitud.

7. RESPONSABILIDADES

Director técnico.


- Asegurar la aplicación del presente documento-protocolo y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

Director de Calidad.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

Líder de Laboratorio.

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

	Procedimiento para la determinación de la calidad microbiológica del agua potable por la técnica de filtración por membrana AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-246
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2024-02-29

Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.
- Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

8. FORMATOS RELACIONADOS

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

FOR-TC-075 Formato para el registro de datos primarios de análisis microbiológicos

9. ANEXOS

No aplica