



**Método de Filtración por
membrana en medios
cromogénicos para coliformes
totales y *Escherichia coli***

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA NORMA IRAM 29107-1

(Implementación Febrero 2014)

VENTAJAS

Resultados
en 24 hs

Mayor
capacidad
analítica

Optimización
de tiempos de
trabajo

- ✓ Alerta Temprana de riesgo sanitario
- ✓ Mejor capacidad de reacción ante un evento
- ✓ Rapidez en aplicación de acciones correctivas

TIEMPOS DE RESPUESTA DESDE LA SIEMBRA DE LA MUESTRAS

ETAPA	TUBOS MÚLTIPLES	FILTRACION EN MEDIO CROMOGENICO
Presuntiva	24 -48 hs	24 hs
Confirmatoria para E coli	48-72hs	1 min
Resultado final	3 - 5 días	24 hs

DOCUMENTOS NORMATIVOS DE REFERENCIA

NORMA IRAM 29107-1: 2015 “Detección y recuento de bacterias Coliformes y de *Escherichia coli*”.

Parte 1- Método de filtración por membrana para agua con bajo contenido de flora bacteriana. Homóloga a la **NORMA ISO 9308 – 1: 2014**

Participación de OSSE en el Comité IRAM Norma 29107 – 1



ESQUEMA 1

DE NORMA IRAM 29107-1*

Calidad ambiental - Calidad del agua

Detección y recuento de bacterias coliformes y de *Escherichia coli*
Parte 1 - Método de filtración por membrana para agua con bajo contenido de bacterias

Environmental quality - Water quality.
Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria.
Part 1 - Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora

LAS OBSERVACIONES DEBEN
ENVIARSE CON EL FORMULARIO DE LA
ETAPA DE DISCUSIÓN PÚBLICA

* Corresponde a la revisión de la IRAM 29107-1:2006.

Anexo G (Informativo)

Integrantes del organismo de estudio

El estudio de esta norma ha estado a cargo del organismo respectivo, Integrado en la forma siguiente:

Comisión de SC2 Agua, Métodos de Análisis Microbiológicos

Integrante	Representa a:
Dra. Mara AFTYKA	AGUAS DE SANTIAGO S.A.
Lic. Ana Paula COMINO	OBRAS SANITARIAS DE MAR DEL PLATA
Lic. Adriana MORON	AYSA – AGUA Y SANEAMIENTOS ARGENTINOS S. A.
Dra. Ana María PALERMO	CITEDEF - INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS PARA LA DEFENSA
Dra. Estela PLANES	INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL (INTI)
Lic. Adriana RODOLOSI	AYSA – AGUA Y SANEAMIENTOS ARGENTINOS S. A.
Dra. Graciela SANGUINETTI	UNR - UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
Vet. Eugenio VAZQUEZ	AYSA – AGUA Y SANEAMIENTOS ARGENTINOS S. A.
Lic. Cecilia BLANCO	IRAM
Lic. Valeria CARRERAS	IRAM

LEGISLACIÓN VIGENTE:

Ley N°11820/96 de la ADA Provincia de Bs As “Anexo A”, (Normas para la Calidad del Agua potable).

**ANEXO A:
NORMAS DE CALIDAD PARA EL AGUA POTABLE-
FRECUENCIA DE MUESTREO
TECNICAS ANALITICAS**

**TABLA I:
LIMITES TOLERABLES PARA LOS COMPONENTES
MICROBIOLOGICOS BASICOS**

A. AGUA QUE ENTRA EN EL SISTEMA DE DISTRIBUCION

LIMITE TOLERABLE (según método de análisis)

TUBOS MULTIPLES	MEMBRANA FILTRANTE
Coliformes totales <2,2 NMP/100ml	Coliformes totales Ausencia /100ml
E. coli <2,2 NMP/100ml	E. coli Ausencia /100ml

B AGUA EN LA RED DE DISTRIBUCION

LIMITE TOLERABLE (según método de análisis)

TUBOS MULTIPLES	MEMBRANA FILTRANTE
Coliformes totales <2,2 NMP/100ml	Coliformes totales Ausencia /100ml
E. coli <2,2 NMP/100ml	E. coli Ausencia /100ml

PRINCIPIO

Este método se basa en la ***filtración de la muestra*** de agua a través de una membrana de celulosa que retiene las bacterias.

Seguida de la ***incubación en agar cromogénico***.

Finalmente, ***identificación y recuento*** de las colonias del grupo coliformes.

MEDIOS DE CULTIVO CROMOGENICOS

Es un medio microbiológico adecuado para la ***incubación, diferenciación o selección*** de microorganismos, usando un sustrato cromogénico que da como resultado un color.

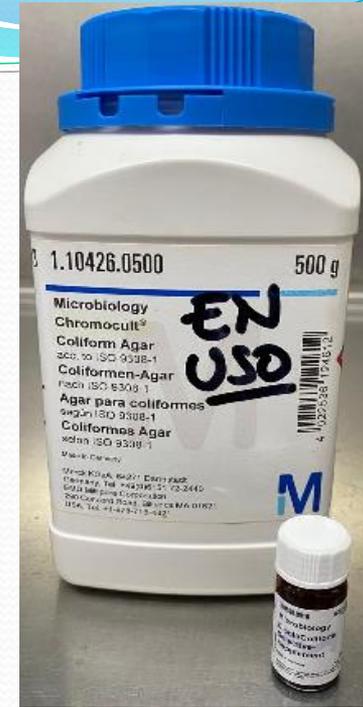
Este color será característico de cada microorganismo siendo más fácil y precisa la diferenciación.

CHROMOCULT COLIFORM AGAR

E.coli / Coliformes (Merck)

+ suplemento selectivo

Sustrato + Enzimas → Color



	Sustrato Cromogénico Salmon-GAL	Sustrato Cromogénico X-Glucuronide	Color
Coliformes totales β -D-galactosidasa	+	-	Rosa- Roja
<i>Escherichia coli</i> β -D-glucuronidasa	+	+	Azul

INTRUMENTAL Y EQUIPOS

- Filtros de membranas de ésteres de celulosa o equivalente de 47 mm a 50 mm de diámetro y de poro nominal de 0,45 μm . Preferentemente reticuladas.
- Placas de Petri plásticas estériles de 55 mm de diámetro.
- Pinza de acero inoxidable de puntas redondeadas.
- Estufa de incubación (36 ± 2 °C).
- Contenedor plástico o de vidrio con tapa para incubar las muestras en condiciones de humedad.

NUEVA ISO 9308-1 (2014)

Filtración de 100 ml de agua
filtro de 0,45 µm

Chromocult® Agar para coliformes
21 ± 3 h a 36 ± 2 °C

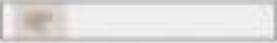
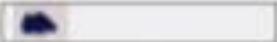
Coliformes
colonias rojas

E. coli
colonias violetas

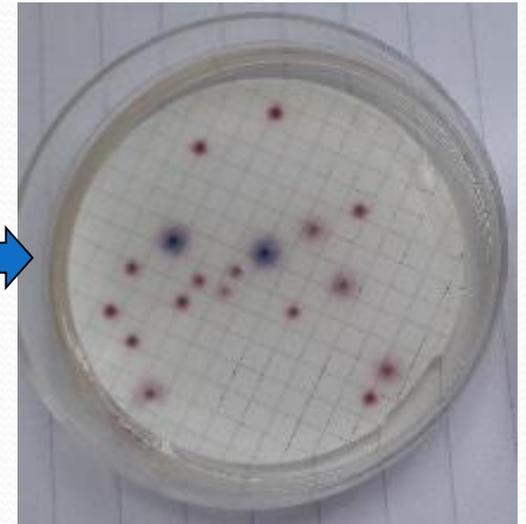
Colonias rojas
con oxidasa
Bactident

E. coli
confirmado
✓



Coliformes	-	
No-Coliformes	+	

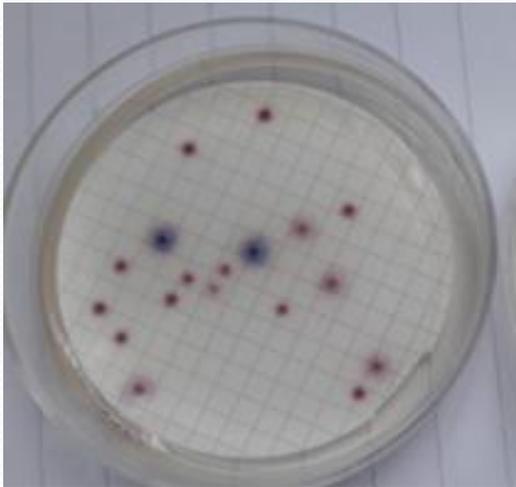
Equipo de filtración



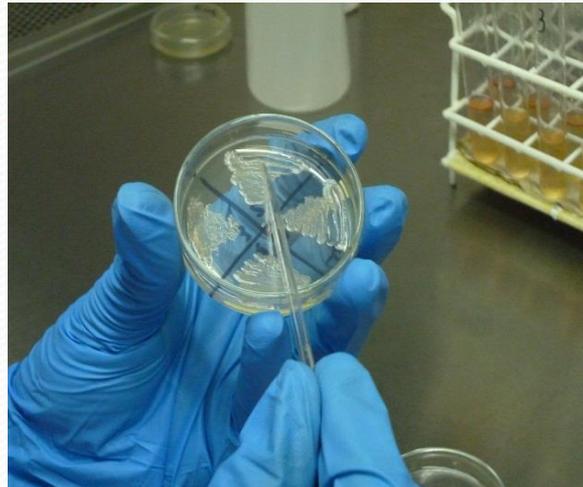
CONFIRMACION DE COLIFORMES TOTALES

Identificación Bioquímica de las colonias típicas coliformes no *E.coli*

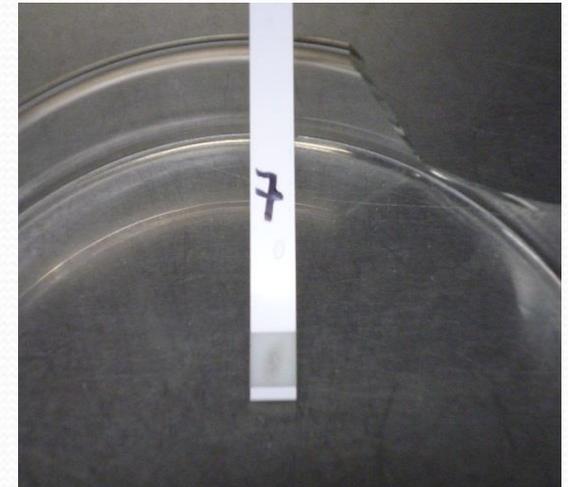
Colonias
rosadas



Incubación en
PCA/ TSA
24 hs a 36°C



Confirmación



Confirmación bacterias coliformes: No desarrolla coloración
Reacción oxidasa negativa (-)

LIMITACIÓN

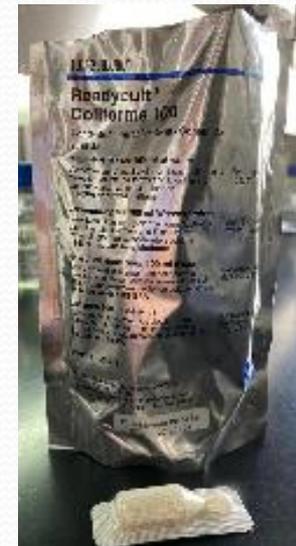
Para muestras con abundantes sedimentos se produce la sobresaturación de la membrana filtrante.

Esto impide la identificación y cuantificación de las colonias.



Método Readycult para Coliformes totales y E.Coli (resultado a las 24 hs)

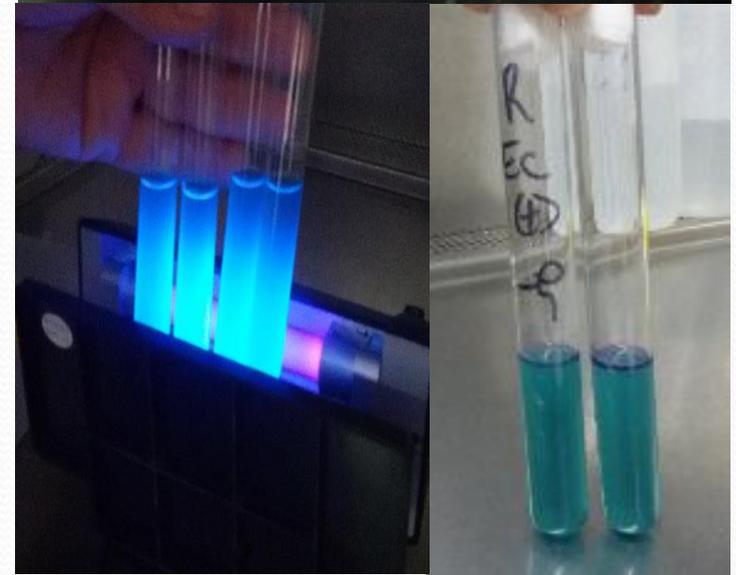
- Presencia/ Ausencia
- Cuantificación



Presencia/ Ausencia



Cuantificación



	Cambio de color a azul-verdoso	Fluorescencia	Reacción Indol
Coliformes totales	+	-	-
E.coli	+	+	+
Negativo	Sin cambio de color		

Control de calidad

- **Control de incubadora:** perfil térmico del proceso mediante un Datalogger TESTO . Carta de control
- **Control del baño termostático:** registro de temperatura del baño. Carta de control
- **Control de heladera:** perfil térmico mediante data logger TESTO. Control de temperatura y humedad relativa en heladera donde se almacenan los medios de cultivo.
- **Control de campana de flujo laminar:** técnica de recuento de bacterias heterótrofas en Agar Plate Count.
- **Control de autoclave:** se descargan los ciclos de esterilización. Asistencia técnica anual.

- **Control de medios de cultivo:** Verificación de desempeño del medio Chromcult Coliform Agar : *productividad, selectividad y especificidad* con cepas de referencia por cada lote. Controles positivos diarios.
- **Control de esterilidad de frascos de muestreo:** control bacteriológico de un frasco por lote esterilizado.
- **Control del equipo de filtración:** Blancos de reacción previos a la filtración de las muestras. También se verifica y registra la presencia de rayaduras superficiales o pérdidas.
- **Control de pipetas:** Calibración y registro de las mismas.
- **Control de ultrafreezer:** Registro de temperatura diario. Carta de control.
- **Control de Balanza:** Calibración y mantenimiento anual.

- **Control de Agua y Buffer:** control de esterilidad de cada lote. Registro de resultados y fecha de esterilización.
- **Cepas de referencia:** Ceparío en ultrafreezer y libro de registros de ceparío.
 - Cepas de trabajo evaluando: pureza, viabilidad y morfología.
 - Control periódico de las cepas de referencia para cultivos Stock y de trabajo.

Autoclave



Ultrafreezer

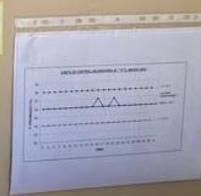


Baño termostático

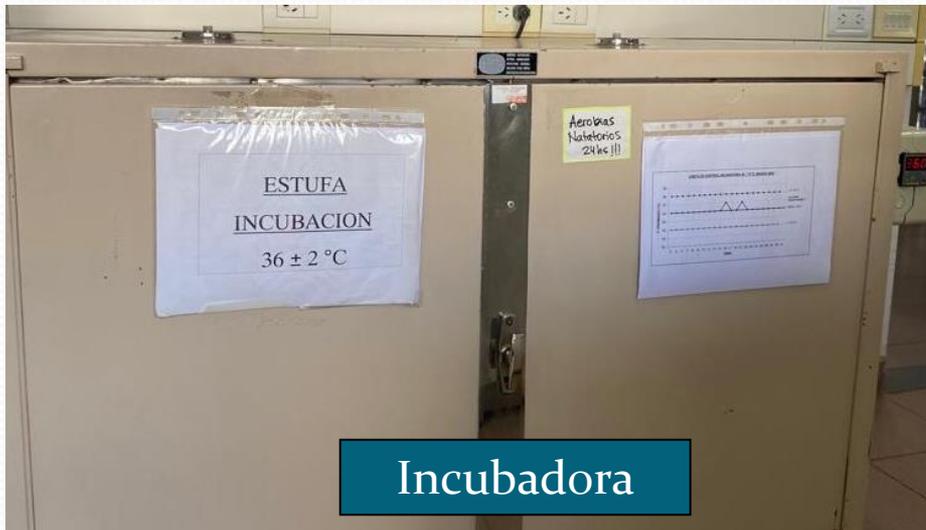


ESTUFA
INCUBACION
36 ± 2 °C

Aerobias
Nastetorios
24hc !!!



Incubadora



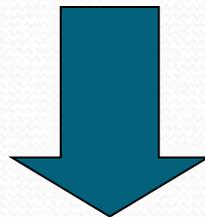
Campana



• **TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA SEGÚN LA NORMA IRAM 29107-1**

• **CONTROL DE EQUIPOS DEL LABORATORIO**

• **ENSAYOS INTERLABORATORIOS**



ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD