



MÉTODO ANALÍTICO DETERMINACIÓN DE BACTERIAS MESÓFILAS POR RECUENTO EN PLACA, TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA, SM 9215 D.

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá

Código: D-7.2-07

Versión: 06

Revisor: Subdirector de Planeación y O.T.

Aprobó: Director General (E).

Fecha: 09 de Julio de 2025

Fecha: 09 de Julio de 2025

Resolución: 100-03-10-23-1338-2025

Páginas: 1 de 5

1. DESCRIPCIÓN

Los Mesófilos son organismo cuya temperatura de crecimiento óptima y proliferación está entre los 15 y los 40°C. En este grupo se encuentran los microorganismos patógenos, lo que hace que la temperatura corporal sea idónea para el desarrollo de este tipo de microorganismos. El conjunto que forma las bacterias mesófilas se emplea generalmente como estándar para determinar la contaminación de muestras de agua o alimento con microorganismo después de un procedimiento de cloración.

2. ALCANCE

Esta técnica para la determinación de mesófilos, es aplicable a muestras de agua de piscina, agua tratada, agua de consumo y a matrices que contengan bajas concentraciones de bacterias mesófilas.

3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

3.1 Principio

Este método se fundamenta en determinar el número de microorganismos mesófilos presentes en una muestra de agua, por medio de recuento en placa de una muestra de agua filtrada en filtros de celulosa de 0,45µm de tamaño de poro, los filtros son incubados a 35°C durante 48 horas. Tras la incubación, todas las colonias que se desarrollan pueden contarse como bacterias mesófilas.

3.2 Interferencias

Al constituir un amplio rango de microorganismos, se considera que no se presentan interferencias para su crecimiento.

4. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

Se toma una muestra de agua tratada, en un recipiente estéril con capacidad de 250mL y con aditivo de Tiosulfato de Sodio al 3%; y Tiosulfato al 10% para muestras de piscina, esto para la inactivación del cloro residual libre contenido en la muestra.

La adición de tiosulfato es de 0,1 mL por cada 120mL de capacidad del recipiente tanto para la concentración de 3 como para la de 10%

La muestra debe ser llevada al laboratorio para su análisis en un periodo no mayor a 24 horas y se conserva en nevera a una temperatura no mayor a 10°C.

5. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

- Pipetas de 1, 5y 10 mL estériles.
- Pipeteador.
- Papel kraft.
- Horno esterilizador.
- Cajas de Petri.
- Incubadora.
- Cuenta colonias.
- Autoclave.
- Base Manifold.
- Vasos de filtración.
- Filtros de Celulosa 0,45 micras.

6. REACTIVOS

- Agar Plate count.
- Agua destilada.

7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Agar Plate Count (Agar peptona de caseína- glucosa- extracto de levadura).

Medio de cultivo exento de sustancias inhibidoras y de indicadores, concebido esencialmente para la determinación del número total de gérmenes en leche, productos lácteos, aguas y otros. Preparación: Disolver 22,5 g/Litro y esterilizar en autoclave (15 min a 121°C).

8. PROCEDIMIENTO

- Filtrar 100 mL o menos de agua natural o tratada, a través de una membrana de 0,45 micras.
- Si la muestra contiene altas concentraciones de microorganismos se procede a realizar diluciones de manera que en el filtro crezcan de 20 a 200 UFC.
- Colocar el filtro sobre agar Plate count, de tal forma que no se generen burbujas de aire entre el filtro y la superficie del agar.
- Invierta las cajas de petri e incube a 35°C durante 48±3 horas.
- Hacer el recuento de las colonias y reportarlas en UFC/mL.

9. ALGORITMO

Filtrar 100ml o menos de agua natural o tratada, a través de una membrana de 0,45 micras



Si la muestra contiene altas concentraciones de microorganismos se procede a realizar diluciones de manera que en el filtro crezcan de 20 a 200 UFC



Colocar el filtro sobre agar Plate count e incube a 35°C de 48±3 horas



Reportar el número de colonias en UFC/mL

10. CÁLCULOS Y RESULTADOS

A las 48 horas de incubación se hace la lectura de las colonias. El reporte se realiza en UFC/mL.

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{Colonias contadas}}{\text{volumen de muestra filtrada en mL}}$$

Nota: en la captura de datos e informe de resultados, se realizará el reporte representando el resultado en unidades formadoras de colonia en 100 mililitros UFC/100mL, para efectos de no generar errores en la interpretación, dado que el laboratorio ofrece esta metodología para realizar análisis de calidad del agua de consumo y recreacional principalmente y la Normatividad describe el reporte en UFC/100mL

11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

Control Negativo Durante el análisis de agua y con el fin de descartar cualquier contaminación externa, se realiza un control negativo que garantice una correcta

esterilidad en el proceso de preparación y montaje del método. Para esto, se incuba una caja de Petri con agar plate count con un filtro, estos sin inocular a 35°C por 48±3 horas. El control se realiza por lote de medio preparado.

Control Positivo: El control positivo de medios se realiza con *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Para esto 100 mL de agua estéril son inoculados con una concentración de 10 a 100 bacterias por mL. Este control se realizará por lote de medio preparado.

Se realiza un duplicado de muestra por corrida; tomando una muestra al azar.

Análisis de Efecto matriz: se realiza mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de una muestra de agua añadida con una concentración de 10-100bacterias/mL de *E. coli*.

$$\%R = (\bar{x} \text{ muestra inoculada}) / (\bar{x}_{\text{cepa}} + \bar{x} \text{ muestra}) \times 100$$

Dónde:

%R = Porcentaje de recuperación

\bar{x} = Promedio de la concentración

El efecto matriz es analizado cada vez que ingresa una matriz diferente de agua potable.

Todo el control de calidad realizado se registra en el formato “R-7.4-21 captura de datos mesófilos” en orden cronológico.

12. MANTENIMIENTO

El mantenimiento de las incubadoras se realiza entre 12 a 18 meses de acuerdo a lo evaluado por el laboratorio.

13. BIBLIOGRAFÍA

- MERCK. 1994. Manual de medios de cultivo. Agar PlateCount. Pág 138.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps Wc, Braunt-Howland Eb, Baxter Te. Eds. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 24th Ed. Washington Dc: APHA PRESS;2023.

14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
12/12/2014	300-03-10-23-1864	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-07: MÉTODO ANALÍTICO DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS MESOFILOS POR LA TECNICA DE RECUENTO EN PLACA, SM 9215 B.
05/10/2016	300-03-10-23-1303	02	Se actualiza el logo corporativo.
15/08/2018	300-03-10-23-1436	03	<p>Se cambia el método de referencia "SM 9215 B empleado para la realización de la determinación de microorganismos mesófilos por la técnica de recuento en placa" por "MÉTODO ANALÍTICO DETERMINACIÓN DE BACTERIAS MESÓFILAS POR RECUENTO EN PLACA, TECNICA DE FILTRACION POR MEMBRANA SM 9215 D".</p> <p>De acuerdo al SM Ed. 23 de 2017 se realizan los siguientes ajustes:</p> <p>En la sección de FUNDAMENTO DEL MÉTODO cambia el principio de acuerdo al SM 9215 D – Filtración por membrana. De igual forma se modifica la DEFINICIÓN y se ajusta el rango de temperatura.</p> <p>En la sección de TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO se adiciona la concentración de tiosulfato usado para declarar muestras de agua de consumo y se especifica la concentración para muestras de aguas de piscina. Además se cambia la temperatura de almacenamiento de acuerdo al SM.</p> <p>La sección PROCEDIMIENTO se modifica de acuerdo a la nueva técnica implementada, de igual modo se ajusta la sección de ALGORITMO conforme al cambio.</p> <p>La sección de SEGUIMIENTO Y CONTROL se reestructura de acuerdo a los requerimientos dados desde el SM, indicando: Control Negativo, Control Positivo y Análisis de efecto matriz. Además del control por duplicados en cada corrida del ensayo.</p>
19/11/2019	300-03-10-23-1429	04	<p>Se elimina la subsección 3.2 - Definición y se unifica con el criterio de descripción de la sección 1.</p> <p>Por otro lado, se adiciona dentro de la estructura del método la sección 2 – ALCANCE, así: "Esta técnica para la determinación de mesófilos, es aplicable a muestras de agua de piscina, agua tratada, agua de consumo y a matrices que contengan bajas concentraciones de bacterias mesófilas". También se incluye la sección 12 - MANTENIMIENTO relacionado con el método.</p> <p>Se cambia la codificación del documento pasando de D-5.4-07 a D-7.2-07 de acuerdo a la nueva versión de la Norma – ISO/IEC 17025:2017, así como también se modifica el respectivo formato de captura de datos referenciado en éste.</p>
06/10/2020	300-03-10-23-1125	05	<p>Se ajusta el ítem 4: TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO.</p> <p>Se deja nota en el ítem 10: CÁLCULOS Y RESULTADOS que se realizará el reporte de los resultados en unidades formadoras de colonia en 100 mililitros UFC/100mL, ya que la normatividad describe el reporte en UFC/100mL.</p>
09/07/2025	100-03-10-23-1338	06	Se actualizó el ítem 13 Bibliografía, edición 24 th de Standard Methods (2023).

Última línea-----última línea-----última línea