

PROPUESTA DE IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD SEGÚN LA NTC ISO/IEC 17025:2017 EN EL PROCESO DE MICROBIOLOGIA DE UN LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL.

JORGE ALBERTO MEJÍA OLAYA

FUNDACION UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE EDUCACIÓN PERMANENTE Y AVANZADA
ESPECIALIZACIÓN EN GERENCIA DE LA CALIDAD
BOGOTÁ D.C.
2018

PROPUESTA DE IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD SEGÚN LA NTC ISO/IEC 17025:2017 EN EL PROCESO DE MICROBIOLOGIA DE UN LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL.

JORGE ALBERTO MEJÍA OLAYA

Monografía para optar el título de Especialista en Gerencia de la Calidad

Orientador:

Angélica María Alzate Ibáñez
Magíster, Ingeniera Química

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE EDUCACIÓN PERMANENTE Y AVANZADA
ESPECIALIZACIÓN GERENCIA DE LA CALIDAD
BOGOTA D.C.
2018

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del Director de la Especialización

Firma del calificador

Bogotá D.C., Marzo de 2018

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrectora Académica y de Posgrado

Dra. Ana Josefa Herrera Vargas

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García Peña

Secretario General

Dr. Juan Carlos Posada García Peña

Decano Facultad de Educación Permanente y Avanzada

Dr. Luis Fernando Romero Suarez

Director Especialización en Gerencia de la Calidad

Dr. Emerson Mahecha Roa

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

A todas las personas que me apoyaron en este proceso; a mis padres porque son mi ayuda incondicional y a mis compañeros de la especialización: Cindy, Ximena, Nataly, Adriana, Carolina, Carlos, por que hicieron este camino más ameno y siempre estuvieron para brindarme su apoyo y a todos los docente por el conocimiento transmitido.

GRACIAS.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	16
1. MARCO TEORICO	17
1.1 LA CALIDAD EN EL LABORATORIO	17
1.2 LAS BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO (BPLS)	18
1.3 NORMA ISO 9001:2015	18
1.4 LA NORMA ISO 17025	19
1.5 CALIDAD INTERLABORATORIO	21
2. EMPRESA CASO DE ESTUDIO	24
2.1 HISTORIA	24
2.2 MISIÓN	24
2.3 VISIÓN	24
2.4 GENERALIDADES	24
2.5 VALORES ORGANIZACIONALES	26
2.6 ACREDITACIONES	27
3. METODOLOGIA	28
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	28
3.2 OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN	28
3.3 POBLACIÓN	28
3.4 ETAPAS DEL PROYECTO	28
4. DIAGNOSTICO ACERCA DE LOS ELEMENTOS DE LA NORMA ISO 17025 CON QUE SE CUENTA EN EL LABORATORIO	30
4.1 NECESIDADES Y EXPECTATIVAS DEL CLIENTE	30
4.2 DIAGNÓSTICO DEL ESTADO DE LA EMPRESA FRENTE A LOS REQUISITOS DE LA ISO 17025:2017	31
4.2.1 Numeral 4, 4.1. y 4.2:	31
4.2.2 Numeral 5. Requerimientos estructurales:	31
4.2.3 Numeral 6. Requerimientos de recursos:	32
4.2.3.1 6.1. Personal:	32
4.2.3.2 6.2. Instalaciones del laboratorio y condiciones ambientales:	32
4.2.3.3 6.3. Equipos:	32
4.2.3.4 6.4. Trazabilidad de las mediciones:	32
4.2.4 Numeral 7. Requerimientos del proceso:	32
4.2.4.1 7.1. Revisión de solicitudes, contratos y licitaciones	33
4.2.4.2 7.2. Selección, verificación y validación de métodos	33
4.2.4.3 7.3. Muestreo:	33
4.2.4.4 7.4. Manejo de los ítems de prueba o calibración:	33
4.2.4.5 7.5. Registros técnicos:	33
4.2.4.6 7.6. Evaluación de la incertidumbre:	33
4.2.4.7 7.7. Aseguramiento de la calidad de los resultados:	33
4.2.4.8 7.8. Reporte de resultados:	34

4.2.4.9 7.9. y 7.10. Quejas y manejo de trabajo no conforme:	34
4.2.4.10 7.11. Control de datos y manejo de la información:	34
4.2.5 Numeral 8. Requisitos de Gestión:	34
5. ETAPAS Y ACTIVIDADES NECESARIAS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL PROCESO DE MICROBIOLOGÍA DE ACUERDO A LOS REQUISITOS DE LA ISO 17025:2017	35
5.1 ETAPA DE PLANIFICACIÓN.	35
5.2 ETAPA DE IMPLEMENTACIÓN	36
5.3 ETAPA DE ACREDITACIÓN	38
6. PROCESO DE MICROBIOLOGÍA: INTERACCIONES, ENTRADAS, SALIDAS, RECURSOS Y RESPONSABILIDADES.	39
6.1 MAPA DE PROCESOS DE LA COMPAÑÍA Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROBIOLOGÍA	39
6.2 ENTRADAS DEL PROCESO DE MICROBIOLOGÍA	42
6.3 SALIDAS DEL PROCESO DE MICROBIOLOGÍA.	44
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFIA	49
ANEXOS	51

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Prácticas clave de control de calidad en un laboratorio de microbiología.	22
Cuadro 2. Laboratorios con al menos un parámetro de microbiología acreditado ante el IDEAM en Colombia.	25
Cuadro 3. Requisitos y actividades a realizar en la planificación del proceso.	35
Cuadro 4. Requisitos y actividades en la etapa de implementación del laboratorio de microbiología.	36
Cuadro 5. Caracterización del proceso de Microbiología	41

LISTA DE IMAGENES

	pág.
Imagen 1. Valores organizacionales de MCS Consultoría y Monitoreo Ambiental	27
Imagen 2. Mapa de procesos sugerido	40
Imagen 3. Muestra de agua superficial recibida en el laboratorio	42
Imagen 4. Registro en gestión en el sistema LIMS.	43
Imagen 5. Registro de parámetros diligenciado	45

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Procedimiento para la determinación simultánea de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> en aguas, por el método de filtración por membrana, cromógeno doble	52
ANEXO B. Procedimiento para la enumeración de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> por el método de número más probable (nmp/100 ml), tecnología de sustrato enzimático colilert	61
ANEXO C. Procedimiento para la determinación de coliformes termotolerantes (fecales) por el método de filtración por membrana en aguas	68
ANEXO D. Procedimiento para la enumeración de coliformes fecales por el método de número más probable (nmp/100 ml), tecnología de sustrato enzimático colilert modificado	77
ANEXO E. Procedimiento para la determinación y cuantificación de heterotrofos por la técnica de filtración de membrana	84
ANEXO F. Criterio de precisión de para coliformes termotolerantes (fecales) por nmp	93
ANEXO G. Criterio de precisión para coliformes totales por nmp	94
ANEXO H. Criterio de precisión para E.coli por NMP	95
ANEXO I. Criterio de precisión para Coliformes termotolerantes (fecales) por FPM	96
ANEXO J. Criterio de precisión para Coliformes totales por FPM	97
ANEXO K. Criterio de precisión para E. coli por FPM	98

GLOSARIO

ACREDITACIÓN: proceso evaluador de la competencia y eficacia de una entidad que realiza cualquier tipo de actividad, esta actividad comienza cuando dicha entidad asume cumplir un modelo-estándar para la actividad que desempeña, traducido en haber cumplido un modelo y ser revisado por una organización que verifica el cumplimiento del modelo.

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO: conjunto de reglas, de procedimientos operacionales y prácticas establecidas y promulgadas por determinados organismos como la OCDE o la FDA, que se consideran de obligatorio cumplimiento para asegurar la calidad e integridad de los datos producidos en determinados tipos de investigaciones o estudios.

CALIDAD: grado en el que un conjunto de características inherentes de un objeto cumple con los requisitos.

CERTIFICACIÓN: procedimiento mediante el cual un organismo diferente e independiente, a nombre de un operador, da una garantía por escrito de que un producto, proceso o servicio está conforme a los requisitos especificados, emitiendo un certificado.

GESTION DE LA CALIDAD: actividades coordinadas para dirigir y controlar una organización con respecto a la calidad.

IDEAM: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Es una institución pública de apoyo técnico y científico al Sistema Nacional Ambiental, que genera conocimiento, produce información confiable, consistente y oportuna, sobre el estado y las dinámicas de los recursos naturales y del medio ambiente.

LABORATORIO AMBIENTAL: lugar físico especialmente equipado con diferentes instrumentos y elementos de medida o equipo, especializados para el análisis de muestras ambientales.

MICROBIOLOGÍA: rama de la biología que se ocupa del estudio de los organismos microscópicos o microorganismos.

NORMA ISO: norma definida por la Organización Internacional de Normalización que se aplica a los productos y servicios.

RESUMEN

Para la empresa *MCS Consultoría y Monitoreo Ambiental*, es de vital importancia ampliar su portafolio de servicios, implementando el proceso de Microbiología a fin de mejorar la oportunidad y calidad del servicio y con esto minimizar las desventajas que le llegan a generar problemas de carácter financiero, retrasos en el tiempo de entrega de resultados y por lo anterior, menores utilidades a lo largo del tiempo; por lo cual en el presente documento se presenta un plan para la implementación del proceso de microbiología en el que se cumpla con los requisitos de la norma ISO 17025:2017 para lograr obtener la acreditación y por ende subir la rentabilidad de la empresa como tal.

El primer paso para el desarrollo de este trabajo se basó en un estudio para determinar las necesidades y expectativas del cliente para los análisis microbiológicos y de esta manera centrarse en ellos para la implementación del proceso; seguido por la realización de un diagnóstico inicial para establecer el estado actual frente al cumplimiento de los requisitos de la norma ISO 17025 ya que otros procesos como el de Fisicoquímico ya se encuentran acreditados.

Posteriormente se estableció una metodología que consistió en las siguientes etapas: Planeación, implementación y acreditación, dentro de las cuales se describen actividades necesarias para el cumplimiento de todos los requisitos de la norma ISO 17025 para lograr al final la acreditación con el ente correspondiente que es el IDEAM.

Seguido a esto se realizó un nuevo mapa de procesos para la compañía, con la inclusión del proceso de microbiología, así mismo se elaboró la caracterización del proceso en donde se observan todas las actividades, responsables, entradas, salidas clientes y proveedores del mismo.

Con lo anterior se logró plantear la implementación del proceso en la empresa dando un énfasis especial en las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs) que son un factor importante para la obtención de resultados confiables y el buen desarrollo de este proceso.

Palabras clave: ISO 17025, Laboratorio Ambiental, Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs), Proceso, Microbiología

INTRODUCCIÓN

Los laboratorios ambientales se encargan de analizar muestras de agua, suelo y aire en parámetros fisicoquímicos, cromatográficos, de absorción atómica, hidrobiológicos y microbiológicos.

Para realizar dichos análisis se requiere una acreditación por parte del IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales), basada en la ISO/IEC/NTC 17025 y en los métodos de referencia usados para el análisis de cada parámetro; pues los laboratorios ambientales se acreditan ante el IDEAM para garantizar la competencia e idoneidad técnica en la realización de muestreos y análisis de laboratorio de matrices ambientales (agua, aire, suelo, residuos peligrosos y biota)¹.

Un análisis completo de agua consiste en análisis cromatográficos, físicoquímicos, de absorción atómica y microbiológicos, siendo este último campo el faltante por implementar y lograr dar una completa solución a los requerimientos de los clientes.

Para lograr la acreditación descrita anteriormente, se debe tener en cuenta que “El desarrollo e implementación de un sistema de calidad para el laboratorio se basa en las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs), administración de la calidad, aseguramientos de la calidad, y control de calidad”², al igual que un eficiente Sistema de Gestión de Calidad, pues “La relación entre las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y el Sistema de Gestión de Calidad (SGC) no es antagónica ni excluyente, por el contrario tiene un efecto sinérgico, cualquiera que sea el campo de aplicación, puesto que los requisitos del SGC contribuyen a garantizar que se cumplan los requisitos de las BPL específicas”³.

La empresa MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental, empresa en la que se llevará a cabo el presente estudio, se encuentra ubicada en la ciudad de Bogotá se dedica al monitoreo, análisis y consultoría en temas ambientales y en diferentes matrices como lo son agua, suelo y aire.

Actualmente el problema radica en la falta del proceso de microbiología ya que todos los análisis de los parámetros microbiológicos deben ser subcontratados con

¹ INSTITUTO DE HIDROLOGIA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES –IDEAM- Portafolio de servicios. [En línea]Bogotá D.C.CO. Sec. Documentos. [citado el 28 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.ideam.gov.co/documents/24189/359040/Portafolio_Servicios_IDEAM+%281%29.pdf/da8a0bab-c29d-4588-9a67-3b79c74ca725>

² FARRELL, Evans M. Food Safety Assurance Systems: Quality Assurance and Good Laboratory Practice. En: Encyclopedia of Food Safety. Febrero 2014

³ PRIETO, Yeniseis Odelin. Good Laboratory Practices and the ISO 9001:2000 Standards. Cuba Octubre 2008.

otros laboratorios de servicios ambientales, siendo una desventaja para la empresa ya que se generan costos adicionales, retrasos en el tiempo de entrega de resultados y por lo anterior, menores utilidades a largo plazo.

Por lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se busca proponer la implementación de un sistema de gestión de calidad según la NTC ISO/IEC 17025:2017, en el proceso de Microbiología en la empresa MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental, identificando las necesidades del cliente y cómo lograr la acreditación ante el IDEAM de este proceso y sus actividades.

Para lograr dar solución a la problemática planteada, se establece una metodología basada en tres fases. Inicialmente, en el capítulo cuatro, se hace un estudio para identificar las necesidades del cliente frente a los análisis microbiológicos que requieren y se realiza un diagnóstico para determinar en qué estado se encuentra el laboratorio frente al cumplimiento de los requisitos de la norma ISO 17025.

Posteriormente en el capítulo 5 se establecen tres etapas que son: planeación, implementación y acreditación, en las cuales se encuentran actividades específicas basadas en dar cumplimiento a los requisitos de la norma ISO 17025. En el capítulo seis se elabora un mapa de procesos teniendo en cuenta el proceso de microbiología al igual que la caracterización del mismo evidenciando sus interacciones con los otros procesos de la organización; para finalmente dar las principales conclusiones y recomendaciones producto del presente trabajo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Proponer la implementación de un sistema de gestión de calidad según la NTC ISO/IEC 17025:2017, en el proceso de Microbiología de un Laboratorio de análisis ambiental.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar un diagnóstico inicial del proceso de microbiología frente al cumplimiento de los requisitos de la ISO 17025 y las necesidades del cliente.
- Establecer las etapas y actividades necesarias para la implementación del proceso de acuerdo a los requisitos de la ISO 17025:2017.
- Determinar las entradas y salidas del proceso de microbiología, según sus interacciones, recursos y responsabilidades y métodos necesarios para asegurar la eficacia y control de la gestión de la calidad del proceso de microbiología.

1. MARCO TEORICO

En la actualidad, las empresas tanto de consultoría como de servicios deben ser lo más competitivas posible debido al gran número de empresas dedicadas al mismo oficio; por lo cual la implementación de sistemas de calidad basados en normas internacionales como (ISO 9001:2015), Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs) y normas internacionales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración como la ISO 17025 se vuelve necesaria y de gran utilidad, dándole mayor competencia al laboratorio y de esta manera un aumento de clientes y por ende de utilidades. La acreditación de un laboratorio trae ventajas como:

- “Asegurar los resultados de las pruebas
- Reconocimiento internacional de los resultados
- Permite identificar los laboratorios con elevado nivel de calidad
- Avala los resultados ante clientes y administraciones
- Una evaluación continua del laboratorio”⁴.

1.1 LA CALIDAD EN EL LABORATORIO

Los laboratorios de análisis ambiental son aquellos dedicados a procesar muestras que tienen o tendrán algún contacto con el ambiente; estas muestras son suelos, aguas y aires de diferentes matrices como lo son: aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas residuales (industriales y domésticas) y marinas. Debido a la importancia de estos análisis y las consecuencias que pueden traer, la calidad se constituye en un aspecto clave para su desempeño, pues según Cenobio “La calidad es un elemento de gran importancia que las organizaciones deben atender, la mejor forma en que ésta puede implantarse es mediante sistemas de gestión de calidad”⁵. Estos sistemas se complementan con otras normas que se apliquen al sector en el que se desarrolla la empresa como por ejemplo la norma ISO 17025, en el cual se encuentra definido que:

Para realizar los análisis en parámetros fisicoquímicos, cromatográficos, de absorción atómica, hidrobiológicos y microbiológicos se requiere una acreditación por parte del IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales), basada en la ISO/IEC/NTC 17025 y en los métodos de referencia usados para el análisis de cada parámetro; pues los laboratorios ambientales se acreditan ante el IDEAM para garantizar

⁴ AINIA CENTRO TECNOLÓGICO – Las cinco ventajas de contar con laboratorios acreditados. [En línea] Madrid. Esp. Sec. Tecnología [Citado el 16 de noviembre de 2017]
<<http://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/las-5-ventajas-de-contar-con-laboratorios-acreditados-por-enac/>>

⁵ CENOBIO MENDEZ GARCIA, José Claudio; JARAMILLO VIGUERAS, David y SERRANO CRESPO, Ildelfonso. Gestión de la Calidad En Procesos de Servicios y Productos. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional, 2006.

la competencia e idoneidad técnica en la realización de muestreos y análisis de laboratorio de matrices ambientales (agua, aire, suelo, residuos peligrosos y biota)⁶.

Al hablar de calidad en el laboratorio, inmediatamente se debe pensar en las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs), las cuales son las bases para la obtención de datos confiables y un buen trabajo en el laboratorio.

1.2 LAS BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO (BPLS)

“Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs) son programas regulatorios estándar que aseguran la calidad e integridad de los datos obtenidos”⁷, haciendo que el laboratorio en el cual se implementen y manejen dé confiabilidad en los resultados obtenidos y cumpla con ciertos criterios exigidos por la misma, siendo un apoyo para el Sistema de Calidad.

“Las normas de aseguramiento de la calidad más modernas tienen su origen en las relaciones contractuales entre fabricantes y suministradores de algunos sectores en los que se requería la mayor fiabilidad: construcción de centrales nucleares y defensa principalmente. El cliente compraba los productos con el compromiso de la calidad del proceso estaba asegurada”⁸. Todo esto conllevó a que se eliminara al mínimo el azar en la producción y a que se trabajara con una ideología de cero defectos. Lo anterior se asegura hoy en día mediante la implementación de los sistemas de calidad como las normas ISO 9001 e ISO 17025, esto “debido a que ISO/IEC 17025 fue alineada con ISO 9001:2000 en el año 2005”⁹, y la cual fue actualizada en el año 2015.

1.3 NORMA ISO 9001:2015

“La organización ISO, es una Organización Internacional de Estandarización conformada por los diferentes organismos de Estandarización nacionales del mundo. Esta organización en 1989 publicó la primera serie de norma ISO 9000 entre las que se destacaban las normas ISO 9001, ISO 9002 e ISO 9003, normas que

⁶ INSTITUTO DE HIDROLOGIA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES –IDEAM- Portafolio de servicios. [En línea] Bogotá D.C.CO. Sec. Documentos. [citado el 28 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.ideam.gov.co/documents/24189/359040/Portafolio_Servicios_IDEAM+%281%29.pdf/da8a0bab-c29d-4588-9a67-3b79c74ca725>

⁷ GUY, Robin C. Good Laboratory Practices. En: Encyclopedia of Toxicology (Third edition). Septiembre de 2014.

⁸ AGUILAR HIDALGO, María Fernanda y SANCHEZ SEQUEIRA, Luis Alfredo. Investigación Sobre ISO 9001. Enero de 2009.

⁹ INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARIZATION (ISO), INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMISSION (IEC). Draft International Standard ISO/IEC 17025 General Requirements For The Competence of Testing and Calibration Laboratories. Marzo de 2017.

permitían establecer los requisitos del Sistema de Aseguramiento de la Calidad en las empresas”¹⁰. De esta manera éstas normas han venido evolucionando cada vez más, siempre en pro de obtener productos y/o servicios con una buena calidad garantizada y por consiguiente la mayor y completa satisfacción del cliente.

“La aplicación de las normas de calidad ISO 9000 constituyen para la industria, una vía de reducir costos y mejorar sus procesos de producción, tomando en cuenta que la calidad es un factor clave para la competitividad en cualquier mercado”¹¹.

Alineada a la norma ISO 9000 está la norma ISO 17025, por la que se acreditan los laboratorios de ensayo y calibración para la entrega de resultados confiables

1.4 LA NORMA ISO 17025

“La norma ISO/IEC 17025 es una herramienta esencial para el desarrollo y mantenimiento de la infraestructura metrológica de cualquier sociedad moderna”¹², razón por la cual es la base para la acreditación de los laboratorios ambientales.

“La primera edición de esta norma internacional (1999), se produjo como resultado de una experiencia extensiva en la implementación de la guía ISO/IEC 25 y EN 45001. Esta contiene todos los requerimientos que un laboratorio de calibración y ensayo tiene que conocer si desea demostrar que opera un sistema de calidad y que es técnicamente competitivo; al igual que es capaz de generar resultados técnicamente válidos”¹³. Lo anterior demuestra que para un laboratorio de análisis ambiental, los requerimientos de esta norma son la base para su operación.

Desde hace un gran tiempo se ha venido implementando esta norma, pues “la acreditación de laboratorios de acuerdo a la ISO/IEC 17025 ha evolucionado de ser un acto voluntario a convertirse en un factor competitivo, alcanzando la etapa de ser

¹⁰ FONTALVO HERRERA, Tomás José y VERGARA SCHMALBACH, Juan Carlos. La Gestión de la Calidad en los Servicios. ISO 9001:2008. Enero de 2010.

¹¹ ARENAS, Anny. Sistema de Gestión de la Calidad según ISO-9000. Enero 2009

¹² CARBAJAL ALARCON, Carlos E; RODRIGUEZ LOPEZ, Aarón; REYES DEL VALLE, Adrián; MERCADER TREJO, Flora; HERRERA BASURTO, Raul. Implementación de la Norma ISO 17025 en los Laboratorios Analíticos de Rutina de México

¹³ INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARIZATION (ISO), INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMISSION (IEC). Draft International Standard ISO/IEC 17025 General Requirements For The Competence of Testing and Calibration Laboratories. Marzo de 2017.

considerado un requerimiento para sobrevivir”¹⁴. Por lo anterior es importante aclarar que una acreditación basada en la norma trae las siguientes ventajas:

- “Aumentar la satisfacción del cliente.
- Aumentar confiabilidad en los resultados.
- Disminuir daños o malos funcionamientos en equipos.
- Aumentar el número de ensayos y por ende de facturas”¹⁵.

De esta manera se puede demostrar que un proceso de acreditación no solo se debe realizar como una necesidad, sino evaluar las ventajas anteriormente descritas y realizarlo como una inversión que traerá grandes ganancias. No es posible hablar solo de ventajas en la implementación la norma ISO/IEC 17025, pues algunos puntos que no se tienen a favor son los siguientes:

- “1. Altos costos para establecer, implementar y mantener el sistema.
2. No se adquieren tantos clientes o contratos nuevos como se espera.
3. El sistema tiene una tendencia a incrementar la burocracia.
4. Los esfuerzos y consumo de tiempo que lleva esto”¹⁶.

Al comparar las ventajas con las desventajas queda claro que la implementación de un sistema ISO/IEC 17025 siempre traerá beneficios ya que las desventajas observadas son insignificantes con respecto a las ventajas que se dan, especialmente en calidad y rentabilidad del laboratorio, al igual que la mejoría en la imagen y reputación del mismo.

Para la implementación de la NTC/ISO/IEC 17025 se manejan las siguientes fases y etapas:

- Fase1: Definición del estado del laboratorio
 - Etapa 1: Diagnóstico
 - Etapa 2: Sensibilización del personal del laboratorio
 - Etapa 3: Definición del plan de trabajo
- Fase 2: Estandarización y documentación
 - Etapa 4: Adecuación de infraestructura, mejoramiento metrológico y compra de material, insumos, patrones y equipos.
 - Etapa 5: Levantamiento del numeral 4

¹⁴ GROCHAU HEXSEL, Ines; SCHWENGBER TEN CATEN, Carla. A Process Approach to ISO/IEC 17025 in the Implementation of a Quality Management System in Testing Laboratories. Junio de 2012.

¹⁵ GROCHAU HEXSEL, Ines; SCHWENGBER TEN CATEN, Carla. A Process Approach to ISO/IEC 17025 in the Implementation of a Quality Management System in Testing Laboratories. Junio de 2012.

¹⁶ HESHAM TAWFIK M. ABDEL-FATAH. ISO/IEC 17025 Accreditation: Between the Desired Gains and the Reality. 2010.

- Etapa 6: Levantamiento del numeral 5
- Etapa 7: Elaboración del manual de calidad
- Fase 3: Aplicación del sistema
- Etapa 8: Evidencia de implementación
- Etapa 9: Actividades de análisis, mantenimiento y medición.
- Etapa 10: Autorización, solicitud
- Fase 4: Auditoría de acreditación
- Etapa 11: Gestión de la acreditación de los ensayos de acreditación¹⁷.

En pro del cumplimiento y con el ánimo de obtener resultados confiables, el Standard Methods For Examination of Water and Wastewater nos da una directriz llamada calidad interlaboratorio.

1.5 CALIDAD INTERLABORATORIO.

Un factor importante en el control de calidad de los laboratorios de microbiología para el análisis de muestras ambientales, es el control de calidad Interlaboratorio. “Los programas de control de calidad interlaboratorio son programas para establecer un sistema de criterios que aseguren un nivel de calidad y comparabilidad en los datos entre los laboratorios con intereses o necesidades similares”¹⁸. Con lo anterior, se logra por medio de un programa de certificación y/o acreditación, el cual es realizado por una entidad independiente que certifica/acredita que el manejo y gestión del laboratorio es acorde con el estándar de la autoridad.

“Para un laboratorio microbiológico de servicios ambientales, se propone un manual del sistema de calidad con los siguientes aspectos básicos:

- Declaración de la política de calidad.
- Estructura de administración para la organización
- Políticas del personal
- Requerimientos de equipos e implementos
- Especificaciones de calibraciones y ensayos subcontratados
- Especificaciones de suministros
- Procedimientos de muestreos
- Especificaciones de suministros
- Procedimientos de muestreos
- Métodos analíticos

¹⁷ AMERICAN PULPIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22ND edition 2012. Part 9020 B

¹⁸ AMERICAN PULPIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22ND edition 2012. Part 9020 C

- Mediciones para el control de calidad de los métodos analíticos
- Procedimientos estándar de operación (métodos analíticos)
- Control de la documentación
- Evaluaciones (auditorías)
- Actividades preventivas y correctivas
- Servicio al cliente”¹⁹

Según el Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater, “las prácticas de control de calidad son diseñadas para asegurar que los procesos en el laboratorio están bajo control. Un Sistema de Calidad de laboratorio establece políticas o programas para el aseguramiento de la calidad, al igual que actividades de control de calidad necesarias para minimizar los errores sistemáticos y aleatorios resultantes de variaciones en personal, instrumentación, equipos, reactivos, muestreos, métodos analíticos y manejo y reporte de resultados.”²⁰ Para cumplir con lo anterior, se muestra a continuación, en el cuadro 1, las prácticas claves de control de calidad.

Cuadro 1. Prácticas clave de control de calidad en un laboratorio de microbiología.

ITEM	ACCIÓN	FRECUENCIA
Agua para análisis	Monitorear la calidad	NA
Aire en el sitio de trabajo	Monitorear la densidad bacteriana	Mensualmente
Dispositivos de temperatura	Verificar exactitud	Anualmente
Unidades de trabajo	Recertificar	Cada 5 años
Unidades de referencia		
Balanzas	Verificar el cero	Antes de cada uso
	Verificar exactitud	Mensualmente/cada uso preferiblemente
	Servicio y recalibración	Anualmente
Masas	Verificar con los pesos de referencia	Anualmente
De trabajo	Recertificar	Cada 5 años
De referencia		
pHmetro	Estandarizar	Antes de cada uso
	Determinar pendiente	Mensualmente
Aparatos para dispensar medios	Verificar la exactitud del volumen dispensado	Antes de cada uso

¹⁹ AMERICAN PULPIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22ND edition 2012. Part 9020A

²⁰ AMERICAN PULPIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22ND edition 2012. Part 9020B

Cuadro 1 (continuación)

ITEM	ACCIÓN	FRECUENCIA
Horno de esterilización		Verificar funcionamiento Mensualmente
Autoclave		Verificar temperatura Semanalmente
		Verificar funcionamiento con un bioindicador Mensualmente
Temporizador	Autoclave	Verificar el funcionamiento con un cronometro Cada 4 meses
	Cronometro	Verificar contra la Señal Nacional de Tiempo Anualmente
Refrigerador		Verificar temperatura Diariamente
Congelador		Verificar temperatura Diariamente
		Descongelar Anualmente
Equipo de filtración por membrana		Verificar que no haya fugas ni rasguños en la superficie Antes de cada uso
		Verificar esterilidad Antes y después de los ensayos
		Verificar el volumen de 100 mL Al inicio de los ensayos
Lámparas de UV		Probar con un medidor de luz UV o verificar su funcionamiento por conteo en placa Cada 4 meses
Cabina de bioseguridad		Inspeccionar el flujo de aire En cada uso
		Tener certificado (Calificación) Anualmente
Incubadora		Verificar temperatura Dos veces al día
Microscopio		Limpiar los oculares y cuerpo, verificar alineamiento Antes de cada uso
Conductivimetro		Calibrar Mensualmente
Micropipetas		Verificar precisión y exactitud de dispensamiento Cada 4 meses o con más frecuencia dependiendo del uso
		Calibrar Anualmente
Vidriería		Inspeccionar la limpieza y residuos En cada uso
		Verificar pH con azul de bromotimol A cada lote de lavado
Frascos para la dilución con agua		Verificar pH, esterilidad y volumen A cada lote
Frascos de muestreo		Verificar esterilidad Cada lote
		Verificar la eficacia del agente de clorinador Cada lote
		Verificar la línea de 100 mL Cada lote
Sellador multicelda		Verificar funcionamiento Mensualmente
Filtros de membrana		Verificar esterilidad y propiedades Cada lote
Medios de cultivo		Verificar esterilidad, pH y apariencia Cada lote
		Verificar recuperación del nuevo medio Vs. el medio viejo Antes del primer uso
		Verificar funcionamiento con controles positivos y negativos Cada lote
Recuento en placa		Análisis de duplicados Mensualmente
		Repetir conteos Mensualmente

Fuente: Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22ND Edition.

2. EMPRESA CASO DE ESTUDIO

2.1 HISTORIA.

MCS Consultoría y Monitoreo Ambiental nace en el año 2000 como una empresa unipersonal, brindando servicios de monitoreo y consultorías ambientales, garantizando que el personal profesional que labora en la empresa, posea el más alto nivel intelectual y humano, con el fin de proporcionar la mejor calidad en sus servicios.

En los últimos años, la empresa viene fortaleciéndose y creciendo vertiginosamente, incrementando su círculo comercial y cada vez prestando más servicios y ofreciendo cada día una mayor eficiencia y calidad. Este crecimiento también ha sido significativo en todos sus proyectos, lo que llevó a realizar un cambio de sede en el año 2012, siendo esta una sede acorde a las necesidades y crecimiento, pues al tener una mayor cantidad de clientes se necesitó una infraestructura mas amplia con la cual se pudiera tener una mayor capacidad de operación, brindando a todos sus colaboradores un ambiente armonioso y libre de presiones para ejercer sus actividades.

2.2 MISIÓN.

MCS es una empresa dedicada a la prestación de servicios de Consultorías, Monitoreo ambientales, análisis hidrobiológicos y análisis fisicoquímicos, en busca de proporcionar con base en la excelencia, beneficios, soluciones y alternativas en los aspectos de manejo ambiental que su empresa requiera, generando la rentabilidad y progreso de la compañía.²¹

2.3 VISIÓN.

Ser una empresa reconocida por una calidad excelente en el servicio de monitoreo, consultorías ambientales, análisis hidrobiológicos y análisis fisicoquímicos. Mejorando y fortaleciendo día a día sus herramientas tecnológicas, con el fin de lograr el desarrollo y crecimiento empresarial, para así brindar a sus clientes la mejor confiabilidad en la prestación de servicios.

2.4 GENERALIDADES.

MCS Consultoría y Monitoreo Ambiental es una empresa creada hace 17 años y la cual presta los siguientes servicios:

²¹ MCS MONITOREO Y CONSULTORÍA AMBIENTAL. Resumen del Sistema de Gestión Integral (Calidad – Ambiente – Salud y Seguridad). 2017

- Estudios ambientales
- Monitoreo de aguas
- Monitoreo de suelos
- Monitoreo de aire y ruido
- Monitoreo de fauna
- Programas de capacitación
- Programas de Gestión social
- Manejo de prevención, control, corrección y mitigación de impactos
- Interventorías y auditorías
- Laboratorio de hidrobiología
- Laboratorio Físicoquímico
- Laboratorio de absorción atómica
- Laboratorio de cromatografía

Actualmente los análisis microbiológicos se están subcontratando, sin embargo debido al aumento en la demanda de estos análisis es que se quiere implementar el proceso de microbiología.

En el cuadro 2, se muestran los laboratorios que hasta el momento tienen uno o más parámetros de microbiología acreditados ante el IDEAM en Colombia, los cuales son considerados competitivos al obtener esta acreditación y con los que MCS Consultoría y Monitoreo entraría a competir directamente en los parámetros microbiológicos.

Cuadro 2. Laboratorios con al menos un parámetro de microbiología acreditado ante el IDEAM en Colombia.

LABORATORIOS CON PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS ACREDITADOS ANTE EL IDEAM
Laboratorio Microbiológico de Barranquilla
Laboratorio de Control de Calidad
Analquim
Tecnoambiental
PSL Proanálisis
Anascol
Corporación Autónoma Regional CAR
Hidroambiental
Análisis ambiental
Asinal
Antek
Instituto de Higiene Ambiental
Laboratorio de la Empresa de Acueducto de Bogotá
Analizar
Instituto Colombiano del Petróleo
Acuazul

Cuadro 2 (Continuación)

LABORATORIOS CON PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS ACREDITADOS ANTE EL IDEAM
Quimicontrol
Ambienciq Ingenieros
Laboratorio Microbiológico Ortiz Martinez
Sociedad SIAMA
Aqualim
Analtec
Laboratorio Nancy Florez
Chemilab
SERAMBIENTE
CORALINA
Laboratorio de aguas de Cartagena
CIMA
Laboratorio de la Industria y el Medio Ambiente
INVEMAR
SGS Colombia
Hidrolab
Laboratorio Diagnosticamos
Biopolab
Soluciones Ambientales
Omnambiente
ECOSAM
Aguas de la Sabana

Fuente: El autor.

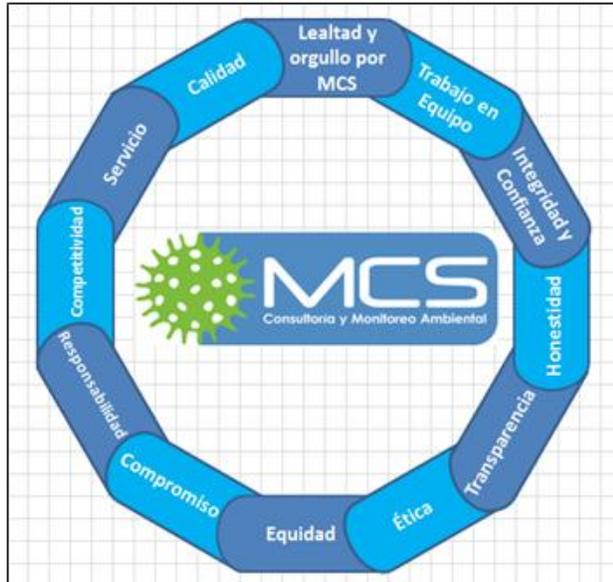
2.5 VALORES ORGANIZACIONALES.

Los valores organizacionales de MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental se ven en la figura 1 y son los siguientes:

- Lealtad y orgullo por MCS
- Trabajo en equipo
- Integridad y confianza
- Honestidad
- Transparencia
- Ética
- Equidad
- Compromiso
- Responsabilidad
- Competitividad

- Servicio
- Calidad

Imagen 1. Valores organizacionales de MCS Consultoría y Monitoreo Ambiental



Fuente: Resumen Sistema de Gestión Integral de MCS Consultoría y Monitoreo Ambiental.

2.6 ACREDITACIONES.

MCS consultoría y monitoreo Ambiental cuenta con las siguientes acreditaciones:

- Acreditación IDEAM: Sociedad acreditada por el IDEAM bajo NTC-ISO/IEC 17025:2005 según resolución # 0869 del 27 de mayo de 2013 para parámetros hidrobiológicos y fisicoquímicos.
- Certificación en ISO 9001:2008 (certificado SG-2013005318 A)
- Certificación en ISO14001:2004 (certificado SG-2013005809 B)
- Certificación en OHSAS 18001:2007 (certificado SG-2013005809 F)

3. METODOLOGIA

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.

El presente trabajo usará un tipo de investigación aplicada, pues “la aplicación aplicada emprende para determinar los posibles usos de los resultados de la investigación básica, o para determinar nuevos métodos o formas de alcanzar los objetivos específicos predeterminados”.²²

3.2 OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN.

Para la obtención de la información en el presente trabajo se revisarán las normas ISO 9001:2015, ISO/NTC 17025:2017, el AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22ND edition 2012, la información brindada por la compañía en la que se llevará a cabo el trabajo y demás bibliografía necesaria para el buen desarrollo de la investigación.

3.3 POBLACIÓN

En el presente trabajo, la población serán la alta dirección y todos los procesos de la compañía MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental S.A.S.

3.4 ETAPAS DEL PROYECTO

Para el desarrollo de este proyecto investigativo, se realizarán las siguientes etapas:

En la primera etapa, se estudiarán las necesidades del cliente y posteriormente se hará un diagnóstico estableciendo con que elementos de la ISO/NTC 17025 se cuenta y cuales otros se deben implementar, para con esto identificar desde que punto se debe iniciar.

Posterior a esto, se llevarán a cabo tres etapas, las cuales serán:

- Planificación
- Implementación
- Acreditación

En estas etapas se analizará cada uno de los requisitos de la norma con su cumplimiento y se evaluará que recursos son necesarios para lograrlo.

²² LÓPEZ NIÑO Desiderio. El Hexágono de la Investigación. Octubre del 2015

De igual manera se identificarán las entradas, salidas, interacciones y actividades que tendrá el proceso de Microbiología. Para esto se analizará el mapa de procesos de la organización y en base a él se harán las interacciones necesarias para el nuevo proceso al igual que las entradas y salidas y por ende los proveedores y clientes del mismo.

Por último, se presentará el proyecto a la Alta Gerencia y se establecerá un cronograma con ánimos de conseguir la acreditación del proceso de Microbiología.

4. DIAGNOSTICO ACERCA DE LOS ELEMENTOS DE LA NORMA ISO 17025 CON QUE SE CUENTA EN EL LABORATORIO.

Actualmente en MCS Consultoría y Monitoreo Ambiental, el proceso de microbiología se encuentra en su etapa básica, pues por decisión estratégica se ha considerado su implementación pero no se ha realizado la gestión para llevar a cabo la misma.

En la compañía, hoy en día, se están cotizando los análisis de varios parámetros, dentro de ellos los que corresponden al área de microbiología como servicios subcontratados con otros laboratorios que tienen el área y que se encuentra acreditada en la norma ISO/IEC 17025 frente al IDEAM.

4.1 NECESIDADES Y EXPECTATIVAS DEL CLIENTE

Se realizó un estudio acerca de las requisiciones de los clientes en donde se encontraron las siguientes matrices para ser analizadas en el laboratorio de microbiología:

- Agua Residual Doméstica (ARD)
- Agua Residual Industrial (ARI) o Agua Residual no Doméstica (ARnD)
- Agua Superficial
- Agua Subterránea
- Agua Marina
- Agua Potable

Para cada uno de las anteriores matrices los clientes solicitan el análisis de uno o varios de los siguientes parámetros:

- Coliformes totales
 - Técnica Número Más Probable
 - Técnica Filtración Por Membrana
- Coliformes fecales o termotolerantes
 - Técnica Número Más Probable
 - Técnica Filtración Por Membrana
- Escherichia coli
 - Técnica Número Más Probable
 - Técnica Filtración Por Membrana
- Bacterias heterótrofas
 - Técnica Filtración Por Membrana

- Huevos de Helminto
- Técnica de Bailenger modificado
- Enterococcus
- Técnica Filtración Por Membrana

- Hongos y levaduras
- Técnica recuento en placa

De los anteriores parámetros solicitados por los clientes para análisis, los tres últimos (Huevos de Helmintos, Enterococcus y Hongos y levaduras) han sido poco frecuentes por lo cual no se contempla su implementación y acreditación por el momento, a diferencia de los demás parámetros los cuales presentan una alta demanda y serán implementados y acreditados por el IDEAM.

4.2 DIAGNÓSTICO DEL ESTADO DE LA EMPRESA FRENTE A LOS REQUISITOS DE LA ISO 17025:2017

A continuación se relacionan los requisitos de la norma ISO 17025 para la competencia de los laboratorios de calibración y ensayo con los cuales se debe cumplir para lograr la acreditación con el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM con el ánimo de verificar con cuáles se están cumpliendo y en cuales se debe trabajar para su cumplimiento.

4.2.1 Numeral 4, 4.1. y 4.2: En este numeral de la norma, se hace referencia a la imparcialidad y confidencialidad que debe tener cada empedado con el laboratorio y los clientes. Actualmente en MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental, se tienen acreditados bajo esta norma varios parámetros de las áreas de Físicoquímico y Absorción Atómica, por lo cual estos dos requerimientos se cumplen por completo, debido a que en el momento del ingreso se debe firmar un compromiso para mantener total imparcialidad y confidencialidad en los ensayos realizados y los clientes atendidos.

4.2.2 Numeral 5. Requerimientos estructurales: Este numeral de la norma hace referencia a la organización del laboratorio y a su relación con las partes interesadas. En cuanto a este numeral, se están cumpliendo todos los requisitos, pues MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental cuenta con una estructura administrativa y del Sistema Integrado de Gestión, en donde se encuentra lo relacionado con el sistema de Calidad. Igualmente, las actividades que se llevan a cabo tienen su respectivo procedimiento; como el área de Microbiología se implementará, estos documentos deben ser elaborados por la persona encargada de esta labor.

4.2.3 Numeral 6. Requerimientos de recursos: De acuerdo a la norma ISO 17025 los requerimientos de recursos hacen referencia al personal, instalaciones, equipos y trazabilidad de mediciones que permite el buen funcionamiento del laboratorio y la obtención de resultados confiables.

4.2.3.1 6.1. Personal: Debido a que el proceso de microbiología no se ha implementado, aún no se tiene personal para área y por la tanto no se da cumplimiento a este numeral. A medida que se va implementando el proceso, se definirá el perfil de las personas para el área (Coordinador, Microbiólogos Analistas y Auxiliares); así mismo se debe implementar el plan de capacitaciones que será compartido en su mayoría con el plan de capacitaciones que actualmente tienen los analistas del laboratorio. Igualmente se documentaran las competencias requeridas por el personal para la realización de las diversas funciones en el laboratorio de Microbiología. Actualmente en MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental se cuenta con los procedimientos pertinentes para:

- Determinar las competencias requeridas
- Selección de personal
- Entrenamiento de personal
- Supervisión de personal
- Autorización de personal
- Monitoreo de las competencias del personal.

4.2.3.2 6.2. Instalaciones del laboratorio y condiciones ambientales: Debido a que actualmente no se ha implementado el proceso, no se han adecuado las instalaciones para la realización de los análisis microbiológicos. En el momento de su implementación se medirán, documentarán y monitorearán las condiciones ambientales para el control de las mismas.

4.2.3.3 6.3. Equipos: Ya que el proceso de Microbiología no se ha implementado, no se tienen equipos para tal proceso. Igualmente a medida que se va implementando el proceso, se irán realizando los procedimientos para almacenamiento, transporte y manejo de todos los equipos. Por otra parte se tendrá un programa de calibración de los equipos que lo requieran y de mantenimiento preventivos.

4.2.3.4 6.4. Trazabilidad de las mediciones: Cuando se implemente el proceso de Microbiología, se mantendrá la trazabilidad de las mediciones por medio de la calibración de equipos y el manejo de las unidades indicadas en el Sistema Internacional.

4.2.4 Numeral 7. Requerimientos del proceso: La norma en este numeral, se refiere a los requerimientos en cuanto a la revisión de contratos, a la selección de los métodos y a su debida verificación y/o validación, al método en que se van a

realizar los muestreos, los registros técnicos que se irán a implementar, a la incertidumbre del método, al aseguramiento de la calidad de los resultados y el reporte de los mismos y al manejo de los trabajos no conforme, es decir las principales actividades del proceso y como asegurar que los resultados entregados sean confiables y verídicos.

4.2.4.1 7.1. Revisión de solicitudes, contratos y licitaciones: Para el cumplimiento de este numeral, ya se cuenta con el área encargada, pues como se dijo anteriormente, los parámetros de las áreas de fisicoquímico y absorción atómica ya se encuentran acreditados y cumplen con este requisito.

4.2.4.2 7.2. Selección, verificación y validación de métodos: Al momento de la implementación del laboratorio, se verificarán los métodos de análisis como lo indica la norma y basados en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, el cual da las directrices exactas para la excelente realización de los análisis. Igualmente quedarán documentadas como se exige en la norma.

4.2.4.3 7.3. Muestreo: Para los ensayos que ya se encuentran acreditados se tiene un plan de muestreo. Se complementará con los muestreos microbiológicos los cuales deben realizarse de manera especial ya que se debe tener en cuenta la esterilidad y no contaminación de las muestras. Para esto se tendrá en cuenta las directrices del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

4.2.4.4 7.4. Manejo de los ítems de prueba o calibración: Ya se tiene establecido un programa para el cumplimiento de este requerimiento en donde se indica cómo se deben transportar y manejar las muestra desde la toma hasta el análisis en el laboratorio. Se debe complementar con el manejo especial que deberán tener las muestras que requieran un análisis microbiológico.

4.2.4.5 7.5. Registros técnicos: Debido a que aún no se ha implementado el proceso de Microbiología, no se tienen los registros técnicos para las actividades de este proceso. Para los métodos ya acreditados de otros procesos, se tienen establecidos los registros técnicos para sus actividades.

4.2.4.6 7.6. Evaluación de la incertidumbre: Al momento de la implementación del proceso se realizará la verificación y/o validación de los métodos y en ellas se hallará la incertidumbre de la medición de cada uno de ellos y se documentará.

4.2.4.7 7.7. Aseguramiento de la calidad de los resultados: Actualmente existe un procedimiento de control de calidad que corrobora la validez de los resultados el cual será complementado con las exigencias del proceso de microbiología. Igualmente se establecerán las cartas de control necesarias para el proceso y hacer seguimiento a las tendencias.

4.2.4.8 7.8. Reporte de resultados: Para el reporte de los resultados se cuenta con un procedimiento y se realiza mediante el sistema LIMS (Laboratory Information Management System). Se realizará un procedimiento específico para el reporte de los resultados del proceso de Microbiología.

4.2.4.9 7.9. y 7.10. Quejas y manejo de trabajo no conforme: En MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental está implementado un procedimiento para el manejo de quejas y de trabajos no conformes, el cual será aplicado al proceso de Microbiología.

4.2.4.10 7.11. Control de datos y manejo de la información: Se tiene estipulado un sistema para el manejo de la información y el control de datos que se está aplicando para los procesos de Fisicoquímico y Absorción Atómica. Este mismo será aplicado para el proceso de Microbiología en el momento de su implementación.

4.2.5 Numeral 8. Requisitos de Gestión: Para el cumplimiento de este requisito, en MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental tiene establecido un Sistema que se encuentra certificado en la norma ISO 9001:2008, lo que indica que se cumple con todos los requerimientos de la norma basado en la satisfacción del cliente.

5. ETAPAS Y ACTIVIDADES NECESARIAS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL PROCESO DE MICROBIOLOGÍA DE ACUERDO A LOS REQUISITOS DE LA ISO 17025:2017.

Para implementar el proceso de microbiología se llevará a cabo una metodología que consiste en tres etapas identificadas como planeación, implementación y acreditación, las cuales tendrán sus actividades específicas y se detallarán a continuación.

5.1 ETAPA DE PLANIFICACIÓN.

A continuación se relacionan los requisitos de la norma ISO 17025 y las actividades a realizar para su cumplimiento.

Cuadro 3. Requisitos y actividades a realizar en la planificación del proceso.

Requisito	Actividad
Numeral 4: Imparcialidad y confidencialidad	Elaboración de compromisos de confidencialidad para ser firmados por el futuro equipo de microbiología.
Numeral 5. Requerimientos estructurales en el Sistema de Gestión	Inclusión del proceso de microbiología en el mapa de procesos de la organización.
Numeral 6. Recursos	Personal: Analizar el número de analistas necesario para llevar a cabo el proceso de microbiología y establecer el perfil requerido tanto del Coordinador como de los analistas y auxiliares.
	Instalaciones de laboratorio y condiciones ambientales: Para este punto, se harán los planos para las instalaciones, teniendo en cuenta que las áreas deben estar separadas (Lavado, siembra, incubación y lectura)
	Equipos: Según las actividades que se desarrollarán en el proceso de microbiología, se evaluará que equipos son necesarios y se pedirá cotización de los mismos a diferentes proveedores para seleccionar el más adecuado y que brinde mayores ventajas, basados en el precio y buena calidad de los productos ofrecidos.

Numeral 7. Requerimientos de proceso	Selección, verificación y validación de métodos: Se escogerán los métodos a implementar en el laboratorio según las necesidades de los clientes y se elaborará el plan de validación y/o verificación.
	Manejo de los ítems de prueba o calibración: Se agregará al plan de calibración los equipos de microbiología anteriormente nombrados y que lo requieran.
	Registros técnicos: Se evaluará que registros técnicos y para que actividades se necesitan, basado en los lineamientos exigidos por el área de Calidad.
	Aseguramiento de la calidad de los resultados: Se evaluará que cartas de control y diferentes actividades de aseguramiento de la calidad se requieren para el proceso.

Fuente: El autor

5.2 ETAPA DE IMPLEMENTACIÓN.

En el cuadro 4 se pueden observar los requisitos y las actividades necesarias para la implementación del proceso de microbiología en la compañía.

Cuadro 4. Requisitos y actividades en la etapa de implementación del laboratorio de microbiología.

Requisito	Actividad
Numeral 4: Imparcialidad y confidencialidad	Al momento de la contratación del personal, se deberá firmar el compromiso de confidencialidad, el cual quedará archivado en la hoja de vida de cada uno de los empleados de la compañía.
Numeral 5. Requerimientos estructurales	Aplicación de todo el Sistema Integrado de Gestión al proceso de microbiología, teniendo en cuenta los requisitos de las normas integradas en el Sistema de Gestión. En este punto se deben tener en cuenta las auditorías internas y externas que se realizarán al proceso.
Numeral 6. Recursos	Personal: Solicitar y seleccionar el personal para el área teniendo en cuenta un coordinador del área con experiencia en interpretación de resultados microbiológicos y manejo de personal. Así mismo establecer en el perfil de los analistas la experiencia requerida (1 año). De igual manera realizar una

	<p>evaluación de conocimientos para ser tenida en cuenta para la selección y evaluación de desempeño, la cual se archivará en la carpeta de hoja de vida de cada uno de los analistas.</p>
	<p>Instalaciones de laboratorio y condiciones ambientales: Construcción de la instalaciones y diferentes áreas del proceso teniendo en cuenta que se deben establecer las áreas de siembra, lectura y esterilización como limitadas o con acceso restringido y para personal autorizado. Estas áreas deben ser en vidrio del techo a la mitad de la altura. El ambiente debe estar libre de polvo y protegido de cambios extremos de temperatura. Las condiciones de temperatura y humedad deben tenerse controladas, pues con esto se permite un funcionamiento más estable de las incubadoras y demás equipos.</p>
	<p>Equipos: Compra de los equipos necesarios para todas las actividades del proceso, los cuales se nombran a continuación: Incubadoras de convección normal, autoclaves, horno (53 litros), Equipo de filtración de membrana, vortex, balanza analítica, cabina de seguridad, plancha de calentamiento, equipo quanty-tray con accesorios, micropipetas, dispensador de medios líquidos, termohigrómetros, microscopio, centrifuga y cuenta colonias.</p>
<p>Numeral 7. Requerimientos de proceso</p>	<p>Selección, verificación y validación de métodos: Se realizará la validación y/o verificación de cada uno de los métodos que se empezarán a aplicar en la empresa.</p>
	<p>Muestreo: Se elaborará un manual para la toma de muestras para análisis de microbiología; pues para este proceso esto es completamente diferente a la toma de muestras de los procesos de Fisicoquímico y Absorción Atómica ya que se debe mantener la esterilidad y asepsia de los elementos utilizados.</p>
	<p>Manejo de los ítems de prueba o calibración: En el momento de ser adquiridos los equipos, se realizará la primera calibración de cada uno de ellos y de ahí en adelante se cumplirá con el plan de calibración de equipos.</p>
	<p>Registros técnicos: Se elaborarán los registros técnicos necesarios y se enviarán al área de calidad para que estos sean codificados y entren en el listado maestro de documentos.</p>

	Evaluación de la incertidumbre: La evaluación de la incertidumbre se realizará en la verificación y/o validación de los métodos y será registrada en el informe para cada uno de los métodos.
	Aseguramiento de la calidad de los resultados: Se empezará con el diligenciamiento del criterio de precisión y los diferentes formatos para el aseguramiento de la calidad en el proceso.
	Reporte de resultados: Se implementará el sistema LIMS para el proceso de microbiología y el reporte de resultados en el mismo.
	Control de datos y manejo de la información: Se agregará al sistema de manejo de la información, todos los datos generados por el proceso de microbiología.
Numeral 8: Requisitos de gestión	En este requerimiento, se agregará a todo el Sistema Integrado de Gestión el proceso de Microbiología

Fuente: El autor

5.3 ETAPA DE ACREDITACIÓN

En esta etapa se realizará la solicitud de visita al IDEAM para auditoría y posterior acreditación de los métodos implementados en el proceso de microbiología. Igualmente se pedirá la cotización y pago para la acreditación. Se debe tener en cuenta la mejora continua en el proceso para las futuras acreditaciones y extensiones ante el ente acreditador.

6. PROCESO DE MICROBIOLOGÍA: INTERACCIONES, ENTRADAS, SALIDAS, RECURSOS Y RESPONSABILIDADES.

El proceso de microbiología se llevará a cabo con el ánimo de analizar los parámetros microbiológicos de las muestras de diferentes matrices que ingresan al laboratorio, cumpliendo con las buenas prácticas de laboratorio y brindando resultados confiables para los clientes. Como todos los procesos requiere de proveedores que le brinden entradas y a su vez generará salidas requeridas por otro proceso lo cual será explicado a continuación.

En los anexos se pueden observar los procedimientos únicos del proceso de Microbiología.

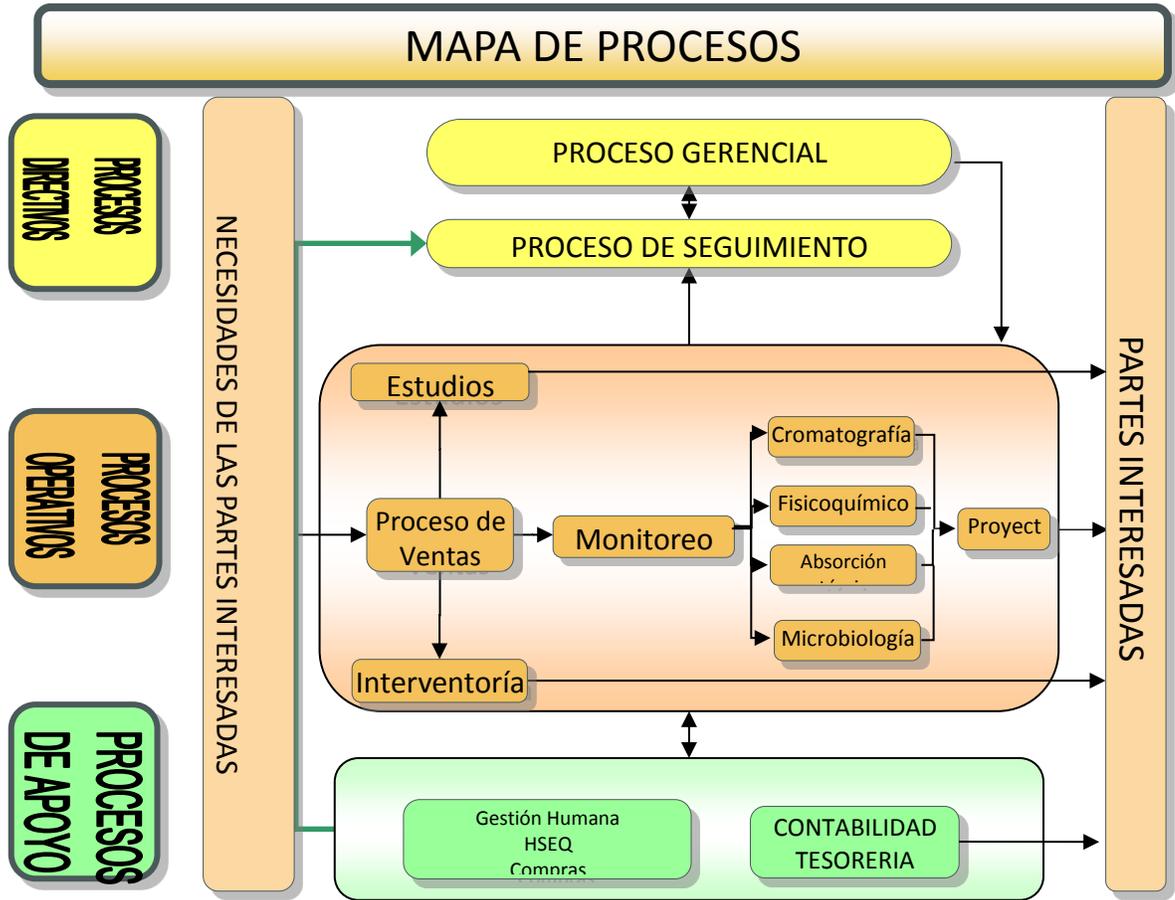
6.1 MAPA DE PROCESOS DE LA COMPAÑÍA Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROBIOLOGÍA

En cuanto al mapa y caracterización del proceso de microbiología, este tendrá interacción con los siguientes procesos:

- Proceso de ventas: El proceso de Microbiología interactuará con el proceso de compras para la adquisición de todos los materiales y equipos requeridos para el normal funcionamiento y desarrollo del proceso.
- Proceso de Gestión Humana: Para la elección y evaluación del personal, se debe interactuar con este proceso, al igual que el resto de áreas.
- Proceso de recepción de muestras: Este proceso es que brinda la primera entrada para el proceso de microbiología. Pues es en esta área que las muestras llegan a la compañía y se entregan a los diferentes laboratorios; así mismo es en donde se numeran en el sistema LIMS los parámetros para los que vienen las muestras.
- Proceso de proyectos: Con este proceso interactúan las salidas del proceso de microbiología ya que los resultados son entregados a ellos para la elaboración de los informes finales para ser entregados al cliente externo.

Con la información anterior, en la imagen 2 se muestra el mapa de procesos sugerido, una vez se haya implementado el proceso de microbiología.

Imagen 2. Mapa de procesos sugerido



Fuente: El autor

De igual manera, teniendo en cuenta las interacciones y actividades que se llevarán a cabo en el proceso, a continuación, en el cuadro 5, se puede ver la caracterización del proceso de microbiología.

Cuadro 5. Caracterización del proceso de Microbiología

Proceso: Microbiología	Responsable del proceso: Coordinador de Microbiología
Objetivo del proceso: Analizar los parámetros microbiológicos de las muestras de diferentes matrices que ingresan al laboratorio, cumpliendo con las buenas prácticas de laboratorio y brindando resultados confiables para los clientes.	Principales actividades: Recepción de muestras para los análisis microbiológicos. Análisis de los parámetros microbiológicos requeridos por el cliente. Apoyo a las actividades del Sistema integrado de gestión. Diligenciamiento de los resultados en los registros técnicos y en el sistema LIMS.
Proveedores: Proceso de Monitoreos y Proceso de Ventas	Entradas: Muestra para el análisis de los parámetros requeridos. Registro en gestión de parámetros solicitados por el cliente en el sistema LIMS.
Productos y/o salidas: Registro diligenciado de parámetros solicitados por el cliente en el sistema LIMS.	Cientes: Proceso de Proyectos
Recursos humanos: Coordinador de microbiología. Analistas de microbiología. Auxiliar de laboratorio.	Indicador del proceso: Porcentaje de cumplimiento en la entrega de resultados mensual.

Fuente: El autor.

En cuanto a la documentación de los métodos, en los anexos se presentarán los procedimientos para cada análisis y los formatos de los mismos; los instructivos de los equipos no se presentan ya que estos deben realizarse con respecto al equipo y referencias específicas y estas aún no se tienen.

Los procedimientos se realizan basados en el Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater de la AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. 22ND edition 2012, ya que es en este en donde se encuentran los métodos de referencia.

6.2 ENTRADAS DEL PROCESO DE MICROBIOLOGÍA

Teniendo en cuenta la caracterización del proceso y la interacción del mismo con los demás procesos, la principal entrada será la muestra para el análisis de los parámetros requeridos. En la imagen 3 se exhibe una muestra de agua superficial tomada en un monitoreo ambiental y entregada al laboratorio la cual debe ser analizada para los parámetros requeridos por el cliente.

Imagen 3. Muestra de agua superficial recibida en el laboratorio



Fuente: El autor

Teniendo la muestra para análisis se genera la otra entrada fundamental, que es el registro en gestión de parámetros solicitados por el cliente en el sistema LIMS (Laboratory Information Management System), en el cual se encuentran relacionada(s) la(s) muestra(s) y los parámetros que deben ser analizados y solicitados por el cliente.

Esta herramienta tiene un usuario y contraseña para cada persona responsable del reporte de resultados y de igual manera permite registrar los resultados en línea y tiempo real, como se puede observar en la imagen 4.

Imagen 4. Registro en gestión en el sistema LIMS.

FORMA DE RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS:
FECHA DE ANALISIS:
OBSERVACIONES:

COMENTARIOS ASISTENTE DE LABORATORIO:

EXPIRACION:

2017-10-05 AL 2017-10-12

METODO DE ANALISIS UTILIZADO: STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER & WASTEWATER 22nd EDITION 2012, APHA, AWWA, WEF.

REPORTE DE RESULTADOS # 1								
PARAMETROS	UNIDADES	TECNICA ANALITICA	METODO			ALICUOTA		LIMITES PERMISIBLES DECRETO 1076 DEL 2015 MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE
						1	2	
HORA - 729	h.				10:32			N.E.
TEMPERATURA MUESTRA - 113	°C	TERMOMETRICO	SM 2550 B		29.35	29.4	29.3	N.E.
pH - 91	UNIDADES	ELECTROMETRICO	SM 4500H+ B		7.25	7.3	7.2	N.E.
CONDUCTIVIDAD ELECTRICA - 48	lS/cm	ELECTROMETRICO	SM 2510 B		345	350	340	N.E.
OXIGENO DISUELTUO - 90	mg O2/L	LUMINISCENCIA	ISO 17289: 2014					N.E.
CAUDAL - 23	L/s	VOLUMETRICO	GUIA PARA EL MONITOREO VERTIMIENTOS, AGUAS SUPERFICIALES Y SUBTERRANEAS. IDEAM. 2009					N.E.
CLORO RESIDUAL TOTAL - 7949	mg/L Cl2	COMPARACION VISUAL	KIT EQUIVALENTE A SM 4500-Cl G					N.E.
CLORUROS - 36	mg Cl-/L	ARGENTOMETRICO	SM 4500 Cl- B					N.E.
SULFATOS - 109	mg SO4-2/L	TURBIDIMETRICO	SM 4500-SO4 E					N.E.
NITRATOS - 87	mg N-NO3/L	COLORIMETRICO	SM 4500 NO3 - B					N.E.
FENOLES TOTALES - 62	mg/L	DESTILACION - FOTOMETRICO DIRECTO	SM 5530 B, SM 5530 D					N.E.
SOLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES - 107	mg/L	SECADO A 103-105°C	SM 2540 D					N.E.
DBOS - 52	mg O2/L	INCUBACION 5 DIAS - ELECTRODO DE MEMBRANA	SM 5210 B, SM 4500-O G					N.E.
DOO - 54	mg O2/L	REFLUJO CERRADO - VOLUMETRICO	SM 5220 C					N.E.
ARSENICO - 622	mg As/L	E.A.A. - GENERADOR DE HIDRUROS	SM 3114 C		<0.01			N.E.
BARIO - 8	mg Ba/L	E.A.A.	SM 3030 E, SM 3111 D					N.E.
CADMIUO - 15	mg Cd/L	E.A.A.	SM 3030 E, SM 3111 B					N.E.
CROMO TOTAL - 51	mg Cr/L	E.A.A.	SM 3030 E, SM 3111 B					N.E.
MERCURIO - 662	mg Hg/L	E.A.A. - VAPOR FRIO	SM 3112 B					N.E.
PLATA - 94	mg Ag/L	E.A.A.	SM 3030 E, SM 3111 B					N.E.
PLOMO - 95	mg Pb/L	E.A.A.	SM 3030 E, SM 3111 B					N.E.
SELENIO - 732	mg Se/L	E.A.A. - GENERADOR DE HIDRUROS	SM 3114 C		<0.01			N.E.
ZINC - 676	mg Zn/L	E.A.A.	SM 3030 E, SM 3111 B					N.E.
RAS - 548		CALCULADO	NOM 021 AS - 21					N.E.
PORCENTAJE DE SODIO INTERCAMBIABLE - 562	%	CALCULADO	NOM 021 AS - 21					N.E.
GRASAS Y ACEITES - 69	mg/L	PARTICION - INFRARROJO	SM 5520 C					N.E.
HIDROCARBUROS TOTALES - 74	mg/L	PARTICION - INFRARROJO	SM 5520 C, SM 5520 F					N.E.
COLIFORMES TOTALES - 697	NMP/100ml	SUSTRATO ENZIMATICO	SM 9223 B					N.E.
COLIFORMES TERMOTOLERANTES (FECALES) - 636	NMP/100ml	SUSTRATO ENZIMATICO	SM 9223 B					N.E.
ALTURA - 16379	m.s.n.m.	POSICIONAMIENTO GEOGRAFICO GPS			598			N.E.
pH - LABORATORIO - 725	UNIDADES	ELECTROMETRICO	SM 4500H+ B					N.E.
CONDUCTIVIDAD ELECTRICA - LABORATORIO - 726	lS/cm	ELECTROMETRICO	SM 2510 B					N.E.
SOLIDOS DISUELTOS TOTALES - LABORATORIO - 728	mg/L	ELECTROMETRICO	SM 2540 C					N.E.
SODIO - LABORATORIO - 739	mg/L	E.A.A.	SM 3111 B					N.E.
CALCIO - LABORATORIO - 740	mg/L	E.A.A.	SM 3030 E, SM 3111 B					N.E.
MAGNESIO - LABORATORIO - 741	mg/L	E.A.A.	SM 3030 E, SM 3111 B					N.E.
CLORO RESIDUAL LIBRE - LABORATORIO - 738	mg/L	VOLUMETRICO CON DPD FERROSO	KIT EQUIVALENTE A SM 4500-Cl G					N.E.
CLORO RESIDUAL TOTAL - LABORATORIO - 739	mg/L	VOLUMETRICO CON DPD FERROSO	KIT EQUIVALENTE A SM 4500-Cl G					N.E.

Fuente. Sistema LIMS MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental

6.3 SALIDAS DEL PROCESO DE MICROBIOLOGÍA.

Teniendo las anteriores entradas, el proceso de microbiología, generará una salida fundamental que será el registro diligenciado de parámetros solicitados por el cliente que de igual manera se encuentra en el sistema LIMS y se encuentra exhibido en la imagen 5, el cual será entregado al proceso de Proyectos para realizar el análisis e informe correspondiente.

Imagen 5. Registro de parámetros diligenciado

ORGANIZACIÓN INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN, 100 1700 JULIO DE 2014.
PH: 8,2 COND: 205 TDS: 95

COMENTARIOS ASISTENTE DE LABORATORIO :

REPORT DE RESULTADOS # 1										
PARAMETROS	UNIDADES	TECNICA ANALITICA	METODO		Alicuota 1	Alicuota 2	% REMOCIÓN	LIMITES PERMISIBLES DECRETO 1076 DEL 2015 MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE		
								Art. 2.2.3.3.9.3.	Art. 2.2.3.3.9.4.	Art. 2.2.3.3.9.5.
HORA - 729	h.			20:01				N.E.	N.E.	N.E.
TEMPERATURA MUESTRA - 113	°C	TERMOMETRICO	SM 2550 B	25,3				N.E.	N.E.	N.E.
pH - 91	UNIDADES	ELECTROMETRICO	SM 4500H+ B	8,20				5,0 - 9,0	6,5 - 8,5	4,5 - 9,0
CONDUCTIVIDAD ELECTRICA - 48	µS/cm	ELECTROMETRICO	SM 2510 B	205				N.E.	N.E.	N.E.
OXIGENO DISUELTO - 90	mg O2/L	LUMINISCENCIA	ISO 17289: 2014	6,40				N.E.	N.E.	N.E.
ALCALINIDAD TOTAL - 4	mg CaCO3/L	VOLUMETRICO	SM 2320 B	51,34				N.E.	N.E.	N.E.
NITRATOS - 87	mg N-NO3/L	COLORIMETRICO	SM 4500 NO3 - B	0,484				10,0	10,0	N.E.
NITRITOS - 88	mg N-NO2/L	COLORIMETRICO	SM 4500 NO2 - B	0,0059				1,0	1,0	N.E.
NITROGENO AMONICAL - 666	mg N-NH3/L	DESTILACION - VOLUMETRICO	SM 4500 NH3 - B, F	<2,00				1,0	1,0	N.E.
NITROGENO TOTAL - 731	mg N/L	KJELDAHL - TITULOMETRICO	SM 4500-Norg C, SM 4500-NH3 C	<4,00				N.E.	N.E.	N.E.
FOSFORO TOTAL - 68	mg P/L	ACIDO ASCORBICO	SM 4500 P - E	<0,05				N.E.	N.E.	N.E.
FOSFORO SOLUBLE - 15891	mg P/L	ACIDO ASCORBICO	SM 4500 P E	<0,05				N.E.	N.E.	N.E.
SOLIDOS SEDIMENTABLES - 106	mL/L-h	VOLUMETRICO (CONO IMHOFF)	SM 2540 F	0,3				N.E.	N.E.	N.E.
SOLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES - 107	mg/L	SECADO A 103-105°C	SM 2540 D	400				N.E.	N.E.	N.E.
SOLIDOS SUSPENDIDOS VOLATILES - 706	mg/L	CALCINACIÓN A 550°C	SM 2540 E	100				N.E.	N.E.	N.E.
DBO5 - 52	mg O2/L	INCUBACION 5 DIAS - ELECTRODO DE MEMBRANA	SM 5210 B, SM 4500-O G	20				N.E.	N.E.	N.E.
DQO - 54	mg O2/L	REFLUJO CERRADO - VOLUMETRICO	SM 5220 C	28				N.E.	N.E.	N.E.
GRASAS Y ACEITES - 69	mg/L	PARTICION - INFRARROJO	SM 5520 C	<1,40				S.P.V.	S.P.V.	N.E.
COLIFORMES TOTALES - 697	NMP/100mL	SUSTRATO ENZIMATICO	SM 9223 B	138,0				20 000	1 000	5 000
ESCHERICHIA COLI - 645	NMP/100mL	SUSTRATO ENZIMATICO	SM 9223 B	10,9				N.E.	N.E.	N.E.
ALTURA - 16379	m.s.n.m.	POSICIONAMIENTO GEOGRAFICO GPS		164				N.E.	N.E.	N.E.
pH - LABORATORIO - 725	UNIDADES	ELECTROMETRICO	SM 4500H+ B	7,57				N.E.	N.E.	N.E.
CONDUCTIVIDAD ELECTRICA - LABORATORIO - 726	µS/cm	ELECTROMETRICO	SM 2510 B	169				N.E.	N.E.	N.E.
OXIGENO DISUELTO - LABORATORIO - 727	mg/L	LUMINISCENCIA	ISO 17289: 2014					N.E.	N.E.	N.E.
SOLIDOS SEDIMENTABLES - LABORATORIO - 7932	mL/L-h	VOLUMETRICO (CONO IMHOFF)	SM 2540 F	0,3				N.E.	N.E.	N.E.
SOLIDOS DISUELTOS TOTALES - LABORATORIO - 728	mg/L	ELECTROMETRICO	SM 2540 C	92,9				N.E.	N.E.	N.E.

Fuente: Sistema LIMS MCS Monitoreo y Consultoría Ambiental

CONCLUSIONES

A partir del desarrollo de este trabajo y aplicando los conocimientos adquiridos durante la especialización, se logró obtener las siguientes conclusiones:

- Se realizó un diagnóstico acerca de las necesidades del cliente en donde se logró observar que los principales análisis microbiológicos requeridos son:
 - Coliformes totales (técnica Filtración por Membrana y Número más Probable)
 - Coliformes fecales (técnica Filtración por Membrana y Número más Probable)
 - Escherichia coli (técnica Filtración por Membrana y Número más probable)
 - Recuento de heterótrofos (Técnica de Filtración por Membrana).
- Al realizar un diagnóstico inicial acerca del estado del laboratorio frente al cumplimiento de los requisitos de la norma ISO 17025, se pudo evidenciar que debido a que procesos como los de fisicoquímico y absorción atómica se encuentran acreditados, se cuenta con ciertas bases para el total cumplimiento de los requisitos de la norma, como lo es el Sistema Integrado de Gestión pero los requisitos específicos del proceso de microbiología aún no se les puede dar cumplimiento, por lo cual se debe empezar a trabajar desde el nivel más bajo ya que no se cuenta con ninguna información al respecto; como lo son procedimientos, aseguramiento de calidad, actividades y demás actividades del proceso.
- En la compañía se cuenta con sistema de calidad acreditado según la norma ISO 9001:2008, el cual es un apoyo para algunos de los requisitos que se exigen en la norma ISO 17025:2017. A pesar de ser un buen sistema de calidad se requiere con urgencia la actualización ya que existe una nueva versión de la norma ISO 9001 a la cual debe acogerse el laboratorio.
- Se plantearon tres etapas para la implementación del proceso y su acreditación las cuales se definieron como: Planeación, Implementación y Acreditación. En cada una de estas etapas y con respecto a cada uno de los requisitos de la norma ISO 17025, se establecieron actividades, dentro de las cuales se encuentran la elaboración de los procedimientos, validación y/o verificación de los métodos, cálculo de la incertidumbre, planes de calibración, establecimiento de los perfiles de las personas que irán a trabajar en el laboratorio y compra de equipos necesarios; lo anterior para lograr el objetivo principal el cual es la acreditación del proceso y sus métodos y por ende la entrega de resultados confiables.

- Se propuso el nuevo mapa de procesos con la inclusión del proceso de Microbiología en donde se puede observar su interacción con los demás procesos. Igualmente se logró realizar la caracterización del futuro proceso de microbiología, en donde se especifican las actividades, recursos, responsable, indicadores, entradas, salidas proveedores y cliente para lograr el cumplimiento del objetivo del proceso.
- Una vez implementado el laboratorio, con materiales, equipos y reactivos, se debe realizar el plan para la acreditación de otros parámetros como: *Enterococcus*, *huevos de helmintos*, *salmonella* y *Vibrio sp.*
- La implementación del proceso de microbiología es una inversión a largo plazo, pues a pesar de que su costo es alto, los beneficios se logran al evitar gastos en la subcontratación y transporte de muestras. Igualmente, uno de los beneficios más altos es el aumento en la competitividad del laboratorio, ya que son muchos los laboratorios ambientales que tienen el proceso de microbiología acreditado ante el IDEAM lo cual generará un incremento en las ganancias a mediano y largo plazo.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda iniciar cuanto antes con la elaboración de los planos para el área en la cual se llevará a cabo el proceso de microbiología para con esto dar inicio con los trámites para la compra y adquisición de los equipos necesarios y de esta manera llevar a cabo la validación y/o verificación de los métodos.

Así mismo, es importante tener claras las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs), pues con ellas se obtienen resultados confiables y unida con el cumplimiento de las normas, permite el adecuado desarrollo del proceso de microbiología.

Finalmente se recomienda la adquisición y aplicación del Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater edición 23 ya que se encuentra disponible y será el tenido en cuenta para las nuevas acreditaciones de parámetros, al igual que la adopción del presente plan de implementación propuesto con sus planes de capacitación de personal, validación de técnicas y mantenimiento y calibración de equipos.

BIBLIOGRAFIA

AGUILAR HIDALGO, María Fernanda y SANCHEZ SEQUEIRA, Luis Alfredo. Investigación Sobre ISO 9001. Enero de 2009.

AMERICAN PUPRIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22ND edition 2012. Part 9020A

AMERICAN PUPRIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22ND edition 2012. Part 9020 B

AMERICAN PUPRIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 22ND edition 2012. Part 9020 C

ARENAS, Anny. Sistema de Gestión de la Calidad según ISO-9000. Enero 2009

CARBAJAL ALARCON, Carlos E; RODRIGUEZ LOPEZ, Aarón; REYES DEL VALLE, Adrián; MERCADER TREJO, Flora; HERRERA BASURTO, Raul. Implementación de la Norma ISO 17025 en los Laboratorios Analíticos de Rutina de México

CENOBIO MENDEZ GARCIA, José Claudio; JARAMILLO VIGUERAS, David y SERRANO CRESPO, Ildefonso. Gestión de la Calidad En Procesos de Servicios y Productos. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional, 2006.

FARRELL, Evans M. Food Safety Assurance Systems: Quality Assurance and Good Laboratory Practice. En: Encyclopedia of Food Safety. Febrero 2014

FONTALVO HERRERA, Tomás José y VERGARA SCHMALBACH, Juan Carlos. La Gestión de la Calidad en los Servicios. ISO 9001:2008. Enero de 2010.

GROCHAU HEXSEL, Ines; SCHWENGBER TEN CATEN, Carla. A Process Approach to ISO/IEC 17025 in the Implementation of a Quality Management System in Testing Laboratories. Junio de 2012.

GUY, Robin C. Good Laboratory Practices. En: Encyclopedia of Toxicology (Third edition). Septiembre de 2014.

HESHAM TAWFIK M. ABDEL-FATAH. ISO/IEC 17025 Accreditation: Between the Desired Gains and the Reality. 2010.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC ISO 9001:2015 Sistemas de Gestión de Calidad (requisitos), Bogotá: ICONTEC 2015

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Trabajos Escritos: Presentación y Referencias Bibliográficas. NTC 1486. Sexta actualización ed. Bogotá: ICONTEC, 2008a. 1-36

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Trabajos Escritos: Presentación y Referencias Bibliográficas. NTC 5613. Sexta actualización ed. Bogotá: ICONTEC, 2008b. 1-33

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Trabajos Escritos: Presentación y Referencias Bibliográficas. NTC 4490. Sexta actualización ed. Bogotá: ICONTEC, 2008c. 1-23

INSTITUTO DE HIDROLOGIA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES IDEAM. Portafolio de servicios. [En línea] <http://www.ideam.gov.co/documents/24189/359040/Portafolio_Servicios_IDEAM+%281%29.pdf/da8a0bab-c29d-4588-9a67-3b79c74ca725> [citado el 28 de abril de 2017]

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION (ISO), INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION (IEC). Draft International Standard ISO/IEC 17025 General Requirements For The Competence of Testing and Calibration Laboratories. Marzo de 2017

LÓPEZ NIÑO Desiderio. El Hexágono de la Investigación. Octubre del 2015

MCS MONITOREO Y CONSULTORÍA AMBIENTAL. Resumen del Sistema de Gestión Integral (Calidad – Ambiente – Salud y Seguridad). 2017

PRIETO, Yeniseis Odelin. Good Laboratory Practices and the ISO 9001:2000 Standards. Cuba Octubre 2008.

<http://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/las-5-ventajas-de-contar-con-laboratorios-acreditados-por-enac/> > [Citado el 16 de noviembre de 2017]

ANEXOS

ANEXO A.

DETERMINACIÓN SIMULTANEA DE COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli* EN AGUAS, POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA, CROMÓGENO DOBLE

1. INTRODUCCIÓN

Por medio de este documento, se implementa el procedimiento para el análisis, determinación y cuantificación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua, por el método de filtración por membrana en el Laboratorio de Microbiología de MCS CONSULTORÍA Y MONITOREO AMBIENTAL S.A.S. Este procedimiento se basa en el método SM-9222 H “*Simultaneous Detection of Total Coliform and E. coli by Dual-Chromogen Membrane Filter Procedure*” del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, 2012.

2. PRINCIPIO

El método consiste en determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) de coliformes totales y *Escherichia coli* presentes en 100 mL de muestra ya sea por un volumen fijo o por medio de diluciones.

El grupo de coliformes está compuesto por un gran número de géneros de bacterias, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Este grupo se define como bacilos anaerobios facultativos, gram negativos no formadores de esporas que fermentan la lactosa con producción de gas y ácido a 35°C.

El medio de cultivo m-ColiBlue 24 permite la detección simultanea de coliformes totales y *Escherichia coli* en 24 horas. En su composición tiene un indicador enzimático que permite el crecimiento de coliformes totales de color rojo, mientras que el crecimiento de *E. coli* se da en color azul.

3. ALCANCE

Este método puede ser usado para muestras de agua potable, superficial, subterránea, residuales industriales, residuales domésticas y marinas.

4. DESARROLLO

4.1. MATERIALES Y EQUIPOS.

- Cajas de Petri de 60 X 15
- Balanza analítica.
- Tubo tapa rosca de vidrio
- Micropipetas de 100 – 1000 µL
- Puntas estériles para micropipeta de 100 – 1000 µL
- Horno de esterilización
- Plancha de calentamiento
- Autoclave
- Incubadora a 35 °C ± 0,5 °C
- Equipo de filtración por membrana
- Mechero

- Pinzas metálicas en acero inoxidable
- Membranas estériles con poro de 0,45 µm, cuadrícula y pad absorbente.
- Contador de colonias
- Vortex
- Balanza analítica con capacidad de 210 gr
- Cronometro
- Nevera de medios de cultivo
- Nevera de muestras
- Lámpara de luz UV

4.2. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

- Medio de cultivo m-ColiBlue 24
- Agua destilada
- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄)
- Cloruro de magnesio (MgCl₂)
- Desinfectante en rotación
- Alcohol etílico al 70%

4.3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

4.3.1. Diluyente agua tamponada:

1. Preparación de la solución stock de fosfato: Disolver 34 gr de dihidrógeno de potasio (KH₂PO₄) en 500 mL de agua destilada y ajustar el pH en 7,2 ± 0,5 con hidróxido de sodio 1N (NaOH) y diluir a 1 L de agua destilada. Posterior a esto esterilizar en autoclave. Mantener la solución refrigerada y descartar si se observa turbidez.
2. Preparación de la solución de cloruro de magnesio: Disolver 81,1 gr de MgCl₂ · 6H₂O ó 38 gr/L de MgCl₂ en 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave. Mantener en refrigeración y descartar si se observa turbidez.
3. Preparación de solución de trabajo: Adicionar 1,25 ml de la solución stock de fosfato y 5,0 mL de la solución stock de cloruro de magnesio a 1 L de agua destilada, teniendo en cuenta que el pH final debe ser de 7,2. Dispensar 9 mL en tubos de 16 x 150 y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Mantener refrigerada la solución y descartar si se observa turbidez.

4.3.2. Medio de cultivo m-ColiBlue 24

Agitar suavemente el frasco o las ampollas invirtiéndose dos o tres veces. Dispensar (aproximadamente 2,0 mL o una ampolleta) sobre el pad absorbente y tapar la caja de Petri.

Para cada lote nuevo de medio, realizar un control positivo y uno negativo.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Análisis

- 5.1.1. Esterilizar el área por medio de la luz U.V. por 30 minutos.
- 5.1.2. Esterilizar el equipo de filtración por membrana, tal como se indica en el respectivo instructivo.
- 5.1.3. Usar los EPP necesarios: uniforme antifluido, bata, gafas de seguridad y guantes.
- 5.1.4. Retirar el agua tamponada estéril y las muestras a analizar de la nevera, con el fin de que se atemperen.
- 5.1.5. Cerca al mechero, destapar las cajas de Petri y con las pinzas estériles previamente sumergidas en alcohol y flameadas, colocar en cada una un pad absorbente.
- 5.1.6. Agitar las ampollas o el frasco del caldo m-ColiBlue 24 y dispensar 2 mL del mismo (o una ampolleta) por cada pad.
- 5.1.7. Encender el mechero y realizar las diluciones necesarias en agua tamponada, dependiendo de la muestra, como se indica a continuación:
- Sostener la muestra al lado del mechero e inclinarla en un ángulo de 45°, agitarla fuertemente con 25 movimientos de vaivén hacia arriba y hacia abajo, lo anterior con la intención de una buena homogenización de la muestra.
 - Destapar la muestra evitando que la boca del recipiente tenga contacto con los guantes o cualquier otro implemento.
 - Con una micropipeta de 100 – 1000 μL (ajustada en 1000 μL y con puntas estériles), introducir la punta en la muestra (aproximadamente entre 1 y 3 mm) y tomar 1 mL de la muestra; retirando la punta de la muestra pero sin sacarla del envase expulsar el mL recién tomado y volver a tomar 1 mL de la muestra. Ver figura 1.



Fig. 1. Uso de la micropipeta

Tomada de: <http://avibert.blogspot.com/2011/08/buen-uso-y-cuidado-de-pipetas.html>

- Tomar uno de los tubos de agua tamponada (debidamente marcado con el número de muestra y la dilución, en este caso 1*) y destaparlo al lado del mechero, flamear la boca del tubo e introducir la punta de la micropipeta (sin tocar el líquido) y vaciar su contenido.
- Tapar el tubo y descartar la punta usada en hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Tomar el tubo y ponerlo en el vortex por 15 segundos para que la muestra obtenga una buena homogenización.

- Para las siguientes diluciones (-1, -2, -3.....) repetir el procedimiento desde el último tubo. Ver figura 2.

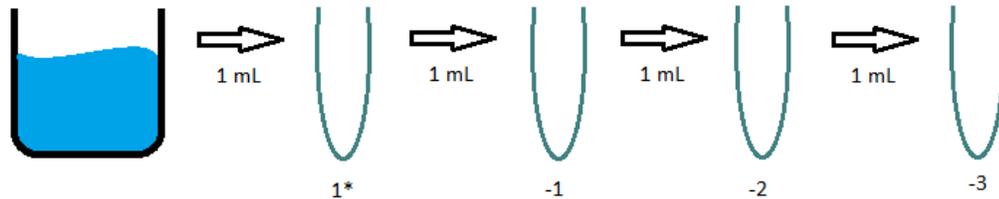


Fig. 2: Diagrama de diluciones. Nota: Cada tubo tiene 9 mL de agua tamponada.
Fuente: El autor

5.2. Filtración de la muestra

- 5.2.1. Armar el equipo de filtración como se indica en el instructivo _____
- 5.2.2. Con unas pinzas estériles (sumergidas previamente en alcohol y flameadas en el mechero) tomar una membrana de nitrocelulosa
- 5.2.3. Retirar el embudo del equipo de filtración y situar la membrana sobre el portafiltros con la cuadrícula hacia arriba.
- 5.2.4. Colocar nuevamente el embudo, cerciorándose que quede bien asegurado.
- 5.2.5. Tomar el tubo de la dilución a filtrar y llevarlo al vortex por 15 segundos, destaparlo y flamear su boca. Seguido a esto retirar la tapa del embudo y verter la muestra o dilución y tapar nuevamente el embudo. NOTA: En el caso que se vaya a verter la muestra directamente, homogenizarla mediante 25 movimientos de vaivén hacia arriba y hacia abajo, ya que en este caso no aplica el uso del vortex.
- 5.2.6. Cuando se vayan a filtrar volúmenes de muestras menores a 10 mL (diluida o sin diluir), agregar primero un tubo de agua tamponada estéril al embudo, luego la muestra o dilución y seguido a esto 25 a 50 mL de agua tamponada estéril. Lo anterior se hace con el ánimo de que haya una dispersión uniforme de la carga bacteriana sobre la membrana.
- 5.2.7. Tapar el embudo, prender la bomba y abrir la llave para que se filtre la muestra, verificar que se filtre la totalidad del volumen depositado en el embudo.
- 5.2.8. Agregar de 20 a 30 mL de agua tamponada estéril y seguir filtrando. Repetir este paso 2 veces más para completar un total de tres lavados. Lo anterior para evitar la contaminación por arrastre.
- 5.2.9. Apagar la bomba, retirar el embudo y por medio de las pinzas estériles (previamente sumergidas en alcohol y flameadas en el mechero), tomar la membrana de nitrocelulosa.
- 5.2.10. Colocar la membrana sobre el pad empapado del medio m-ColiBlue24 con un movimiento de balanceo, evitando que quede aire entre el medio de cultivo.
- 5.2.11. Destapar el embudo y adicionar agua hirviendo, dejar actuar por 2 minutos, prender la bomba y dejar que evacue toda el agua. Lo anterior para esterilizar el embudo y evitar la contaminación.
- 5.2.12. Dejar aclimatar el embudo y repetir el procedimiento con una nueva muestra.

Nota: Cuando se trabajen diluciones de la misma muestra, filtrar desde la más diluida a la menos diluida y no se realiza la purga con agua hirviendo entre diluciones sino en el momento de filtrar otra muestra.

5.2.13. Dejar reposar por 30 minutos, invertir las cajas y llevar a incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

6. CAPTURA DE DATOS

Los resultados obtenidos se deben registrar en el formato _____, indicando todos los datos solicitados en el formato y de ser el caso las observaciones.

7. CÁLCULOS

7.1. Lectura

7.1.1. Una vez cumplido el tiempo de incubación, retirar las cajas de la incubadora y organizarlas por número de muestra y dilución.

7.1.2. Se deben seleccionar las cajas que tengan entre 20 y 80 colonias y que no sobrepasen las 200 colonias para el caso de coliformes totales, para el caso de *E. coli* se deben seleccionar las que tengan entre 20 y 60 colonias y no más de 200; pues es este el número ideal de colonias por caja debido al tamaño y característica de las colonias.

7.1.3. Realizar el conteo, usando el contador de colonias, de todas las colonias teniendo en cuenta las siguientes características:

- Colonias rojas, azules y púrpura → Coliformes totales.
- Colonias azules y púrpura → *Escherichia coli*.

7.1.4. Para determinar las UFC/100 mL, aplicar las siguientes formulas:

$$\text{UFC coliformes totales/100 mL} = \frac{\text{Número de colonias rojas, azules y púrpura}}{\text{Volumen de muestra filtrada}} \times 100$$

$$\text{UFC Escherichia coli/100 mL} = \frac{\text{Número de colonias azules y púrpura}}{\text{Volúmen de muestra filtrada}} \times 100$$

Para el uso de las anteriores ecuaciones, tener en cuenta los siguientes volúmenes de muestra por dilución:

$$\begin{aligned} 1^* &\rightarrow 1 \text{ mL} \\ 10^{-1} &\rightarrow 0,1 \text{ mL} \\ 10^{-2} &\rightarrow 0.01 \text{ mL} \\ 10^{-3} &\rightarrow 0.001 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$10^{-4} \rightarrow 0.0001 \text{ mL}$$

$$10^{-5} \rightarrow 0.00001 \text{ mL}$$

$$10^{-6} \rightarrow 0.000001 \text{ mL}$$

$$10^{-7} \rightarrow 0.0000001 \text{ mL}$$

$$10^{-8} \rightarrow 0.00000001 \text{ mL}$$

7.1.5. Al momento de filtrar 100 mL de muestra y no obtener recuento, reportar como <1 UFC/100 mL

7.1.6. Si se encuentra un crecimiento bacteriano muy alto y las colonias se superponen unas a otras, es decir no se distinguen entre ellas, se reporta como confluyente (Cte)

7.1.7. Si en la membrana se tiene un número de colonias mayor a 200, se reportará como TNTC, que por sus siglas en inglés quiere decir que es muy numeroso para contar.

7.1.8. En el caso en el que se tengan membranas con conteos por fuera del rango ideal, se deben totalizar los conteos de todas las membranas y reportar como UFC/100 mL. Un ejemplo es cuando se examina un volumen de 50 mL por duplicado y se obtienen conteos de 5 coliformes totales en una membrana y 3 coliformes totales en la otra, para este caso se reportará de la siguiente manera:

$$\frac{[(5 + 3) \times 100]}{(50 + 50)} = 8 \text{ UFC/100 mL}$$

7.1.9. Si se filtran volúmenes de 50, 25 y 10 mL y los conteos obtenidos son 15, 6 y <1 correspondientemente, se calculará el resultado sobre el valor más cercano al rango ideal de conteo y se reportará como estimado de la siguiente manera:

$$\frac{15 \times 100}{50} = 30 \text{ UFC/100 mL E (Estimado)}$$

7.1.10. En el caso en el que se filtren volúmenes de 10, 1 y 0,1 mL y se presentan recuentos de 40, 9 y <1 respectivamente, para calcular las UFC/100 mL se toma el dato obtenido al filtrar los 10 mL ya que el número de colonias se encuentra en el rango ideal:

$$\frac{40 \times 100}{10} = 400 \text{ UFC/100 mL}$$

7.1.11. En el caso en el que se filtren los siguientes volúmenes: 10, 1 y 0,1 mL y se obtengan recuentos de TNTC, 150 y 92 colonias respectivamente, el volumen a tener en cuenta es el de 0,1 mL ya que es el más cercano al rango ideal y se reporta como estimado:

$$\frac{92 \times 100}{0.1} = 92\,000 \text{ UFC/100 mL E (Estimado)}$$

7.1.12. Si en algún momento se filtraran diferentes volúmenes como los siguientes: 1, 0,3, 0,1, y 0,03 mL y se obtengan los siguientes conteos respectivamente: TNTC, TNTC, 56 y 21 colonias, entonces se suman los dos conteos que están en el rango ideal y se divide por la suma de los dos volúmenes de la siguiente manera:

$$\frac{(56 + 21) \times 100}{(0,1 + 0,03)} = 59\,000 \text{ UFC/100 mL}$$

8. CONTROL DE CALIDAD

- 8.1. Blanco inicial y blanco final:** Este control consiste en tomar el diluyente como si fuera una muestra y filtrar 100 mL; se debe colocar la membrana en un agar nutritivo (por ejemplo R2A) e incubar en las mismas condiciones de las muestras analizadas. Este control debe realizarse al inicio de las siembras y al final. Si se observa crecimiento, se deben invalidar los datos obtenidos de las muestras analizadas, solicitar nuevas muestras y volver a analizar.
- 8.2. Control de contaminación por coliformes:** Para este control, se deben tomar 30 mL de diluyente y filtrarlo. Se coloca la membrana en medio m-ColiBlue24 y se incuba al igual que las otras muestras. Este control se debe realizar al inicio y al final de todo el proceso de filtración. Si se observa crecimiento se deben rechazar todos los resultados obtenidos y solicitar nuevas muestras para su nuevo análisis.
- 8.3. Control de contaminación cruzada:** Este control consiste en filtrar 100 mL de diluyente cada diez muestras e incubar a las mismas condiciones. El objetivo de este control es verificar que no hay contaminación cruzada entre muestras y que el agua tamponada está estéril. Si se llega a observar crecimiento, rechazar todos los resultados obtenidos y solicitar nuevamente las muestras para su análisis.
- 8.4. Control de esterilidad por lote de muestras:** Para este control se debe tomar una caja al azar del medio de cultivo a usar e incubar en las mismas condiciones de las muestras. Este control se lleva a cabo para evidenciar que el medio de cultivo se encuentra estéril. Si se observa crecimiento se deben rechazar los datos obtenidos y pedir las muestras nuevamente para su análisis.
- 8.5. Duplicados:** Se deben realizar duplicados al 10% de las muestras analizadas, y tener en cuenta que se cubran todas las matrices. Los datos deben ser diligenciados en el formato _____ de criterio de precisión para microbiología.
- 8.6. Control de conteo individual:** Mensualmente, cada analista debe contar las colonias de una misma caja positiva y la variabilidad de estos conteos no puede ser mayor al 5%. Registrar los datos en el formato _____
- 8.7. Control de conteo entre microbiólogos:** Mensualmente, dos analistas deben contar las colonias de una misma caja con resultado positivo; la variabilidad de estos conteos no debe ser mayor al 10%. Registrar los datos en el formato _____

Nota: Si en uno de los dos puntos anteriores, se supera el límite de variabilidad, el coordinador del área debe recapacitar a los microbiólogos en la lectura de resultados.

- 8.8. Control de guantes:** Diariamente se debe tomar una muestra del guante del analista y sembrarse en el medio de cultivo que se está usando en el momento de la siguiente manera:
- Sumergir el hisopo estéril en agua tamponada estéril.
 - Realizar un frotis por los guantes del analista.
 - Realizar un proceso de siembra masiva (movimiento de zic zac en todas las direcciones) sobre el medio de cultivo de interés.
 - Incubar bajo las mismas condiciones de las muestras.
 - Si se observa crecimiento, rechazar todos los resultados obtenidos, tomar las acciones pertinentes y pedir nuevamente las muestras para un nuevo análisis.
- 8.9. Verificación de colonias de coliformes totales (Realizar mensualmente):** Para este control se deben tomar 5 colonias típicas y confirmarse en caldo lauryl triptosa de la siguiente manera:
- 8.9.1.** Con un asa estéril, tomar cada colonia e inocular el tubo con caldo lauryl triptosa.

- 8.9.2.** Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 48 ± 2 horas y revisar la producción de gas y/o la producción de ácido por el viraje de color del medio de cultivo a color amarillo.
- 8.9.3.** Tomar los tubos que muestren producción de gas y/o producción de ácido, agitarlos suavemente y transferir con un asa estéril al caldo verde bilis brillante lactosa.
- 8.9.4.** Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 48 ± 3 horas.
- 8.9.5.** Si se observa producción de gas, la prueba es positiva para coliformes totales.
- 8.10. Verificación de colonias de *Escherichia coli*** (Realizar mensualmente): Para este control se deben repetir los numerales 8.9.1 y 8.9.2., posteriormente realizar los siguientes pasos:
- 8.10.1.** Tomar los tubos que muestren producción de gas y/o producción de ácido, agitarlos suavemente y transferir con un asa estéril al medio de cultivo EC - MUG.
- 8.10.2.** Incubar los tubos a $44,5 \pm 0,2$ °C por 24 ± 2 horas.
- 8.10.3.** Leer los tubos con luz UV. La presencia de fluorescencia azul indica la prueba positiva para *Escherichia coli*.

Nota: Para las confirmaciones anteriormente descritas, también es válido usar sistemas multi test comerciales para *Enterobacteriaceae* que incluya fermentación de lactosa y/o β -galactosidasa.

8.11. Controles positivos y negativos: Este control consiste en que por cada lote de medio de cultivo preparado, realizar una siembra masiva con el microorganismo de interés (control positivo) y otra con un microorganismo de interferencia (control negativo), incubar en las mismas condiciones de las muestras y tener en cuenta lo siguiente:

- Si hay crecimiento del microorganismo de interés (control positivo), y no se observa crecimiento del microorganismo de interferencia (control negativo) el lote se aprueba.
- Si no hay crecimiento del microorganismo de interés, el lote se debe rechazar al igual que todos los datos obtenidos con ese lote de medio de cultivo.
- Si se observa crecimiento del microorganismo de interferencia (control negativo), el lote se debe rechazar al igual que todos los datos obtenidos con ese lote de medio de cultivo.

9. EVALUACIÓN DEL METODO

10. MEDIDAS DE SEGURIDAD.

El personal del laboratorio debe conocer y cumplir todas las normas y reglamentos establecidos por el área de HSEQ, de igual manera debe cumplir con el adecuado uso de los siguientes Elementos de Protección Personal:

- Bata
- Gafas de seguridad
- Antifluidos
- Tapabocas y gorro o cofia
- Guantes de nitrilo
- Calzado adecuado.

11. DOCUMENTOS DE REFERENCIA.

- American Public Health Association, American Water Works Association. Water Environment Federation. "Standard Methods the examination of water and wastewater". 22st edition. 2012.
- NTC 4772:2008. Calidad del Agua. Detección y Recuento de *Escherichia coli* y de Bacterias Coliformes. Parte 1: Método de Filtración Por Membrana.

- USEPA Membrane Filtration Method, Method 10029
Inserto del caldo de cultivo m-ColiBlue24

ANEXO B.

ENUMERACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli* POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP/100 mL), TECNOLOGÍA DE SUSTRATO ENZIMÁTICO COLILERT

1. INTRODUCCIÓN

Por medio de este documento, se implementa el procedimiento para el análisis, determinación y cuantificación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua, por el método de número más probable en el Laboratorio de Microbiología de MCS CONSULTORÍA Y MONITOREO AMBIENTAL S.A.S. Este procedimiento se basa en el método SM-9223 B “*Enzyme Substrate Coliform Test*” del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, 2012.

2. PRINCIPIO

El método consiste en determinar el número más probable (NMP) de coliformes totales y de *Escherichia coli* presentes en 100 mL de muestra ya sea por un volumen fijo o por medio de diluciones.

Las bacterias coliformes totales producen una enzima llamada la β -D-galactosidasa, la cual es capaz de unirse e hidrolizar ciertos sustratos cromogénicos como los son el orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosida (ONPG) o el clorofenol rojo- β -D-galactopiranosida (CPRG). Esta hidrólisis genera un cambio de color, lo cual indica una prueba positiva para bacterias coliformes totales.

Por parte de la prueba para *Escherichia coli*, un sustrato fluorogénico como lo es el 4-metil-umbeliferil- β -D-glucoronida (MUG), es usado para detectar la enzima β -glucoronidasa que es producida por esta bacteria. La enzima β -glucoronidasa hidroliza el sustrato y produce un producto fluorescente que es posible de ver bajo luz ultravioleta (365 nm), lo cual indica una prueba positiva para *Escherichia coli*.

3. ALCANCE

Este método se puede ser usado para muestras de agua potable, superficial, subterránea, residuales industriales, residuales domésticas y marinas.

4. DESARROLLO

4.1. MATERIALES Y EQUIPOS.

- Mechero
- Frascos de vidrio con capacidad de 100 mL
- Micropipeta de 1 a 10 mL
- Puntas estériles para micropipeta de 1 a 10 mL
- Probeta de vidrio de 100 mL
- Dispositivo Quanti-Tray/2000
- Comparador Quanti-Tray/2000
- Tabla de NMP IDDEX Quanti-Tray/2000
- Sellador Quanti-Tray
- Lámpara de luz UV

- Autoclave
- Incubadora a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Cabina con lámpara de luz UV a 365 nm de longitud de onda

4.2. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

- Reactivo Colilert
- Agua destilada estéril
- Desinfectante en rotación
- Alcohol etílico al 70%

4.3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

4.3.1. Diluyente agua peptonada:

4. El reactivo Colilert es un polvo que viene en presentación por ampolletas para ser agregados a 100 mL de muestra (o muestra y agua en el caso de las diluciones).

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Análisis

5.1.1. Esterilizar el área por medio de la luz U.V. por 30 minutos.

5.1.2. Usar los EPP necesarios: uniforme antifluido, bata, gafas de seguridad y guantes.

5.1.3. Retirar las muestras a analizar de la nevera, con el fin de que se atemperen.

5.1.4. Encender el mechero y realizar las diluciones necesarias en agua destilada estéril, dependiendo de la muestra, como se indica a continuación:

- Sostener la muestra al lado del mechero e inclinarla en un ángulo de 45° , agitarla fuertemente con 25 movimientos de vaivén hacia arriba y hacia abajo, lo anterior con la intención de una buena homogenización de la muestra.
- Destapar la muestra evitando que la boca del recipiente tenga contacto con los guantes o cualquier otro implemento.
- Con una micropipeta de 1 – 10 mL (ajustada en 10 mL y con puntas estériles), introducir la punta en la muestra (entre 1 y 3 mm) y tomar 10 mL de la muestra; retirando la punta de la muestra pero sin sacarla del envase expulsar los 10 mL recién tomados y volver a tomar 10 mL de la muestra. Ver figura 1.



Fig. 1. Uso de la micropipeta

Tomada de: <http://avibert.blogspot.com/2011/08/buen-uso-y-cuidado-de-pipetas.html>

- Tomar uno de los frascos con agua destilada estéril (debidamente marcado con el número de muestra y la dilución, en este caso 10^{-1}) y destaparlos al lado del mechero, flamear la boca del frasco e introducir la punta de la micropipeta (sin tocar el líquido) y vaciar su contenido.
- Tapar el frasco y descartar la punta usada en hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Tomar el frasco y agitarlo para que la muestra obtenga una buena homogenización.
- En el caso en el que se deban realizar más diluciones y de igual manera sembrar la dilución 10^{-1} , esta se debe realizar por duplicado, pues una se usará en la siembra y la otra para realizar la siguiente dilución.
- Para las siguientes diluciones (-1, -2, -3.....) repetir el procedimiento desde el último frasco. Ver figura 2.

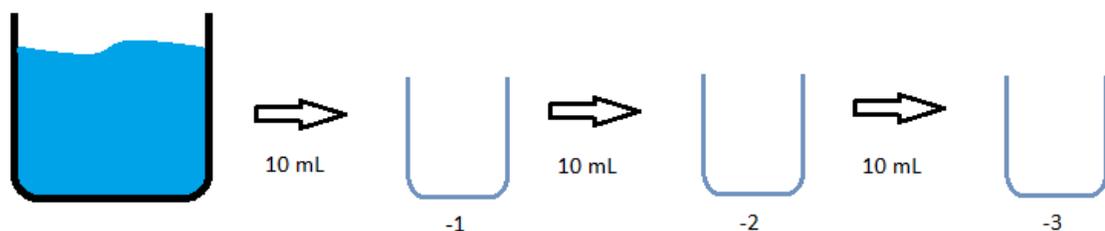


Fig. 2: Diagrama de diluciones. Nota: Cada frasco tiene 90 mL de agua destilada estéril.

Fuente: El autor

5.2. Adición de Colilert y sellamiento

- 5.2.1. Tomar una ampolleta, abrirla y agregarla a los 100 mL de muestra o dilución, como se indica en la figura 3.

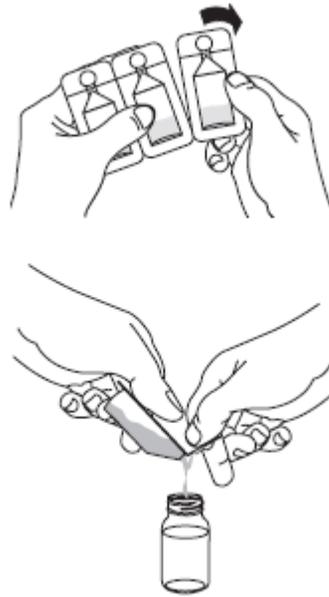


Fig 3: Adición del reactivo colilert en la muestra. Fuente: IDDEX Laboratories Inc. www.idexx.com/resource-library/water/colilert-procedure-en.pdf

- 5.2.2. Tapar la muestra y agitar hasta que se disuelva el reactivo por completo.
- 5.2.3. Tomar el dispositivo Quanti-Tray/2000 debidamente marcado con el número de muestra y su dilución y agregar la mezcla de la muestra con el reactivo colilert como se indica en la figura 4.



Fig 4. Adición de la mezcla de muestra y reactivo colilert al dispositivo Quanti-Tray/2000. Fuente: IDDEX Laboratories Inc. www.idexx.com/resource-library/water/colilert-procedure-en.pdf

- 5.2.4. Golpear los pocillos pequeños para eliminar las burbujas y dejar reposar un momento.
- 5.2.5. Colocar el dispositivo Quanti-Tray/2000 sobre el portadispositivo especial de goma, colocarlo sobre la bandeja del sellador Quanti-Tray 2X, (las celdas deben ir boca abajo), y pasarlo por el equipo para que se selle, como se indica en la figura 5.



Fig 5. Sellado de la muestra. Fuente: IDDEX Laboratories Inc. Inserto kit de Colilert para prueba.

5.2.6. Tomar las bandejas selladas y llevarlas a la incubadora a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

6. CAPTURA DE DATOS

Los resultados obtenidos se deben registrar en el formato _____, indicando todos los datos solicitados en el formato y de ser el caso las observaciones.

7. CÁLCULOS

7.1. Lectura

7.1.1. Luego de cumplidas las 24 horas de incubación, retirar los dispositivos Quanti-Tray/2000 de la incubadora

7.1.2. Contar los pozos positivos grandes y pequeños según lo siguiente:

- Si el color del pozo es igual o más amarillo que el del comparador, es positivo para coliformes totales
- Si el pozo es igual o más amarillo que el del comparador y presenta fluorescencia, es positivo para *Escherichia coli*.
- Si el color del pozo es menos amarillo que el del comparador, este es negativo para coliformes totales y *Escherichia coli*.

7.1.3. Para observar la fluorescencia, se debe introducir el dispositivo Quanti-Tray/2000 en la cabina de luz UV a 365 nm, encenderla y contar los pozos.

7.1.4. Después de realizar el conteo de los pozos positivos, tanto grandes como chicos, determinar el valor por medio de la tabla entregada por el proveedor para el cálculo de NMP/100 mL. Si la muestra requirió de diluciones, se debe dividir el valor obtenido en la tabla por el factor de dilución, teniendo en cuenta lo siguiente:

DILUCIÓN	FACTOR DE DILUCIÓN
10^{-1}	0,1
10^{-2}	0,01
10^{-3}	0,001
10^{-4}	0,0001

10^{-5}	0,00001
10^{-6}	0,000001
10^{-7}	0,0000001

8. CONTROL DE CALIDAD

- 8.1. Control positivo coliformes totales:** Para este control se inoculan 100 mL de agua destilada estéril con una cepa certificada de cualquier bacteria coliforme (por ejemplo *Enterobacter aerogenes*) y se analiza e incuba como el resto de las muestras. Si no se observan resultados positivos, repetir los análisis.
- 8.2. Control positivo de *Escherichia coli*:** Para este control, se inoculan 100 mL de agua destilada estéril con una cepa certificada de *Escherichia coli* y se analiza e incuba como el resto de las muestras. Se deben observar resultados positivos para *E. coli*, es decir fluorescencia. Si no se observan resultados positivos, repetir los análisis.
- 8.3. Control negativo:** Para este control, se inoculan 100 mL de agua destilada estéril con una cepa certificada de una bacteria no coliforme (por ejemplo *Pseudomonas aureginosa*) y se analiza e incuba como el resto de las muestras. No debe haber reacción positiva en ningún pozo. Si se observan resultados positivos, repetir los análisis.
- 8.4. Control de esterilidad:** Este control consiste en analizar 100 mL de agua destilada estéril en las mismas condiciones de las muestras. Si se observa alguna reacción positiva, rechazar los resultados obtenidos y analizar nuevamente las muestras.
- 8.5. Duplicados:** Se deben realizar duplicados al 10% de las muestras analizadas, y tener en cuenta que se cubran todas las matrices. Los datos deben ser diligenciados en el formato _____ de criterio de precisión para microbiología.
- 8.6. Control de guantes:** Diariamente se debe tomar una muestra del guante del analista y sembrarse en el medio de cultivo selectivo para el microorganismo de interés.
- Sumergir el hisopo estéril en agua tamponada estéril.
 - Realizar un frotis por los guantes del analista.
 - Realizar un proceso de siembra masiva (movimiento de zic zac en todas las direcciones) sobre el medio de cultivo de interés.
 - Incubar bajo las mismas condiciones de las muestras.
 - Si se observa crecimiento, rechazar todos los resultados obtenidos, tomar las acciones pertinentes y pedir nuevamente las muestras para un nuevo análisis.

9. EVALUACIÓN DEL METODO

10. MEDIDAS DE SEGURIDAD.

El personal del laboratorio debe conocer y cumplir todas las normas y reglamentos establecidos por el área de HSEQ, de igual manera debe cumplir con el adecuado uso de los siguientes Elementos de Protección Personal:

- Bata
- Gafas de seguridad
- Antifluidos
- Tapabocas y gorro o cofia
- Guantes de nitrilo

- Calzado adecuado.

11. DOCUMENTOS DE REFERENCIA.

- American Public Health Association, American Water Works Association. Water Environment Federation. "Standard Methods the examination of water and wastewater". 22nd edition. 2012.
- Inserto del kit para prueba de coliformes Colilert
- Iddex Laboratories Inc. www.idexx.com/resource-library/water/colilert-procedure-en.pdf

ANEXO C.

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES (FECALES) POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EN AGUAS

1. INTRODUCCIÓN

Por medio de este documento, se implementa el procedimiento para el análisis, determinación y cuantificación de coliformes termotolerantes (fecales) en muestras de agua, por el método de filtración por membrana en el Laboratorio de Microbiología de MCS CONSULTORÍA Y MONITOREO AMBIENTAL S.A.S. Este procedimiento se basa en el método SM-9222 D “*Thermotolerant (fecal) Coliform Membrane Filtration Procedure*” del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, 2012.

2. PRINCIPIO

El método consiste en determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) de coliformes fecales presentes en 100 mL de muestra ya sea por un volumen fijo o por medio de diluciones.

Los coliformes termotolerantes (también conocidos como fecales), son bacterias gram negativas que fermentan la lactosa y producen gas a 44,5 °C, se encuentran en la materia fecal pero también se han sido documentados en aguas ricas orgánicamente o climas tropicales en la ausencia o reciente contaminación fecal.

El medio de cultivo m-FC es un medio selectivo para aislamiento, diferenciación y enumeración de coliformes fecales en aguas y líquidos en general mediante la técnica de filtración por membrana. Este medio contiene proteosa y triptosa que proveen vitaminas, nitrógeno, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento de los microorganismos, de igual manera tiene extracto de levadura el cual es una fuente de vitaminas del grupo B que son esenciales para el crecimiento bacteriano. El azul de alanina actúa como indicador de pH; los coliformes por su actividad fermentadora de lactosa, acidifican el medio y generan colonias azules mientras las bacterias no fermentadoras producen colonias grises.

3. ALCANCE

Este método se puede ser usado para muestras de agua potable, superficial, subterránea, residuales industriales, residuales domésticas y marinas.

4. DESARROLLO

4.1. MATERIALES Y EQUIPOS.

- Balanza analítica.
- Cajas de Petri de 60 X 15
- Tubos tapa rosca de vidrio
- Micropipetas de 100 – 1000 µL
- Puntas estériles para micropipeta de 100 – 1000 µL
- Horno de esterilización

- Plancha de calentamiento
- Autoclave
- Incubadora a $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Mechero
- Pinzas metálicas en acero inoxidable
- Membranas estériles con poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ y cuadrícula
- Equipo de filtración por membrana
- Contador de colonias
- Vortex
- Balanza analítica con capacidad de 210 gr
- Cronometro
- Nevera de medios de cultivo
- Nevera de muestras
- Lámpara de luz UV

4.2. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

- Agar m-FC
- Agua destilada
- Ácido rosólico
- Caldo EC
- Caldo Lauryl Triptosa
- Reactivo de Indol
- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4)
- Cloruro de magnesio (MgCl_2)
- Desinfectante en rotación
- Alcohol etílico al 70%

4.3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

4.3.1. Diluyente agua peptonada:

5. Preparación de la solución stock de fosfato: Disolver 34 gr de dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) en 500 mL de agua destilada y ajustar el pH en $7,2 \pm 0,5$ con hidróxido de sodio 1N (NaOH) y diluir a 1 L de agua destilada. Posterior a esto esterilizar en autoclave. Mantener la solución refrigerada y descartar si se observa turbidez.
6. Preparación de la solución de cloruro de magnesio: Disolver 81,1 gr de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ó 38 gr/L de MgCl_2 en 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave. Mantener en refrigeración y descartar si se observa turbidez.
7. Preparación de solución de trabajo: Adicionar 1,25 ml de la solución stock de fosfato y 5,0 mL de la solución stock de cloruro de magnesio a 1 L de agua destilada, teniendo en cuenta que el pH final debe ser de 7,2. Dispensar 9 mL en tubos de 16 x 150 y esterilizar en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Mantener refrigerada la solución y descartar si se observa turbidez.

4.3.1. Agar m-FC

Disolver 52 gr en 1 L de agua destilada, calentar mientras se disuelve completamente y adicionar 10 mL de una solución 1% de ácido rosólico preparado en NaOH 0,2 N; continuar calentando y agitando por aproximadamente 1 minuto. **NO AUTOCLAVAR.**

Servir en cajas de Petri y refrigerar. Descartar los agares que no se usaron después de 2 semanas.

Para cada lote nuevo de medio, verificar mínimo diez colonias obtenidas de muestras naturales para asegurar la ausencia de falsos positivos.

4.3.2. Ácido rosólico

Para la preparación del ácido rosólico al 1% en NaOH 2N, partimos de una concentración inicial del 85% y queremos un volumen de 1 L, usamos la fórmula:

$$V1C1 = V2C2$$

Despejando:

$$V1 = \frac{V2C2}{C1}$$

Donde:

V1 = Volumen inicial

C1 = Concentración inicial

V2 = Volumen final

C2 = Concentración final

$$V1 = \frac{1000 \text{ ml} \times 1\%}{85\%}$$

$V1 = 11,76 \rightarrow$ Se deben agregar 11,76 gr de ácido rosólico a 1 L de NaOH 0.2 N.

Para la solución 0,2 N de NaOH se usa la siguiente regla de 3:

NaOH 1 N \rightarrow 40 gr

NaOH 0,2 N \rightarrow X

$$X = \frac{0,2 \text{ N} \cdot 40 \text{ gr}}{1 \text{ N}}$$

X = 8 gr

Para preparar una solución 0,2 N de NaOH, se deben disolver 8 gr de NaOH (100%) en 1 L de agua destilada.

Esta solución no se debe esterilizar ya que puede descomponerse.

Refrigerar la solución en oscuridad por máximo 2 semanas, o descartar antes si el color pasa a un marrón oscuro.

En la mayoría de los casos el medio m-FC se puede utilizar sin la adición del ácido rosólico, siempre y cuando no haya interferencia con el crecimiento de fondo, la cual se da generalmente en aguas pluviales recogidas durante la primera escorrentía, después de un largo periodo de sequía.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Análisis

- 5.1.1. Esterilizar el área por medio de la luz U.V. por 30 minutos.
- 5.1.2. Esterilizar el equipo de filtración por membrana, tal como se indica en el respectivo instructivo.
- 5.1.3. Usar los EPP necesarios: uniforme antifluido, bata, gafas de seguridad y guantes.
- 5.1.4. Retirar el agua tamponada estéril y las muestras a analizar de la nevera, con el fin de que se atemperen.
- 5.1.5. Encender el mechero y realizar las diluciones necesarias en agua tamponada, dependiendo de la muestra, como se indica a continuación:
 - Sostener la muestra al lado del mechero e inclinarla en un ángulo de 45°, agitarla fuertemente con 25 movimientos de vaivén hacia arriba y hacia abajo, lo anterior con la intención de una buena homogenización de la muestra.
 - Destapar la muestra evitando que la boca del recipiente tenga contacto con los guantes o cualquier otro implemento.
 - Con una micropipeta de 100 – 1000 μL (ajustada en 1000 μL y con puntas estériles), introducir la punta en la muestra (aproximadamente entre 1 y 3 mm) y tomar 1 mL de la muestra; retirando la punta de la muestra pero sin sacarla del envase expulsar el mL recién tomado y volver a tomar 1 mL de la muestra. Ver figura 1.



Fig. 1. Uso de la micropipeta

Tomada de: <http://avibert.blogspot.com/2011/08/buen-uso-y-cuidado-de-pipetas.html>

- Tomar uno de los tubos de agua tamponada (debidamente marcado con el número de muestra y la dilución, en este caso 1*) y destaparlo al lado del mechero, flamear la boca del tubo e introducir la punta de la micropipeta (sin tocar el líquido) y vaciar su contenido.

- Tapar el tubo y descartar la punta usada en hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Tomar el tubo y ponerlo en el vortex por 15 segundos para que la muestra obtenga una buena homogenización.
- Para las siguientes diluciones (-1, -2, -3.....) repetir el procedimiento desde el último tubo. Ver figura 2.

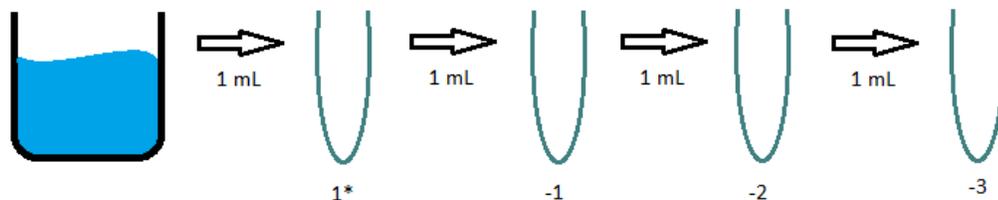


Fig. 2: Diagrama de diluciones. Nota: Cada tubo tiene 9 mL de agua tamponada.
Fuente: El autor

5.2. Filtración de la muestra

- 5.2.1. Armar el equipo de filtración como se indica en el instructivo _____
- 5.2.2. Con unas pinzas estériles (sumergidas previamente en alcohol y flameadas en el mechero) tomar una membrana de nitrocelulosa
- 5.2.3. Retirar el embudo del equipo de filtración y situar la membrana sobre el portafiltros con la cuadrícula hacia arriba.
- 5.2.4. Colocar nuevamente el embudo, cerciorándose que quede bien asegurado.
- 5.2.5. Tomar el tubo de la dilución a filtrar y llevarlo al vortex por 15 segundos, destaparlo y flamear su boca. Seguido a esto retirar la tapa del embudo y verter la muestra o dilución y tapar nuevamente el embudo. NOTA: En el caso que se vaya a verter la muestra directamente, homogenizarla mediante 25 movimientos de vaivén hacia arriba y hacia abajo, ya que en este caso no aplica el uso del vortex.
- 5.2.6. Cuando se vayan a filtrar volúmenes de muestras menores a 10 mL (diluida o sin diluir), agregar primero un tubo de agua tamponada estéril al embudo, luego la muestra o dilución y seguido a esto 25 a 50 mL de agua tamponada estéril. Lo anterior se hace con el ánimo de que haya una dispersión uniforme de la carga bacteriana sobre la membrana.
- 5.2.7. Tapar el embudo, prender la bomba y abrir la llave para que se filtre la muestra, verificar que se filtre la totalidad del volumen depositado en el embudo.
- 5.2.8. Agregar de 20 a 30 mL de agua tamponada estéril y seguir filtrando. Repetir este paso 2 veces más para completar un total de tres lavados. Lo anterior para evitar la contaminación por arrastre.
- 5.2.9. Apagar la bomba, retirar el embudo y por medio de las pinzas estériles (previamente sumergidas en alcohol y flameadas en el mechero), tomar la membrana de nitrocelulosa.
- 5.2.10. Colocar la membrana sobre el medio de cultivo m-FC con un movimiento de balanceo, evitando que quede aire entre el medio de cultivo.
- 5.2.11. Destapar el embudo y adicionar agua hirviendo, dejar actuar por 2 minutos, prender la bomba y dejar que evacue toda el agua. Lo anterior para esterilizar el embudo y evitar la contaminación.
- 5.2.12. Dejar aclimatar el embudo y repetir el procedimiento con una nueva muestra.

Nota: Cuando se trabajen diluciones de la misma muestra, filtrar desde la más diluida a la menos diluida y no se realiza la purga con agua hirviendo entre diluciones sino en el momento de filtrar otra muestra.

5.2.13. Dejar reposar por 30 minutos, invertir las cajas y llevar a incubar a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas.

6. CAPTURA DE DATOS

Los resultados obtenidos se deben registrar en el formato _____, indicando todos los datos solicitados en el formato y de ser el caso las observaciones.

7. CÁLCULOS

7.1. Lectura

7.1.1. Una vez cumplido el tiempo de incubación, retirar las cajas de la incubadora y organizarlas por número de muestra y dilución.

7.1.2. Se deben seleccionar las cajas que tengan entre 20 y 60 colonias y que no sobrepasen las 200 colonias, pues es este el número ideal de colonias por caja debido al tamaño y característica de las colonias.

7.1.3. Realizar el conteo, usando el contador de colonias, de todas las colonias de distintos tonos de azul (coliformes fecales) y descartar aquellas de color gris o crema.

7.1.4. Para determinar las UFC/100 mL, aplicar la siguiente formula:

$$\text{UFC coliformes fecales/100 mL} = \frac{\text{Número de colonias azules}}{\text{Volumen de muestra filtrada}} \times 100$$

Para el uso de la anterior ecuación, tener en cuenta los siguientes volúmenes de muestra por dilución:

$1^* \rightarrow 1 \text{ mL}$
 $10^{-1} \rightarrow 0,1 \text{ mL}$
 $10^{-2} \rightarrow 0.01 \text{ mL}$
 $10^{-3} \rightarrow 0.001 \text{ mL}$
 $10^{-4} \rightarrow 0.0001 \text{ mL}$
 $10^{-5} \rightarrow 0.00001 \text{ mL}$
 $10^{-6} \rightarrow 0.000001 \text{ mL}$
 $10^{-7} \rightarrow 0.0000001 \text{ mL}$
 $10^{-8} \rightarrow 0.00000001 \text{ mL}$

7.1.5. Al momento de filtrar 100 mL de muestra y no obtener recuento, reportar como <1 UFC/100 mL

7.1.6. Si se encuentra un crecimiento bacteriano muy alto y las colonias se superponen unas a otras, es decir no se distinguen entre ellas, se reforma como confluyente (Cte)

7.1.7.	Si en la membrana se tiene un número de colonias mayor a 200, se reportará como TNTC, que por sus siglas en inglés quiere decir que es muy numeroso para contar.
7.1.8.	En el caso en el que se tengan membranas con conteos por fuera del rango ideal, se deben totalizar los conteos de todas las membranas y reportar como UFC/100 mL. Un ejemplo es cuando se examina un volumen de 50 mL por duplicado y se obtienen conteos de 5 coliformes fecales en una membrana y 3 coliformes fecales en la otra, para este caso se reportará de la siguiente manera:
$\frac{[(5 + 3) \times 100]}{(50 + 50)} = 8 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$	
7.1.9.	Si se filtran volúmenes de 50, 25 y 10 mL y los conteos obtenidos son 15, 6 y <1 correspondientemente, se calculará el resultado sobre el valor más cercano al rango ideal de conteo y se reportará como estimado de la siguiente manera:
$\frac{15 \times 100}{50} = 30 \text{ UFC}/100 \text{ mL E (Estimado)}$	
7.1.10.	En el caso en el que se filtren volúmenes de 10, 1 y 0,1 mL y se presentan recuentos de 40, 9 y <1 respectivamente, para calcular las UFC/100 mL se toma el dato obtenido al filtrar los 10 mL ya que el número de colonias se encuentra en el rango ideal:
$\frac{40 \times 100}{10} = 400 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$	
7.1.11.	En el caso en el que se filtren los siguientes volúmenes: 10, 1 y 0,1 mL y se obtengan recuentos de TNTC, 150 y 92 colonias respectivamente, el volumen a tener en cuenta es el de 0,1 mL ya que es el más cercano al rango ideal y se reporta como estimado:
$\frac{92 \times 100}{0.1} = 92\,000 \text{ UFC}/100 \text{ mL E (Estimado)}$	
7.1.12.	Si en algún momento se filtraran diferentes volúmenes como los siguientes: 1, 0,3, 0,1, y 0,03 mL y se obtengan los siguientes conteos respectivamente: TNTC, TNTC, 56 y 21 colonias, entonces se suman los dos conteos que están en el rango ideal y se divide por la suma de los dos volúmenes de la siguiente manera:
$\frac{(56 + 21) \times 100}{(0,1 + 0,03)} = 59\,000 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$	
8.	CONTROL DE CALIDAD
8.1.	Blanco inicial y blanco final: Este control consiste en tomar el diluyente como si fuera una muestra y filtrar 100 mL; se debe colocar la membrana en un agar nutritivo (por ejemplo R2A) e incubar en las mismas condiciones de las muestras analizadas. Este control debe realizarse al inicio de las siembras y al final. Si se observa crecimiento, se deben invalidar los datos obtenidos de las muestras analizadas, solicitar nuevas muestras y volver a analizar.
8.2.	Control de contaminación por coliformes: Para este control, se deben tomar 30 mL de diluyente y filtrarlo. Se coloca la membrana en medio m-FC y se incuba al igual que las

otras muestras. Este control se debe realizar al inicio y al final de todo el proceso de filtración. Si se observa crecimiento se deben rechazar todos los resultados obtenidos y solicitar nuevas muestras para su nuevo análisis.

- 8.3. Control de contaminación cruzada:** Este control consiste en filtrar 100 mL de diluyente cada diez muestras e incubar a las mismas condiciones. El objetivo de este control es verificar que no hay contaminación cruzada entre muestras y que el agua tamponada está estéril. Si se llega a observar crecimiento, rechazar todos los resultados obtenidos y solicitar nuevamente las muestras para su análisis.
- 8.4. Control de esterilidad por lote de muestras:** Para este control se debe tomar una caja al azar del medio de cultivo a usar e incubar en las mismas condiciones de las muestras. Este control se lleva a cabo para evidenciar que el medio de cultivo se encuentra estéril. Si se observa crecimiento se deben rechazar los datos obtenidos y pedir las muestras nuevamente para su análisis.
- 8.5. Duplicados:** Se deben realizar duplicados al 10% de las muestras analizadas, y tener en cuenta que se cubran todas las matrices. Los datos deben ser diligenciados en el formato _____ de criterio de precisión para microbiología.
- 8.6. Control de conteo individual:** Mensualmente, cada analista debe contar las colonias de una misma caja positiva y la variabilidad de estos conteos no puede ser mayor al 5%. Registrar los datos en el formato _____
- 8.7. Control de conteo entre microbiólogos:** Mensualmente, dos analistas deben contar las colonias de una misma caja con resultado positivo; la variabilidad de estos conteos no debe ser mayor al 10%. Registrar los datos en el formato _____

Nota: Si en uno de los dos puntos anteriores, se supera el límite de variabilidad, el coordinador del área debe recapacitar a los microbiólogos en la lectura de resultados.

- 8.8. Control de guantes:** Diariamente se debe tomar una muestra del guante del analista y sembrarse en el medio de cultivo que se está usando en el momento de la siguiente manera:
- Sumergir el hisopo estéril en agua tamponada estéril.
 - Realizar un frotis por los guantes del analista.
 - Realizar un proceso de siembra masiva (movimiento de zic zac en todas las direcciones) sobre el medio de cultivo de interés.
 - Incubar bajo las mismas condiciones de las muestras.
 - Si se observa crecimiento, rechazar todos los resultados obtenidos, tomar las acciones pertinentes y pedir nuevamente las muestras para un nuevo análisis.
- 8.9. Verificación de colonias (Realizar mensualmente):** Para este control se deben tomar 5 colonias típicas y confirmarse en caldo lauryl triptosa y en caldo EC de la siguiente manera:
- 8.9.1.** Con un asa estéril, tomar cada colonia e inocular el tubo con caldo lauryl triptosa.
- 8.9.2.** Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas y revisar la producción de gas y/o la producción de ácido por el viraje de color del medio de cultivo a color amarillo. Si no se observa ninguna de las dos reacciones, dejar incubando por otras 24 horas.
- 8.9.3.** Tomar los tubos que muestren producción de gas y/o producción de ácido, agitarlos suavemente y transferir con un asa estéril al medio de cultivo EC.
- 8.9.4.** Pasados 30 minutos de la inoculación, pasar los tubos a un baño a $44,5 \pm 0,2$ °C por 24 ± 2 horas.
- 8.9.5.** Si se observa producción de gas y crecimiento en los tubos, el resultado es positivo para coliformes termotolerantes. Si no se observa producción de gas con poco o nulo crecimiento, se considera negativa la prueba para coliformes termotolerantes. Por último

si se observa crecimiento sin producción de gas, se debe tomar con un asa estéril y pasar a otro medio de cultivo (por ejemplo LMX).

Para la confirmación de colonias negativas, realizar los pasos 8.9.1 a 8.9.2 en donde no debe haber ni producción de gas ni producción de ácido.

8.10. Controles positivos y negativos: Este control consiste en que por cada lote de medio de cultivo preparado, realizar una siembra masiva con el microorganismo de interés (control positivo) y otra con un microorganismo de interferencia (control negativo), incubar en las mismas condiciones de las muestras y tener en cuenta lo siguiente:

- Si hay crecimiento del microorganismo de interés (control positivo), y no se observa crecimiento del microorganismo de interferencia (control negativo) el lote se aprueba.
- Si no hay crecimiento del microorganismo de interés, el lote se debe rechazar al igual que todos los datos obtenidos con ese lote de medio de cultivo.
- Si se observa crecimiento del microorganismo de interferencia (control negativo), el lote se debe rechazar al igual que todos los datos obtenidos con ese lote de medio de cultivo.

9. EVALUACIÓN DEL METODO

10. MEDIDAS DE SEGURIDAD.

El personal del laboratorio debe conocer y cumplir todas las normas y reglamentos establecidos por el área de HSEQ, de igual manera debe cumplir con el adecuado uso de los siguientes Elementos de Protección Personal:

- Bata
- Gafas de seguridad
- Antifluidos
- Tapabocas y gorro o cofia
- Guantes de nitrilo
- Calzado adecuado.

11. DOCUMENTOS DE REFERENCIA.

- American Public Health Association, American Water Works Association. Water Environment Federation. "Standard Methods the examination of water and wastewater". 22st edition. 2012.
- NTC 4772:2008. Calidad del Agua. Detección y Recuento de *Escherichia coli* y de Bacterias Coliformes. Parte 1: Método de Filtración Por Membrana.

ANEXO D.

ENUMERACIÓN DE COLIFORMES FECALES POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP/100 mL), TECNOLOGÍA DE SUSTRATO ENZIMÁTICO COLILERT MODIFICADO

1. INTRODUCCIÓN

Por medio de este documento, se implementa el procedimiento para el análisis, determinación y cuantificación de coliformes fecales en muestras de agua, por el método de número más probable en el Laboratorio de Microbiología de MCS CONSULTORÍA Y MONITOREO AMBIENTAL S.A.S. Este procedimiento se basa en el método SM-9223 B "*Enzyme Substrate Coliform Test*" del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, 2012; el cual se modifica para el análisis de coliformes fecales.

2. PRINCIPIO

El método consiste en determinar el número más probable (NMP) de coliformes fecales presentes en 100 mL de muestra ya sea por un volumen fijo o por medio de diluciones.

Las bacterias coliformes totales producen una enzima llamada la β -D-galactosidasa, la cual es capaz de unirse e hidrolizar ciertos sustratos cromogénicos como los son el orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosida (ONPG) o el clorofenol rojo- β -D-galactopiranosida (CPRG). Esta hidrólisis genera un cambio de color, lo cual indica una prueba positiva para bacterias coliformes totales.

Las bacterias coliformes fecales pertenecen al grupo de coliformes totales, son bacilos gram negativos, no esporulados, que fermentan la lactosa y producen gas a una temperatura de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$

3. ALCANCE

Este método se puede ser usado para muestras de agua potable, superficial, subterránea, residuales industriales, residuales domésticas y marinas.

4. DESARROLLO

4.1. MATERIALES Y EQUIPOS.

- Mechero
- Frascos de vidrio con capacidad de 100 mL
- Micropipeta de 1 a 10 mL
- Puntas estériles para micropipeta de 1 a 10 mL
- Probeta de vidrio de 100 mL
- Dispositivo Quanti-Tray/2000
- Comparador Quanti-Tray/2000
- Tabla de NMP IDDEX Quanti-Tray/2000
- Sellador Quanti-Tray
- Lámpara de luz UV

- Autoclave
- Incubadora a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$

4.2. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

- Reactivo Colilert
- Agua destilada estéril
- Desinfectante en rotación
- Alcohol etílico al 70%

4.3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

8. El reactivo Colilert es un polvo que viene en presentación por ampolletas para ser agregados a 100 mL de muestra (o muestra y agua en el caso de las diluciones).

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Análisis

5.1.1. Esterilizar el área por medio de la luz U.V. por 30 minutos.

5.1.2. Usar los EPP necesarios: uniforme antifluido, bata, gafas de seguridad y guantes.

5.1.3. Retirar las muestras a analizar de la nevera, con el fin de que se atemperen.

5.1.4. Encender el mechero y realizar las diluciones necesarias en agua destilada estéril, dependiendo de la muestra, como se indica a continuación:

- Sostener la muestra al lado del mechero e inclinarla en un ángulo de 45° , agitarla fuertemente con 25 movimientos de vaivén hacia arriba y hacia abajo, lo anterior con la intención de una buena homogenización de la muestra.
- Destapar la muestra evitando que la boca del recipiente tenga contacto con los guantes o cualquier otro implemento.
- Con una micropipeta de 1 – 10 mL (ajustada en 10 mL y con puntas estériles), introducir la punta en la muestra (entre 1 y 3 mm) y tomar 10 mL de la muestra; retirando la punta de la muestra pero sin sacarla del envase expulsar los 10 mL recién tomados y volver a tomar 10 mL de la muestra. Ver figura 1.



Fig. 1. Uso de la micropipeta

Tomada de: <http://avibert.blogspot.com/2011/08/buen-uso-y-cuidado-de-pipetas.html>

- Tomar uno de los frascos con agua destilada estéril (debidamente marcado con el número de muestra y la dilución, en este caso 10^{-1}) y destapararlo al lado del mechero, flamear la boca del frasco e introducir la punta de la micropipeta (sin tocar el líquido) y vaciar su contenido.
- Tapar el frasco y descartar la punta usada en hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Tomar el frasco y agitarlo para que la muestra obtenga una buena homogenización.
- En el caso en el que se deban realizar más diluciones y de igual manera sembrar la dilución 10^{-1} , esta se debe realizar por duplicado, pues una se usará en la siembra y la otra para realizar la siguiente dilución.
- Para las siguientes diluciones (-1, -2, -3.....) repetir el procedimiento desde el último frasco. Ver figura 2.

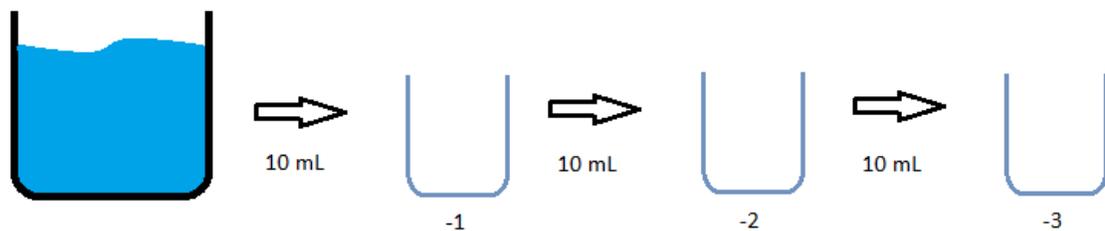


Fig. 2: Diagrama de diluciones. Nota: Cada frasco tiene 90 mL de agua destilada estéril.

Fuente: El autor

5.2. Adición de Colilert y sellamiento

- 5.2.1. Tomar una ampolleta, abrirla y agregarla a los 100 mL de muestra o dilución, como se indica en la figura 3.

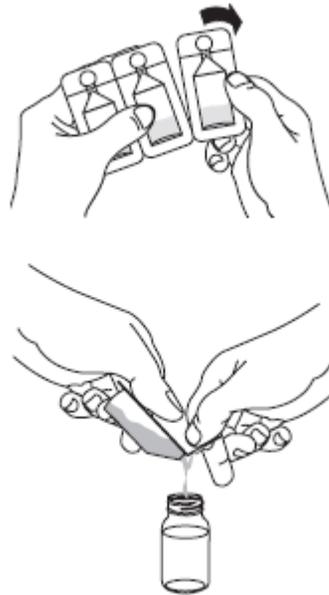


Fig 3: Adición del reactivo colilert en la muestra. Fuente: IDDEX Laboratories Inc. www.idexx.com/resource-library/water/colilert-procedure-en.pdf

- 5.2.2. Tapar la muestra y agitar hasta que se disuelva el reactivo por completo.
- 5.2.3. Tomar el dispositivo Quanti-Tray/2000 debidamente marcado con el número de muestra y su dilución y agregar la mezcla de la muestra con el reactivo colilert como se indica en la figura 4.



Fig 4. Adición de la mezcla de muestra y reactivo colilert al dispositivo Quanti-Tray/2000. Fuente: IDDEX Laboratories Inc. www.idexx.com/resource-library/water/colilert-procedure-en.pdf

- 5.2.4. Golpear los pocillos pequeños para eliminar las burbujas y dejar reposar un momento.
- 5.2.5. Colocar el dispositivo Quanti-Tray/2000 sobre el portadispositivo especial de goma, colocarlo sobre la bandeja del sellador Quanti-Tray 2X, (las celdas deben ir boca abajo), y pasarlo por el equipo para que se selle, como se indica en la figura 5.



Fig 5. Sellado de la muestra. Fuente: IDDEX Laboratories Inc. Inserto kit de Colilert para prueba.

5.2.6. Tomar las bandejas selladas y llevarlas a la incubadora a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

6. CAPTURA DE DATOS

Los resultados obtenidos se deben registrar en el formato _____, indicando todos los datos solicitados en el formato y de ser el caso las observaciones.

7. CÁLCULOS

7.1. Lectura

7.1.1. Luego de cumplidas las 24 horas de incubación, retirar los dispositivos Quanti-Tray/2000 de la incubadora

7.1.2. Contar los pozos positivos grandes y pequeños según lo siguiente:

- Si el color del pozo es igual o más amarillo que el del comparador, es positivo para coliformes fecales.
- Si el color del pozo es menos amarillo que el del comparador, este es negativo para coliformes fecales.

7.1.3. Después de realizar el conteo de los pozos positivos, tanto grandes como chicos, determinar el valor por medio de la tabla entregada por el proveedor para el cálculo de NMP/100 mL. Si la muestra requirió de diluciones, se debe dividir el valor obtenido en la tabla por el factor de dilución, teniendo en cuenta lo siguiente:

DILUCIÓN	FACTOR DE DILUCIÓN
10^{-1}	0,1
10^{-2}	0,01
10^{-3}	0,001
10^{-4}	0,0001

10^{-5}	0,00001
10^{-6}	0,000001
10^{-7}	0,0000001

8. CONTROL DE CALIDAD

8.1. Control positivo coliformes fecales: Para este control se inoculan 100 mL de agua destilada estéril con una cepa certificada de cualquier bacteria coliforme fecal (por ejemplo *Klebsiella pneumoniae*) y se analiza e incuba como el resto de las muestras. Si no se observan resultados positivos, repetir los análisis.

8.2. Control negativo: Para este control, se inoculan 100 mL de agua destilada estéril con una cepa certificada de una bacteria no coliforme (por ejemplo *Pseudomonas aureginosa*) y se analiza e incuba como el resto de las muestras. No debe haber reacción positiva en ningún pozo. Si se observan resultados positivos, repetir los análisis.

8.3. Control de esterilidad: Este control consiste en analizar 100 mL de agua destilada estéril en las mismas condiciones de las muestras. Si se observa alguna reacción positiva, rechazar los resultados obtenidos y analizar nuevamente las muestras.

8.4. Duplicados: Se deben realizar duplicados al 10% de las muestras analizadas, y tener en cuenta que se cubran todas las matrices. Los datos deben ser diligenciados en el formato _____ de criterio de precisión para microbiología.

8.5. Control de guantes: Diariamente se debe tomar una muestra del guante del analista y sembrarse en el medio de cultivo selectivo para el microorganismo de interés.

- Sumergir el hisopo estéril en agua tamponada estéril.
- Realizar un frotis por los guantes del analista.
- Realizar un proceso de siembra masiva (movimiento de zic zac en todas las direcciones) sobre el medio de cultivo de interés.
- Incubar bajo las mismas condiciones de las muestras.
- Si se observa crecimiento, rechazar todos los resultados obtenidos, tomar las acciones pertinentes y pedir nuevamente las muestras para un nuevo análisis.

9. EVALUACIÓN DEL METODO

10. MEDIDAS DE SEGURIDAD.

El personal del laboratorio debe conocer y cumplir todas las normas y reglamentos establecidos por el área de HSEQ, de igual manera debe cumplir con el adecuado uso de los siguientes Elementos de Protección Personal:

- Bata
- Gafas de seguridad
- Antifluidos
- Tapabocas y gorro o cofia
- Guantes de nitrilo
- Calzado adecuado.

11. DOCUMENTOS DE REFERENCIA.

- American Public Health Association, American Water Works Association. Water Environment Federation. "Standard Methods the examination of water and wastewater". 22nd edition. 2012.
- Inserto del kit para prueba de coliformes Colilert
- Iddex Laboratories Inc. www.idexx.com/resource-library/water/colilert-procedure-en.pdf

ANEXO E.

DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HETEROTROFOS POR LA TÉCNICA DE FILTRACIÓN DE MEMBRANA

1. INTRODUCCIÓN

Por medio de este documento, se implementa el procedimiento para el análisis, determinación y cuantificación de bacterias heterótrofas en muestras de agua, por el método de filtración por membrana en el Laboratorio de Microbiología de MCS CONSULTORÍA Y MONITOREO AMBIENTAL S.A.S. Este procedimiento se basa en el método SM-9215 D "*Heterotrophic Plate Count, Membrane Filter Method*" del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, 2012.

2. PRINCIPIO

El método consiste en determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) de coliformes totales y *Escherichia coli* presentes en 100 mL de muestra ya sea por un volumen fijo o por medio de diluciones.

El grupo de coliformes está compuesto por un gran número de géneros de bacterias, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Este grupo se define como bacilos anaerobios facultativos, gram negativos no formadores de esporas que fermentan la lactosa con producción de gas y ácido a 35°C.

El medio de cultivo m-ColiBlue 24 permite la detección simultanea de coliformes totales y *Escherichia coli* en 24 horas. En su composición tiene un indicador enzimático que permite el crecimiento de coliformes totales de color rojo, mientras que el crecimiento de *E. coli* se da en color azul.

3. ALCANCE

Este método se puede ser usado para muestras de agua potable, superficial, subterránea, residuales industriales, residuales domésticas y marinas.

4. DESARROLLO

4.1. MATERIALES Y EQUIPOS.

- Cajas de Petri de 60 X 15
- Balanza analítica.
- Tubo tapa rosca de vidrio
- Micropipetas de 100 – 1000 µL
- Puntas estériles para micropipeta de 100 – 1000 µL
- Horno de esterilización
- Plancha de calentamiento
- Autoclave
- Incubadora a 35 °C ± 0,5 °C
- Equipo de filtración por membrana
- Mechero
- Pinzas metálicas en acero inoxidable

- Membranas estériles con poro de 0,45 µm, cuadrícula y pad absorbente.
- Contador de colonias
- Vortex
- Balanza analítica con capacidad de 210 gr
- Cronometro
- Nevera de medios de cultivo
- Nevera de muestras
- Lámpara de luz UV

4.2. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

- Medio de cultivo m-ColiBlue 24
- Agua destilada
- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄)
- Cloruro de magnesio (MgCl₂)
- Desinfectante en rotación
- Alcohol etílico al 70%

4.3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

4.3.1. Diluyente agua tamponada:

- Preparación de la solución stock de fosfato: Disolver 34 gr de dihidrógeno de potasio (KH₂PO₄) en 500 mL de agua destilada y ajustar el pH en 7,2 ± 0,5 con hidróxido de sodio 1N (NaOH) y diluir a 1 L de agua destilada. Posterior a esto esterilizar en autoclave. Mantener la solución refrigerada y descartar si se observa turbidez.
- Preparación de la solución de cloruro de magnesio: Disolver 81,1 gr de MgCl₂ · 6H₂O ó 38 gr/L de MgCl₂ en 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave. Mantener en refrigeración y descartar si se observa turbidez.
- Preparación de solución de trabajo: Adicionar 1,25 ml de la solución stock de fosfato y 5,0 mL de la solución stock de cloruro de magnesio a 1 L de agua destilada, teniendo en cuenta que el pH final debe ser de 7,2. Dispensar 9 mL en tubos de 16 x 150 y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Mantener refrigerada la solución y descartar si se observa turbidez.

4.3.2. Medio de cultivo m-ColiBlue 24

Agitar suavemente el frasco o las ampollitas invirtiéndose dos o tres veces. Dispensar (aproximadamente 2,0 mL o una ampollita) sobre el pad absorbente y tapar la caja de Petri.

Para cada lote nuevo de medio, realizar un control positivo y uno negativo.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Análisis

- #### **5.1.1. Esterilizar el área por medio de la luz U.V. por 30 minutos.**

- 5.1.2.** Esterilizar el equipo de filtración por membrana, tal como se indica en el respectivo instructivo.
- 5.1.3.** Usar los EPP necesarios: uniforme antifluido, bata, gafas de seguridad y guantes.
- 5.1.4.** Retirar el agua tamponada estéril y las muestras a analizar de la nevera, con el fin de que se atemperen.
- 5.1.5.** Cerca al mechero, destapar las cajas de Petri y con las pinzas estériles previamente sumergidas en alcohol y flameadas, colocar en cada una un pad absorbente.
- 5.1.6.** Agitar las ampollas o el frasco del caldo m-ColiBlue 24 y dispensar 2 mL del mismo (o una ampolleta) por cada pad.
- 5.1.7.** Encender el mechero y realizar las diluciones necesarias en agua tamponada, dependiendo de la muestra, como se indica a continuación:
- Sostener la muestra al lado del mechero e inclinarla en un ángulo de 45°, agitarla fuertemente con 25 movimientos de vaivén hacia arriba y hacia abajo, lo anterior con la intención de una buena homogenización de la muestra.
 - Destapar la muestra evitando que la boca del recipiente tenga contacto con los guantes o cualquier otro implemento.
 - Con una micropipeta de 100 – 1000 µL (ajustada en 1000 µL y con puntas estériles), introducir la punta en la muestra (aproximadamente entre 1 y 3 mm) y tomar 1 mL de la muestra; retirando la punta de la muestra pero sin sacarla del envase expulsar el mL recién tomado y volver a tomar 1 mL de la muestra. Ver figura 1.



Fig. 1. Uso de la micropipeta

Tomada de: <http://avibert.blogspot.com/2011/08/buen-uso-y-cuidado-de-pipetas.html>

- Tomar uno de los tubos de agua tamponada (debidamente marcado con el número de muestra y la dilución, en este caso 1*) y destaparlo al lado del mechero, flamear la boca del tubo e introducir la punta de la micropipeta (sin tocar el líquido) y vaciar su contenido.
- Tapar el tubo y descartar la punta usada en hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Tomar el tubo y ponerlo en el vortex por 15 segundos para que la muestra obtenga una buena homogenización.

- Para las siguientes diluciones (-1, -2, -3.....) repetir el procedimiento desde el último tubo. Ver figura 2.

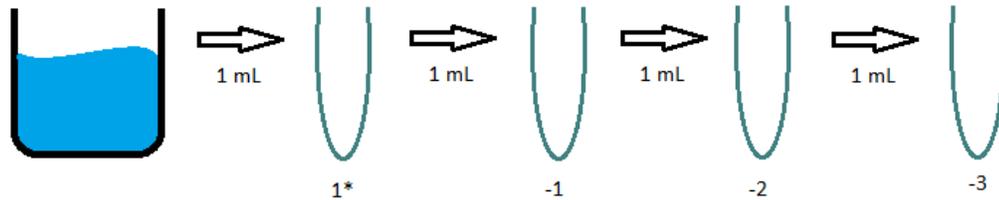


Fig. 2: Diagrama de diluciones. Nota: Cada tubo tiene 9 mL de agua tamponada.
Fuente: El autor

5.2. Filtración de la muestra

- 5.2.1. Armar el equipo de filtración como se indica en el instructivo _____
- 5.2.2. Con unas pinzas estériles (sumergidas previamente en alcohol y flameadas en el mechero) tomar una membrana de nitrocelulosa
- 5.2.3. Retirar el embudo del equipo de filtración y situar la membrana sobre el portafiltros con la cuadrícula hacia arriba.
- 5.2.4. Colocar nuevamente el embudo, cerciorándose que quede bien asegurado.
- 5.2.5. Tomar el tubo de la dilución a filtrar y llevarlo al vortex por 15 segundos, destaparlo y flamear su boca. Seguido a esto retirar la tapa del embudo y verter la muestra o dilución y tapar nuevamente el embudo. NOTA: En el caso que se vaya a verter la muestra directamente, homogenizarla mediante 25 movimientos de vaivén hacia arriba y hacia abajo, ya que en este caso no aplica el uso del vortex.
- 5.2.6. Cuando se vayan a filtrar volúmenes de muestras menores a 10 mL (diluida o sin diluir), agregar primero un tubo de agua tamponada estéril al embudo, luego la muestra o dilución y seguido a esto 25 a 50 mL de agua tamponada estéril. Lo anterior se hace con el ánimo de que haya una dispersión uniforme de la carga bacteriana sobre la membrana.
- 5.2.7. Tapar el embudo, prender la bomba y abrir la llave para que se filtre la muestra, verificar que se filtre la totalidad del volumen depositado en el embudo.
- 5.2.8. Agregar de 20 a 30 mL de agua tamponada estéril y seguir filtrando. Repetir este paso 2 veces más para completar un total de tres lavados. Lo anterior para evitar la contaminación por arrastre.
- 5.2.9. Apagar la bomba, retirar el embudo y por medio de las pinzas estériles (previamente sumergidas en alcohol y flameadas en el mechero), tomar la membrana de nitrocelulosa.
- 5.2.10. Colocar la membrana sobre el pad empapado del medio m-ColiBlue24 con un movimiento de balanceo, evitando que quede aire entre el medio de cultivo.
- 5.2.11. Destapar el embudo y adicionar agua hirviendo, dejar actuar por 2 minutos, prender la bomba y dejar que evacue toda el agua. Lo anterior para esterilizar el embudo y evitar la contaminación.
- 5.2.12. Dejar aclimatar el embudo y repetir el procedimiento con una nueva muestra.

Nota: Cuando se trabajen diluciones de la misma muestra, filtrar desde la más diluida a la menos diluida y no se realiza la purga con agua hirviendo entre diluciones sino en el momento de filtrar otra muestra.

5.2.13. Dejar reposar por 30 minutos, invertir las cajas y llevar a incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

6. CAPTURA DE DATOS

Los resultados obtenidos se deben registrar en el formato _____, indicando todos los datos solicitados en el formato y de ser el caso las observaciones.

7. CÁLCULOS

7.1. Lectura

7.1.1. Una vez cumplido el tiempo de incubación, retirar las cajas de la incubadora y organizarlas por número de muestra y dilución.

7.1.2. Se deben seleccionar las cajas que tengan entre 20 y 80 colonias y que no sobrepasen las 200 colonias para el caso de coliformes totales, para el caso de *E. coli* se deben seleccionar las que tengan entre 20 y 60 colonias y no más de 200; pues es este el número ideal de colonias por caja debido al tamaño y característica de las colonias.

7.1.3. Realizar el conteo, usando el contador de colonias, de todas las colonias teniendo en cuenta las siguientes características:

- Colonias rojas, azules y púrpura → Coliformes totales.
- Colonias azules y púrpura → *Escherichia coli*.

7.1.4. Para determinar las UFC/100 mL, aplicar las siguientes formulas:

$$\text{UFC coliformes totales/100 mL} = \frac{\text{Número de colonias rojas, azules y púrpura}}{\text{Volumen de muestra filtrada}} \times 100$$

$$\text{UFC Escherichia coli/100 mL} = \frac{\text{Número de colonias azules y púrpura}}{\text{Volúmen de muestra filtrada}} \times 100$$

Para el uso de las anteriores ecuaciones, tener en cuenta los siguientes volúmenes de muestra por dilución:

$$\begin{aligned} 1^* &\rightarrow 1 \text{ mL} \\ 10^{-1} &\rightarrow 0,1 \text{ mL} \\ 10^{-2} &\rightarrow 0.01 \text{ mL} \\ 10^{-3} &\rightarrow 0.001 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$10^{-4} \rightarrow 0.0001 \text{ mL}$$

$$10^{-5} \rightarrow 0.00001 \text{ mL}$$

$$10^{-6} \rightarrow 0.000001 \text{ mL}$$

$$10^{-7} \rightarrow 0.0000001 \text{ mL}$$

$$10^{-8} \rightarrow 0.00000001 \text{ mL}$$

7.1.5. Al momento de filtrar 100 mL de muestra y no obtener recuento, reportar como <1 UFC/100 mL

7.1.6. Si se encuentra un crecimiento bacteriano muy alto y las colonias se superponen unas a otras, es decir no se distinguen entre ellas, se reporta como confluyente (Cte)

7.1.7. Si en la membrana se tiene un número de colonias mayor a 200, se reportará como TNTC, que por sus siglas en inglés quiere decir que es muy numeroso para contar.

7.1.8. En el caso en el que se tengan membranas con conteos por fuera del rango ideal, se deben totalizar los conteos de todas las membranas y reportar como UFC/100 mL. Un ejemplo es cuando se examina un volumen de 50 mL por duplicado y se obtienen conteos de 5 coliformes totales en una membrana y 3 coliformes totales en la otra, para este caso se reportará de la siguiente manera:

$$\frac{[(5 + 3) \times 100]}{(50 + 50)} = 8 \text{ UFC/100 mL}$$

7.1.9. Si se filtran volúmenes de 50, 25 y 10 mL y los conteos obtenidos son 15, 6 y <1 correspondientemente, se calculará el resultado sobre el valor más cercano al rango ideal de conteo y se reportará como estimado de la siguiente manera:

$$\frac{15 \times 100}{50} = 30 \text{ UFC/100 mL E (Estimado)}$$

7.1.10. En el caso en el que se filtren volúmenes de 10, 1 y 0,1 mL y se presentan recuentos de 40, 9 y <1 respectivamente, para calcular las UFC/100 mL se toma el dato obtenido al filtrar los 10 mL ya que el número de colonias se encuentra en el rango ideal:

$$\frac{40 \times 100}{10} = 400 \text{ UFC/100 mL}$$

7.1.11. En el caso en el que se filtren los siguientes volúmenes: 10, 1 y 0,1 mL y se obtengan recuentos de TNTC, 150 y 92 colonias respectivamente, el volumen a tener en cuenta es el de 0,1 mL ya que es el más cercano al rango ideal y se reporta como estimado:

$$\frac{92 \times 100}{0.1} = 92\,000 \text{ UFC/100 mL E (Estimado)}$$

7.1.12. Si en algún momento se filtraran diferentes volúmenes como los siguientes: 1, 0,3, 0,1, y 0,03 mL y se obtengan los siguientes conteos respectivamente: TNTC, TNTC, 56 y 21 colonias, entonces se suman los dos conteos que están en el rango ideal y se divide por la suma de los dos volúmenes de la siguiente manera:

$$\frac{(56 + 21) \times 100}{(0,1 + 0,03)} = 59\,000 \text{ UFC/100 mL}$$

8. CONTROL DE CALIDAD

- 8.1. Blanco inicial y blanco final:** Este control consiste en tomar el diluyente como si fuera una muestra y filtrar 100 mL; se debe colocar la membrana en un agar nutritivo (por ejemplo R2A) e incubar en las mismas condiciones de las muestras analizadas. Este control debe realizarse al inicio de las siembras y al final. Si se observa crecimiento, se deben invalidar los datos obtenidos de las muestras analizadas, solicitar nuevas muestras y volver a analizar.
- 8.2. Control de contaminación por coliformes:** Para este control, se deben tomar 30 mL de diluyente y filtrarlo. Se coloca la membrana en medio m-ColiBlue24 y se incuba al igual que las otras muestras. Este control se debe realizar al inicio y al final de todo el proceso de filtración. Si se observa crecimiento se deben rechazar todos los resultados obtenidos y solicitar nuevas muestras para su nuevo análisis.
- 8.3. Control de contaminación cruzada:** Este control consiste en filtrar 100 mL de diluyente cada diez muestras e incubar a las mismas condiciones. El objetivo de este control es verificar que no hay contaminación cruzada entre muestras y que el agua tamponada está estéril. Si se llega a observar crecimiento, rechazar todos los resultados obtenidos y solicitar nuevamente las muestras para su análisis.
- 8.4. Control de esterilidad por lote de muestras:** Para este control se debe tomar una caja al azar del medio de cultivo a usar e incubar en las mismas condiciones de las muestras. Este control se lleva a cabo para evidenciar que el medio de cultivo se encuentra estéril. Si se observa crecimiento se deben rechazar los datos obtenidos y pedir las muestras nuevamente para su análisis.
- 8.5. Duplicados:** Se deben realizar duplicados al 10% de las muestras analizadas, y tener en cuenta que se cubran todas las matrices. Los datos deben ser diligenciados en el formato _____ de criterio de precisión para microbiología.
- 8.6. Control de conteo individual:** Mensualmente, cada analista debe contar las colonias de una misma caja positiva y la variabilidad de estos conteos no puede ser mayor al 5%. Registrar los datos en el formato _____
- 8.7. Control de conteo entre microbiólogos:** Mensualmente, dos analistas deben contar las colonias de una misma caja con resultado positivo; la variabilidad de estos conteos no debe ser mayor al 10%. Registrar los datos en el formato _____

Nota: Si en uno de los dos puntos anteriores, se supera el límite de variabilidad, el coordinador del área debe recapacitar a los microbiólogos en la lectura de resultados.

- 8.8. Control de guantes:** Diariamente se debe tomar una muestra del guante del analista y sembrarse en el medio de cultivo que se está usando en el momento de la siguiente manera:
- Sumergir el hisopo estéril en agua tamponada estéril.
 - Realizar un frotis por los guantes del analista.
 - Realizar un proceso de siembra masiva (movimiento de zic zac en todas las direcciones) sobre el medio de cultivo de interés.
 - Incubar bajo las mismas condiciones de las muestras.
 - Si se observa crecimiento, rechazar todos los resultados obtenidos, tomar las acciones pertinentes y pedir nuevamente las muestras para un nuevo análisis.
- 8.9. Verificación de colonias de coliformes totales (Realizar mensualmente):** Para este control se deben tomar 5 colonias típicas y confirmarse en caldo lauryl triptosa de la siguiente manera:
- 8.9.1.** Con un asa estéril, tomar cada colonia e inocular el tubo con caldo lauryl triptosa.

- 8.9.2.** Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 48 ± 2 horas y revisar la producción de gas y/o la producción de ácido por el viraje de color del medio de cultivo a color amarillo.
- 8.9.3.** Tomar los tubos que muestren producción de gas y/o producción de ácido, agitarlos suavemente y transferir con un asa estéril al caldo verde bilis brillante lactosa.
- 8.9.4.** Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 48 ± 3 horas.
- 8.9.5.** Si se observa producción de gas, la prueba es positiva para coliformes totales.
- 8.10. Verificación de colonias de *Escherichia coli*** (Realizar mensualmente): Para este control se deben repetir los numerales 8.9.1 y 8.9.2., posteriormente realizar los siguientes pasos:
- 8.10.1.** Tomar los tubos que muestren producción de gas y/o producción de ácido, agitarlos suavemente y transferir con un asa estéril al medio de cultivo EC - MUG.
- 8.10.2.** Incubar los tubos a $44,5 \pm 0,2$ °C por 24 ± 2 horas.
- 8.10.3.** Leer los tubos con luz UV. La presencia de fluorescencia azul indica la prueba positiva para *Escherichia coli*.

Nota: Para las confirmaciones anteriormente descritas, también es válido usar sistemas multi test comerciales para *Enterobacteriaceae* que incluya fermentación de lactosa y/o β -galactosidasa.

8.11. Controles positivos y negativos: Este control consiste en que por cada lote de medio de cultivo preparado, realizar una siembra masiva con el microorganismo de interés (control positivo) y otra con un microorganismo de interferencia (control negativo), incubar en las mismas condiciones de las muestras y tener en cuenta lo siguiente:

- Si hay crecimiento del microorganismo de interés (control positivo), y no se observa crecimiento del microorganismo de interferencia (control negativo) el lote se aprueba.
- Si no hay crecimiento del microorganismo de interés, el lote se debe rechazar al igual que todos los datos obtenidos con ese lote de medio de cultivo.
- Si se observa crecimiento del microorganismo de interferencia (control negativo), el lote se debe rechazar al igual que todos los datos obtenidos con ese lote de medio de cultivo.

9. EVALUACIÓN DEL METODO

10. MEDIDAS DE SEGURIDAD.

El personal del laboratorio debe conocer y cumplir todas las normas y reglamentos establecidos por el área de HSEQ, de igual manera debe cumplir con el adecuado uso de los siguientes Elementos de Protección Personal:

- Bata
- Gafas de seguridad
- Antifluidos
- Tapabocas y gorro o cofia
- Guantes de nitrilo
- Calzado adecuado.

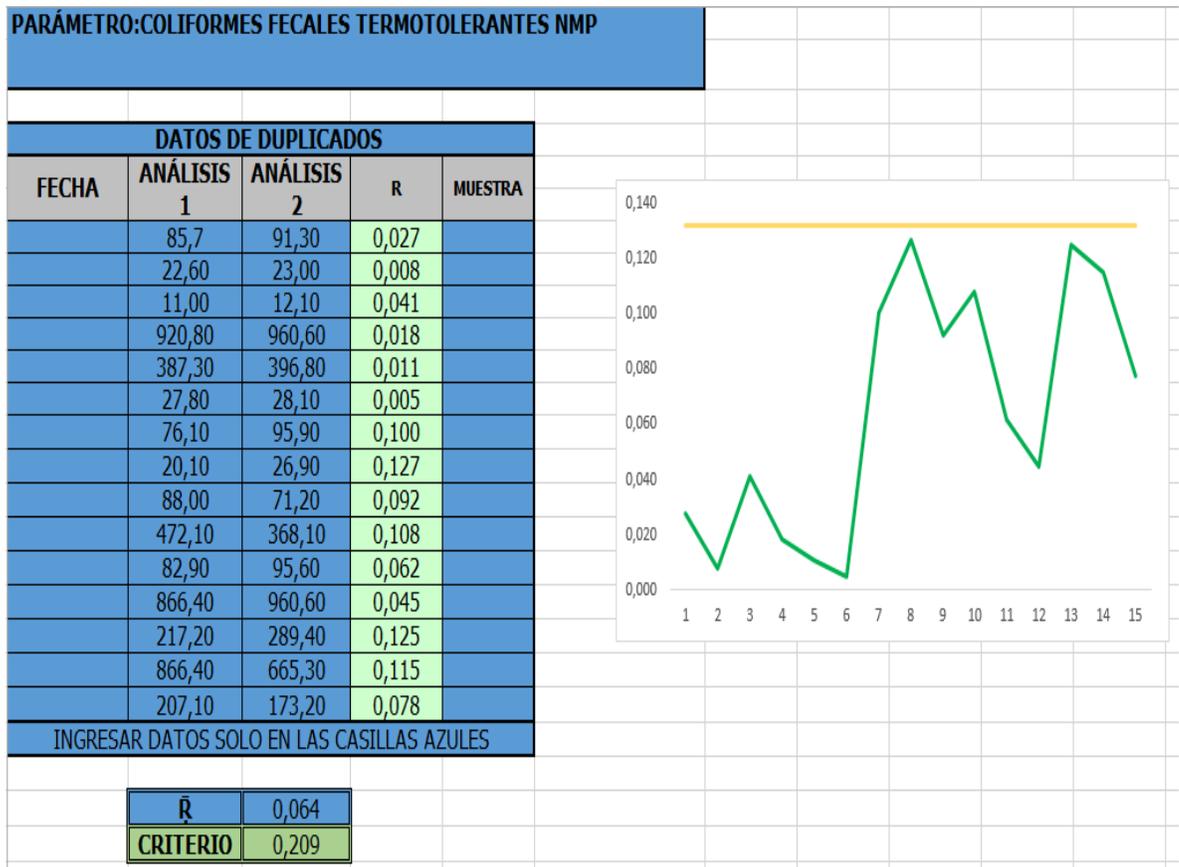
11. DOCUMENTOS DE REFERENCIA.

- American Public Health Association, American Water Works Association. Water Environment Federation. "Standard Methods the examination of water and wastewater". 22nd edition. 2012.
- NTC 4772:2008. Calidad del Agua. Detección y Recuento de *Escherichia coli* y de Bacterias Coliformes. Parte 1: Método de Filtración Por Membrana.

- USEPA Membrane Filtration Method, Method 10029

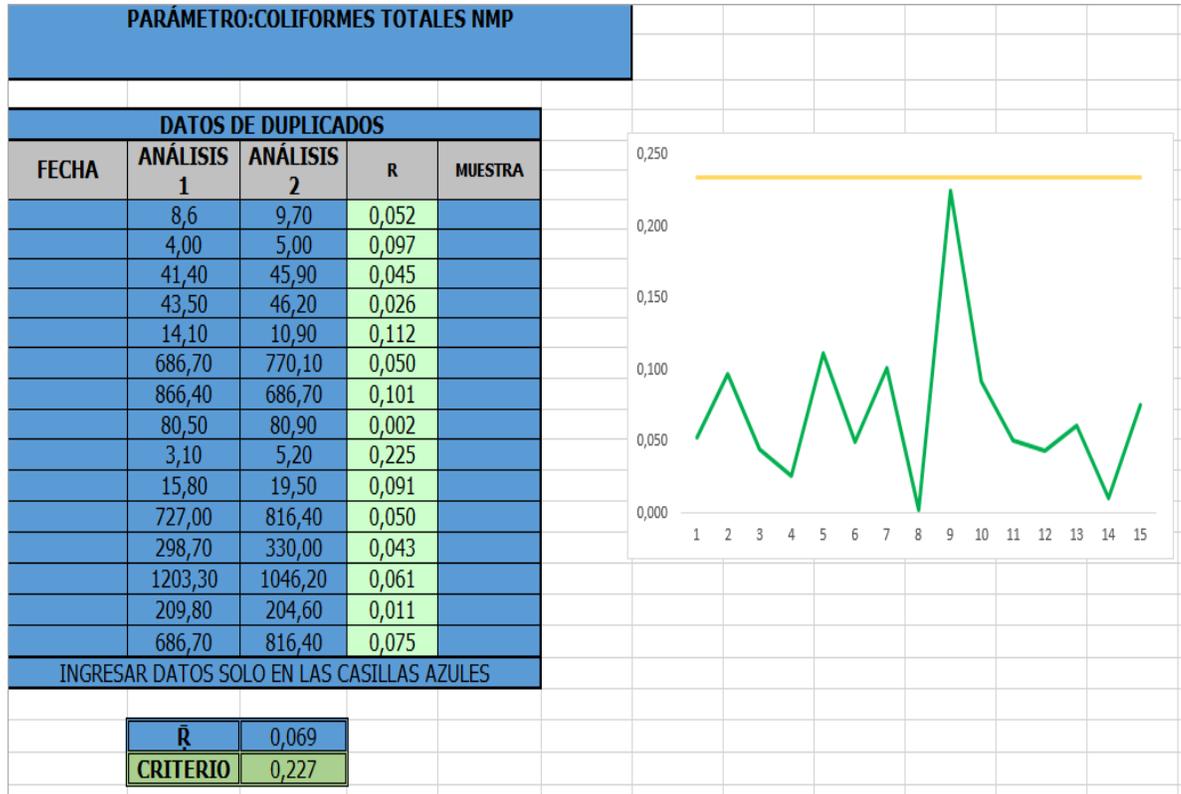
ANEXO F.

Ejemplo del Criterio de precisión de para coliformes termotolerantes (fecales) por NMP



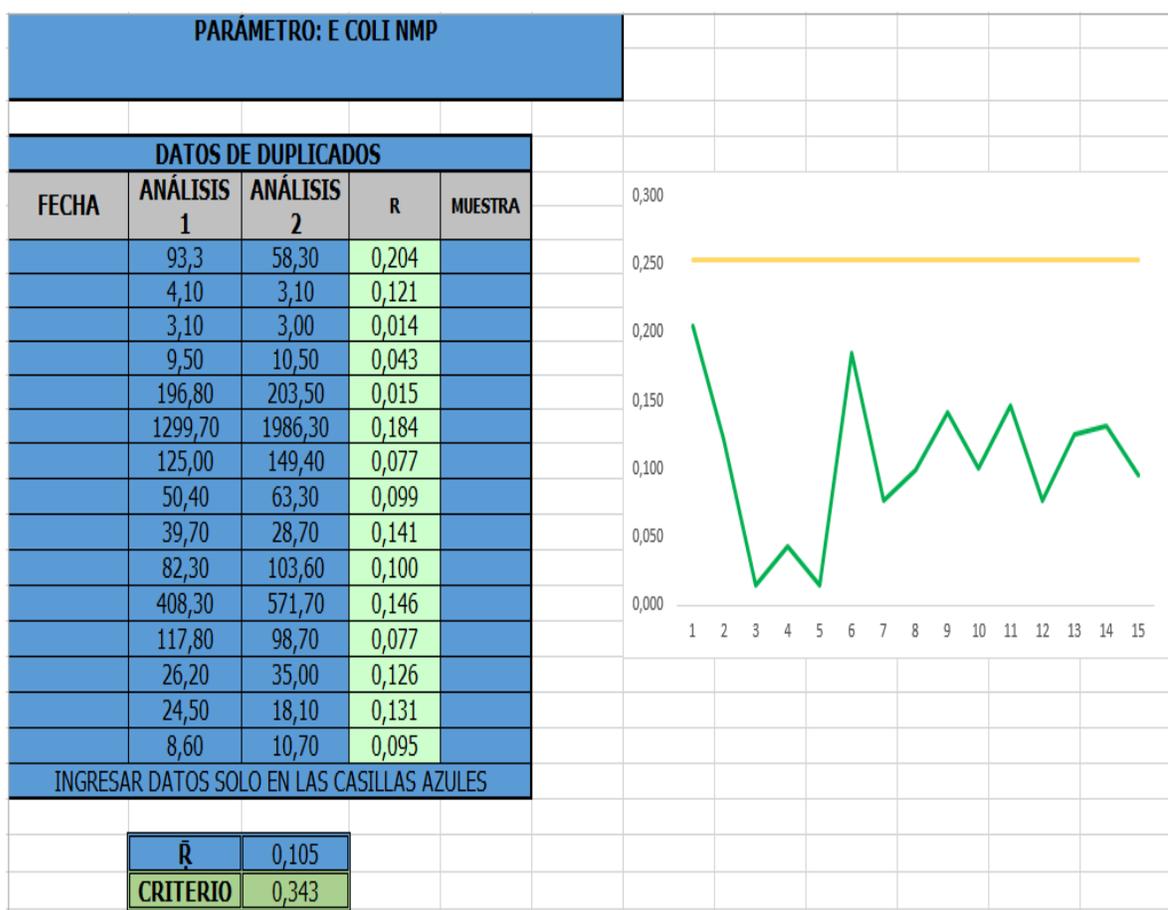
ANEXO G.

Ejemplo del Criterio de precisión para coliformes totales por NMP



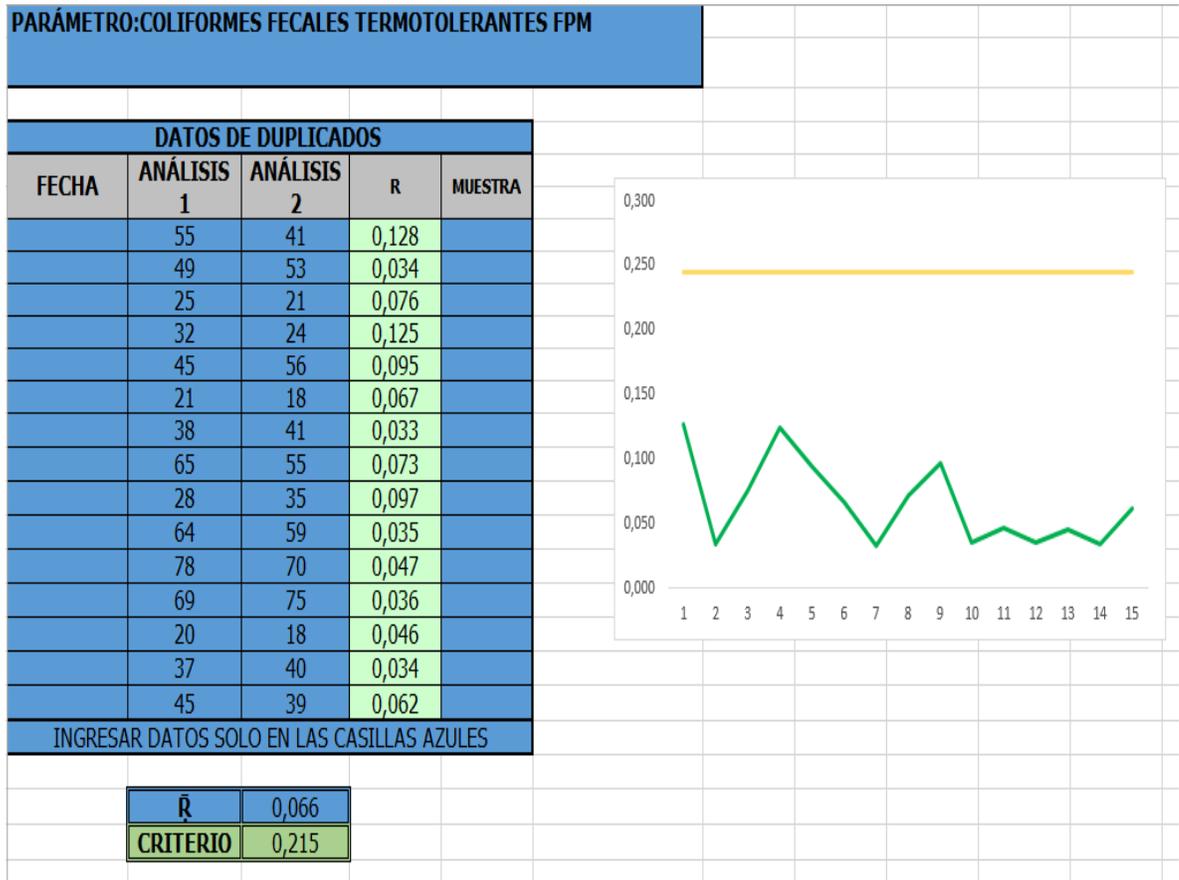
ANEXO H.

Ejemplo del Criterio de precisión para E.coli por NMP



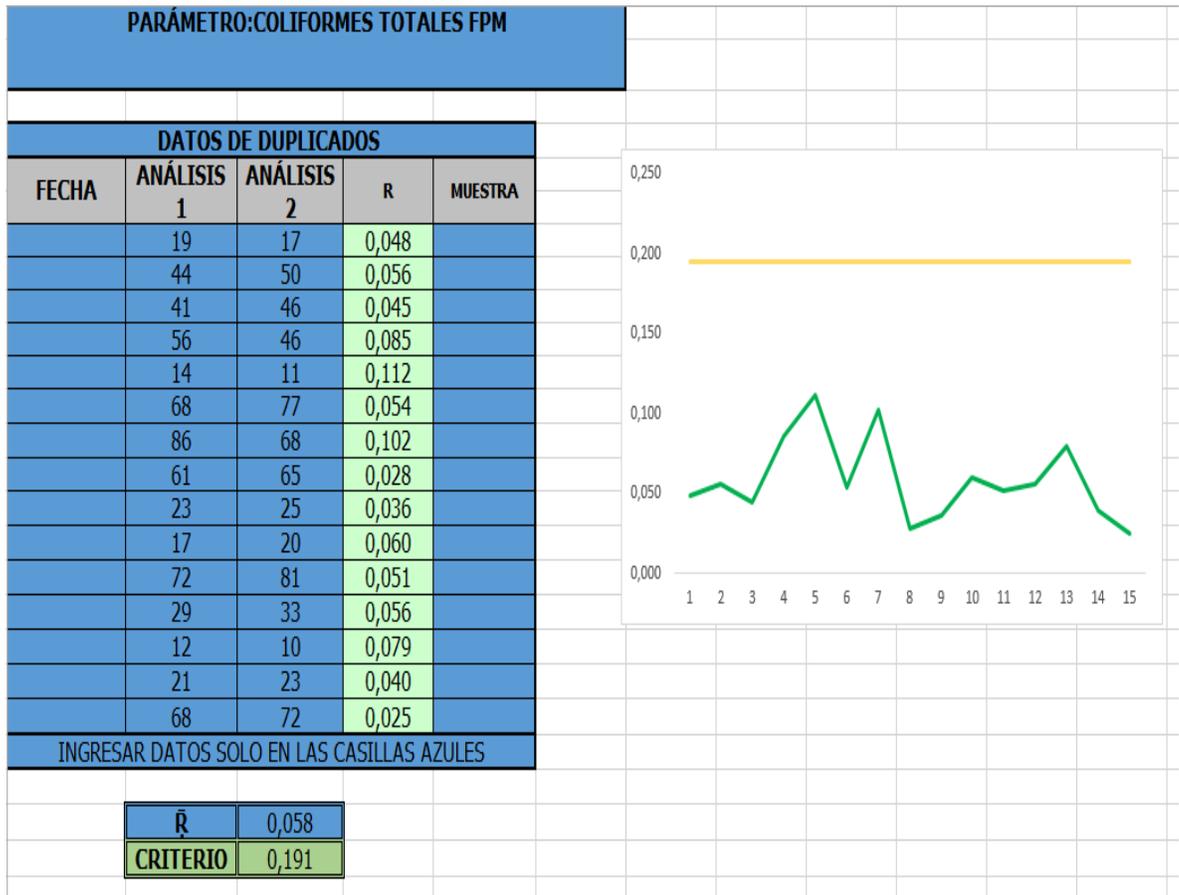
ANEXO I.

Ejemplo del Criterio de precisión para Coliformes termotolerantes (fecales) por FPM



ANEXO J

Ejemplo del Criterio de precisión para Coliformes totales por FPM



ANEXO K

Ejemplo del Criterio de precisión para E. coli por FPM

