



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 1 de 13	

## 1. OBJETIVO

Establecer el instructivo para la determinación de la carga de Coliformes totales y Coliformes fecales obtenidos en muestras de agua tratada en el Laboratorio de Microbiología en la planta de tratamiento de agua de Serviciudad ESP.

## 2. ALCANCE Y RESPONSABLE

Este instructivo aplica para muestras de agua tratada en el Laboratorio de microbiología de la planta de tratamiento de agua de Serviciudad ESP.

La administración y control de este documento es responsabilidad del Técnico de Calidad de Agua en apoyo con la Técnico en Microbiología. Los ajustes del documento que surjan en el camino serán llevados a cabo por la Técnico en Microbiología, bajo la revisión del profesional de la planta. La ejecución de los ensayos será responsabilidad del Técnico en Microbiología.

## 3. DEFINICIONES

**Agua potable:** Es aquella que, por cumplir las características físicas, químicas y microbiológicas, es apta para consumo humano. Se utiliza en bebida directa, en la preparación de alimentos o en la higiene personal.

**Coliformes totales:** Bacterias miembro de las Enterobacteriaceae, normalmente gram negativas, fermentan la lactosa a temperatura de  $36 \pm 2$  °C, produciendo ácido y gas (CO<sub>2</sub>) en un plazo de  $21 \pm 3$  horas. Aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa.

<b>ELABORADO POR:</b> 	<b>REVISADO POR:</b> 	<b>APROBADO POR:</b> 
Luisa Marina Montoya Posada Técnico de Calidad de agua	Genny Marcela Hurtado Giraldo Profesional Planta de Tratamiento	Eduardo Andrés Brand Ruiz Subgerente Técnico y Operativo
Fecha: 2024-01-20	Fecha: 2024-01-25	Fecha: 2024-01-27



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 2 de 13	

**Coliformes fecales (*Escherichia coli*):** Los Coliformes fecales son miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y expresan enzimas específicas como la  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucoronidasa. *E. coli* es miembro de este grupo, un bacilo aerobio Gram Negativo no esporulado. Es el indicador microbiológico preciso de contaminación fecal en el agua para consumo humano.

#### 4. GENERALIDADES

Las bacterias coliformes se han utilizado durante mucho tiempo como indicadores de la calidad del agua con base en la premisa de que, debido a que estos organismos están presentes en los intestinos de los animales de sangre caliente, su presencia en el agua podría indicar que ha ocurrido una contaminación fecal reciente. El examen de muestras de agua para detectar la presencia de *Escherichia coli* (*E. coli*), proporciona una indicación de dicha contaminación. Históricamente, este grupo de organismos se ha definido por su capacidad de fermentar la lactosa, en lugar de hacerlo a través de los principios de la bacteriología sistemática, por lo que el grupo está formado por bacterias de varios géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Los métodos más comunes utilizan un medio de caldo a base de lactosa para detectar los productos metabólicos finales de la fermentación de lactosa. La presencia de coliformes debe confirmarse en un medio que contenga lactosa y sales biliares (caldo de lactosa biliar verde brillante (BGLB)).

Las bacterias coliformes fecales forman parte del total del grupo coliforme. Son definidas como bacilos gran-negativos, no esporulado que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 44.5 °C +/- 0.2 °C dentro de las 24 +/- 2 horas. La mayor especie en el grupo de coliforme fecal es el *Escherichia coli*.

La identificación de Coliformes totales es más difícil ya que estos pueden provenir de suelo, y de superficies de agua dulce por lo que no siempre son intestinales. La presencia de Coliformes sugiere fallas en la eficacia del tratamiento y la integridad del sistema de distribución. La identificación de las cepas aisladas puede a veces dar una indicación sobre el origen.

La filtración por membrana es el mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de la membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro 0,45  $\mu$ m, esto gracias a



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 3 de 13	

que una bomba eléctrica ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua haciendo que se filtre. Los contaminantes de tamaño menor que el específico del poro atraviesan la membrana o se quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego está es llevada a un medio de enriquecimiento selectivo, en el laboratorio de microbiología de la PTAP Villasantana se utiliza el medio de cultivo Chromocult el cual promueve el crecimiento y la identificación.

#### 4.1. SELECCIÓN DEL MÉTODO

Los métodos usuales en la detección de Coliformes totales y fecales en agua son: método de filtración por membrana, reportados como UFC/100 mL; Enzima Sustrato, reportado como < 1 microorganismo en 100 mL; Sustrato Definido (0 microorganismo en 100 mL) y el método de Ausencia/ Presencia (Ausencia en 100 mL). Igualmente, se podrían adoptar otras técnicas y metodologías debidamente validadas por el Instituto Nacional de Salud - INS - o realizar una revalidación con base en documentos soporte de organismos internacionales.

Ahora bien, el laboratorio de calidad de la planta de tratamiento de Villasantana seleccionó el método establecido en la ISO 9308. Este método es específico para la enumeración de *Escherichia coli* (E. coli) y bacterias coliformes. El método se basa en la filtración por membrana, el cultivo posterior en un medio de agar coliforme cromogénico y el cálculo del número de organismos objetivo en la muestra. Este método es especialmente adecuado para aguas con un bajo número de bacterias que causarán menos de 100 colonias totales en agar coliforme cromogénico (CCA). Estos pueden ser agua potable, agua de piscina o agua embotellada. El análisis se dificulta en muestras de agua muy turbias o con alta carga de microorganismo; para este tipo de muestras es necesario realizar diluciones de la muestra.

#### 4.2. TOMA, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

**Preparación de los recipientes:** Se debe añadir un agente reductor a los recipientes destinados a la recolección de agua que contengan cloro residual u otros halógenos desinfectantes. El tiosulfato de



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 4 de 13	

sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) es un buen agente de decoloración que neutraliza todos los residuos halógenos y evita que continúe la acción bactericida durante el transporte de muestra. La cantidad del decolorante que debe adicionar a las muestras de agua potable es 0,1 mL de la solución de tiosulfato de sodio al 3% en una botella de 120 mL, este podrá neutralizar hasta 5 mg/L de cloro residual. Esterilizar las botellas de muestras más tiosulfato de sodio a 121 °C por 30 minutos a 15 psi.

**Recolección:** La muestra debe ser recolectada en recipientes de vidrio estériles con capacidad no menor a 100 mL con preservante (tiosulfato de sodio) para las muestras cloradas. Para el análisis microbiológico se debe coleccionar mínimo 100 mL.

**Toma de Muestras:** Se toma la muestra directamente sin realizar purga del recipiente, teniendo en cuenta no llenar el recipiente completamente, con la precaución de dejar una cámara de aire dentro de él ( $\pm 10\%$ ); el recipiente bacteriológico y su tapa, no deben tocar ninguna superficie contaminada, ya que esto podría alterar el resultado. Se llena el recipiente hasta la cantidad deseada, se tapa y se coloca el material protector de la tapa (papel o tela) ajustado con la pita.

Cuando se hagan tomas de ríos, corrientes, lagos, pantanos, fuentes o pozos se obtendrán muestras representativas, no es conveniente tomar muestras demasiado cerca de la orilla o demasiado lejos del punto de extracción ni a una profundidad superior o inferior a la de dicho punto, en estos puntos se puede hacer uso de una cuerda o un nylon que se amarre a la botella y se descargue con la boca hacia abajo

**Preservación:** La preservación de muestras es relativamente limitada y son generalmente para retardar la acción biológica, retardar la hidrólisis de compuestos químicos y complejos, y reducir la volatilidad de sus constituyentes. La mejor técnica de preservación es únicamente el retardar los cambios químicos y biológicos inevitables después de la recolección de las muestras. La conservación de las muestras depende de sus características, el análisis a realizar y las condiciones de almacenamiento.

**Transporte:** Después de recolectadas las muestras deben ser llevadas al laboratorio lo más rápido posible. Si no es posible el análisis en el lapso de 24 horas después del muestreo, se debe refrigerar evitando la exposición a la luz solar directa a una temperatura  $5 \pm 3$  °C. En este caso, el tiempo de almacenamiento debe mencionarse en el informe de prueba. Es conveniente asegurar que los



<b>SERVICIUAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 5 de 13	

recipientes se mantengan en posición vertical y que el líquido de muestra no se derrame, igualmente el instrumento que se emplea como refrigerante no debe entrar en contacto con la muestra para evitar su posible contaminación. La nevera de transporte debe contener hielos que mantengan la temperatura de refrigeración, estas deben estar limpias y en lo posible desinfectadas para evitar una fuente de contaminación.

Para información más completa ver procedimiento para la toma de muestras **STLABPR-01** "Toma de Muestras Físicoquímicas y Microbiológicas"

#### 4.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método consiste en la filtración de una porción de la muestra a través de un filtro de membrana, que retiene los organismos, y la colocación del filtro de membrana en una placa de agar coliforme cromogénico, la posterior incubación del filtro de membrana a  $(36 \pm 2)$  °C durante  $(21 \pm 3)$  h.

Se obtiene el recuento de colonias positivas a  $\beta$ -D-galactosidasa (rosa a rojo) como presuntas bacterias coliformes que no son *E. coli*. Para evitar resultados falsos positivos, causados por bacterias oxidasa positivas, por ejemplo, *Aeromonas spp*, las colonias presuntas se confirmarán mediante una reacción negativa de oxidasa. Recuento de colonias positivas para  $\beta$ -D-galactosidasa y  $\beta$ -D-glucuronidasa (azul oscuro a violeta) como *E. coli*. Las bacterias coliformes totales son la suma de colonias oxidasa negativas con color rosa a rojo y todas las colonias azul oscuro a violeta

#### 4.4. INTERFERENCIA

Debido a la baja selectividad del medio de agar diferencial, el crecimiento de fondo puede interferir con la enumeración confiable de *E. coli* y bacterias coliformes, por ejemplo, en aguas superficiales o en pozos poco profundos. Este método no es adecuado para este tipo de agua.

Algunas cepas de *E. coli* que son negativas para la  $\beta$ -D-glucuronidasa, como *Escherichia coli* O157, no se detectarán como *E. coli*. Como son  $\beta$ -D-galactosidasa positivas, aparecerán como bacterias coliformes en este agar cromogénico.

También se pueden presentar interferencias referidas a posibles falsos positivos o negativos, que se pueden presentar por: lavado de material ineficiente, fallas en el proceso de esterilización del material,



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 6 de 13	

ambientes contaminados, procedimiento inadecuado en la siembra, inadecuada toma, preservación y almacenamiento de la muestra, es por ello, que se debe seguir estrictamente los procedimientos establecidos para tal fin.

#### 4.5. CONTROLES DE CALIDAD

**Control Negativo y/o Blanco:** El blanco de reactivo (agua destilada) se utiliza para determinar si existe en alguna parte del proceso algún foco de contaminación. Como mínimo, incluya un reactivo blanco para cada conjunto de muestras por día. Este blanco es utilizado como control negativo.

**Controles Positivos:** Los microorganismos de KWIK-STIK™, KWIK-STIK™ Plus y LYFO DISK™ están previstos para usarse como control positivo y para verificar el desempeño de los ensayos, los reactivos y los medios que se usan en las pruebas microbianas para la detección e identificación de microorganismos aislados cultivados.

**Muestra de control de calidad (QCS):** Analizar una muestra de control de calidad (QCS) ciega (concentración desconocida) generada de manera externa al menos una vez al año (preferiblemente semestral o trimestralmente). Obtenga esta muestra de una fuente externa al laboratorio y compare los resultados con los resultados de aceptación de ese laboratorio. Si los resultados de la prueba no pasan los criterios de aceptación, investigue por qué, tome acción correctiva, y analizar un nuevo QCS. Repita este proceso hasta que los resultados cumplan con los criterios de aceptación.

Como criterio de aceptación se emplea el valor de desempeño del z-score de  $\pm 2$ , se evalúan los resultados obtenidos durante las participaciones para evaluar la tendencia de los datos.

**Control Esterilización:** Se realiza con una ampolla de Sterikon, que contiene caldo nutritivo, azúcar, un indicador de pH, así como esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (de esporulación optimada) como organismo de ensayo apatógeno. La termorresistencia está ajustada de tal manera que las esporas mediante calentamiento en vapor a presión tras 15 minutos a no menos de  $121 \pm 0,5$  °C (245 kPa) experimentan una destrucción total. A temperatura más baja o tiempo de



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 7 de 13	

acción más breve las esporas sobreviven al menos parcialmente. Las ampollas se agregan al material de carga en la autoclave.

**Control Material:** El material es verificado, mediante el uso de las cintas adhesivas impregnadas con tinta termoquímica que cambia de color cuando es expuesta a una temperatura determinada. Tienen como finalidad demostrar que el artículo fue expuesto al proceso de esterilización y distinguir entre artículos procesados y no procesados.

#### **4.6. SEGURIDAD LABORAL**

Utilizar los implementos de seguridad, de acuerdo con lo señalado en el Manual de Higiene y Seguridad Laboral STMH-01 (Bata, pantalón, zapatos antideslizantes, gafas de seguridad, máscara con filtro mixto de vapores ácidos y orgánicos, guantes de caucho). De acuerdo a la actividad realizada.

Debido a la posibilidad de contaminación por microorganismos del aire, todo el material a utilizar debe ser estéril a 121 °C durante 30 min, y la superficie donde se realicen los procedimientos debe estar completamente desinfectada.

Se realiza la recolección del residuo en bolsa roja y se rotula para la disposición final con empresa externa.

#### **4.7. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES**

##### **4.7.1. EQUIPOS**

Para esta metodología se deberá tener en cuenta el uso de un equipo adecuado para la esterilización por vapor (autoclave); cabina de flujo laminar para la siembra; incubadora controlada termostáticamente a  $(36 \pm 2)$  °C equipo para la filtración por membrana; filtros de membrana de aproximadamente 47 mm ó 50 mm de diámetro, con características de filtración equivalentes a un diámetro nominal de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y, preferentemente, con líneas de rejilla y estériles; bomba de vacío y cuanta colonias.



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 8 de 13	

## 4.7.2. REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO, Y CONTROLES

### 4.7.2.1. REACTIVOS

**Tiosulfato de Sodio 3%:** Pese 3 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  anhidro, diluya en un poco de agua destilada y afore en un matraz de 100 mL.

- Pese 4,6g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , diluya en un poco de agua destilada y complete el volumen en un matraz de 100 mL.

**Solución Salina:** Pese 8,5 g de NaCl, disuelva en un agua destilada y complete hasta 1000mL en un matraz aforado. Ajuste el pH con NaOH 1 M o HCl 1 M hasta  $7,0 \pm 0,5$  unidades a  $25^\circ\text{C}$  y esterilice.

**Diluyente de peptona:** Pese 1,0 g de digestión caseína (peptona), disuelva en un agua destilada y complete hasta 1000 mL en un matraz aforado.

**Nota:** Siga las instrucciones del fabricante en caso de utilizar un reactivo comercial.

### 4.7.2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Para la preparación de medios de cultivo, use agua destilada o agua desionizada libre de sustancias que puedan inhibir el crecimiento bacteriano en las condiciones de la prueba.

Alternativamente, use medios y reactivos disponibles comercialmente que cumplan con las composiciones que figuran a continuación y sigan estrictamente las instrucciones del fabricante.

**Agar Cromogenico Colinstant:** Suspender 37,8 g del polvo en 1 L de agua destilada calentándolos en un baño de agua hirviendo, con agitación frecuente hasta que se disuelva por completo (aproximadamente 35 minutos) o llevarlo a ebullición y distribuir en contenedores adecuados. Si es necesario, ajustar el pH a  $6,8 \pm 0,2$  unidades para después del tratamiento térmico. Esterilizar en la autoclave durante 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . Si el medio se prepara con ebullición para uso el mismo día, prolongar la ebullición por 2-3 minutos.

Dispensar en cajas de Petri de  $35 \pm 5\text{mm}$  a una profundidad de al menos 4mm, eso es aproximadamente 6 mL. Si no es para uso inmediato, almacenar en nevera a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  en la oscuridad y protegerse contra la evaporación durante al menos un mes. No debe haber humedad





<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 9 de 13	

visible en las placas antes de su uso. Cuando hay humedad presente, las placas deben secarse durante el tiempo mínimo requerido para eliminar la humedad visible.

**Nota:** Si se requiere preparar menos cantidad de medio de cultivo, realizar los cálculos adecuados.

**Reactivo Oxidasa:** Pese 0,1 g de N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamina diclorhidrato (CAS No. 637-01-4) en 10 mL de agua destilada.

Este reactivo no es estable. Deberá estar recién preparado en pequeñas porciones cada vez que sea necesario y debe protegerse contra la luz.

**ADVERTENCIA:** el diclorhidrato de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina es cancerígeno. El trabajo de preparación debe hacerse en un armario de humos. Use guantes protectores y evite el contacto con la piel.

**Agar Triptona de Soja (TSA):** Suspensa los ingredientes en las cantidades sugeridas en el recipiente dependiendo de la marca agua calentándolos en un baño de agua hirviendo o en vapor libre. Si es necesario, ajuste el pH para que después de esterilizar en autoclave tenga un valor correspondiente a  $7,2 \pm 0,1$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esterilice durante 15 minutos a  $(121 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$  en una autoclave. Dejar enfriar a aproximadamente hasta  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y verter en placas de Petri a una profundidad de al menos 4 mm. Si no es para uso inmediato, las placas pueden almacenarse a  $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$  en la oscuridad y protegerse contra la evaporación durante al menos ocho semanas.

**NOTA:** Cualquier otro agar no selectivo puede usarse para subcultivar antes de la prueba de oxidasa, siempre que no interfiera con la prueba de oxidasa.

#### 4.7.2.3. PREPARACIÓN CONTROLES DE CALIDAD

**Controles Positivos:** Se procede a tomar de la cepa de trabajo conservada en tubo de ensayo con caldo BHI, la cantidad que se recoja en un asa estéril, diluir en 100mL de agua peptonada, agitar vigorosamente para lograr una distribución uniforme y seguir el procedimiento descrito en el numeral 7.1 (Muestras).

**Muestra de control de calidad (QCS):** Estas muestras son preparadas, procesadas y analizadas de acuerdo al procedimiento descrito por la entidad que emita la prueba interlaboratorio.



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 10 de 13	

**Control Esterilización:** Las ampollas de Sterikon se agregan al material de carga en la autoclave. Después de haber tenido lugar la esterilización se controla el éxito de la esterilización mediante incubación de las ampollas: Si no existe crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus* queda demostrada una esterilización suficiente, mientras que la existencia de crecimiento indica una esterilización insuficiente.

En caso de esterilización suficiente de las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* quedan destruidas. El color del contenido de las ampollas permanece rojo a violeta rojizo y transparente. En caso de esterilización insuficiente sobreviven las esporas de *Geobacillus stearothermophilus*. El contenido de las ampollas muestra generalmente ya dentro de 24 horas de incubación un viraje de color hacia amarilla a amarilla-naranja por formación de ácido como consecuencia de la fermentación del azúcar, así como una turbidez levemente debida a crecimiento.

**Control Material:** El material antes de ser esterilizado deberá llevar por lo menos un trozo de cinta adhesiva impregnada con tinta termoquímica que cambia de color cuando es expuesta a una temperatura determinada.

### 4.7.3. MATERIALES

Cajas de Petri pequeña con capacidad aproximada de 10 mL, pinzas desinfectadas (flameadas) o estériles, para la manipulación de los filtros de membrana, membranas de filtración de 0,45 micras, recipientes tapa azules estériles de 250 mL.

## 5. DESARROLLO

### 5.1. MUESTRAS

**Antes de iniciar:** mezcle bien la muestra mediante agitación vigorosa para lograr una distribución uniforme de los microorganismos y, según la naturaleza del agua y el contenido microbiano previsto, realice las diluciones necesarias en esta etapa. Encender la cámara de flujo laminar, dejar que el flujo se estabilice, encender mechero de ser necesario.



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	Código: STLABIN-03	Versión 01
Instructivo de Cloro Combinado, Residual y Total SM 4500-CI F Titulación ferrosa DPD	Páginas 11 de 13	

Si hay cromato presente ( $> 2 \text{ mg/L}$ ) agregue y mezcle  $0,2\text{g}$  de  $(\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) / 100\text{mL}$  de muestra antes de agregar otros reactivos. Si, además, el sulfato es  $> 500 \text{ mg/L}$ , utilice  $0,4 \text{ g}$  de  $(\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) / 100\text{mL}$  de muestra.

**Cloro libre o cloramina:** Coloque  $5 \text{ mL}$  de reactivo tampón y  $5 \text{ mL}$  de la solución indicadora de DPD en un matraz de titulación y mezcle (o use aproximadamente  $0,500\text{g}$  de polvo de DPD). Añada  $100 \text{ mL}$  de muestra o muestra diluida y mezcle.

- Para determinar Cloro libre titule rápidamente con FAS hasta que se elimine el color rojo.
- Para las monocloramina, agregue un cristal muy pequeño de KI (aproximadamente  $0,5 \text{ mg}$ ) o  $0,1 \text{ mL}$  ( $2 \text{ gotas}$ ) de solución de KI y mezclar. Continúe titulando hasta que el color rojo se descargue nuevamente.
- Dicloramina, agregue varios cristales de KI (aproximadamente  $1\text{g}$ ) y mezcle para disolver. Deje reposar durante  $2 \text{ min}$  y continúe titulando hasta que desaparezca el color rojo. Para concentraciones de dicloramina superiores a  $1 \text{ mg/L}$ , deje reposar  $2 \text{ minutos}$  más si el cambio de color indica una reacción ligeramente incompleta. Cuando no se espera que las concentraciones de dicloramina sean altas, use la mitad de la cantidad especificada de KI.
- Procedimiento simplificado para cloro libre y combinado o cloro total mirar procedimiento anterior para obtener monocloramina y dicloramina juntas como cloro combinado. Para obtener el cloro total en una lectura, agregue la cantidad total de KI al inicio, con las cantidades especificadas de reactivo tampón e indicador DPD, y titule después de  $2 \text{ minutos}$  de reposo.

**Tricloruro de nitrógeno:** Coloque un cristal muy pequeño de KI (aproximadamente  $0,5 \text{ mg}$ ) o  $0,1 \text{ mL}$  de solución de KI en un matraz de titulación. Agregue  $100\text{mL}$  de muestra y mezcle. Agregue el contenido a un segundo matraz que contenga  $5 \text{ mL}$  de reactivo tampón y solución indicadora de DPD (o agregue aproximadamente  $0,500 \text{ g}$  de polvo de DPD directamente al primer matraz). Valorar rápidamente con el valorante FAS estándar hasta que se elimine el color rojo.

**Cloro libre en presencia de bromo o yodo:** Determine el cloro libre como en el párrafo anterior. A una segunda muestra de  $100 \text{ mL}$ , agregue  $1 \text{ mL}$  de solución de glicina antes de agregar DPD y tampón. Valorar de acuerdo con el anterior.



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	Código: STLABIN-03	Versión 01
Instructivo de Cloro Combinado, Residual y Total SM 4500-Cl F Titulación ferrosa DPD	Páginas 12 de 13	

## 5.1. CÁLCULOS Y EXPRESION RESULTADOS

Para una muestra de 100 mL, 1,00 mL de titulante FAS estándar = 1,00 mg de Cl como Cl<sub>2</sub>/L.

Reading	NCl <sub>3</sub> Absent	NCl <sub>3</sub> Present
A	Free Cl	Free Cl
B - A	NH <sub>2</sub> Cl	NH <sub>2</sub> Cl
C - B	NHCl <sub>2</sub>	NHCl <sub>2</sub> + ½NCl <sub>3</sub>
N	—	Free Cl + ½NCl <sub>3</sub>
2(N - A)	—	NCl <sub>3</sub>
C - N	—	NHCl <sub>2</sub>

En el caso de que la monocloramina esté presente con NCl<sub>3</sub>, se incluirá en N, en cuyo caso se obtendrá NCl<sub>3</sub> a partir de 2 (N-B).

El dióxido de cloro, si está presente, se incluye en A en la medida de una quinta parte de su contenido total de cloro.

En el procedimiento simplificado para cloro libre y combinado, solo se requieren A (Cl libre) y C (Cl total). Obtenga cloro combinado de C-A.

El resultado obtenido en el procedimiento simplificado de cloro total corresponde a C.

Registro el resultado en el formato STLABFO-29 "Registro de Resultados Primarios"

## 5.2. PRECISIÓN Y SESGO

Los estudios publicados dan los resultados de nueve métodos utilizados para analizar muestras de agua sintética sin interferencias.

## 6. REGISTROS

STLABFO-29 "Registro de Resultados Primarios"

STLABFO-14 "Estandarización de Soluciones"

STLABFO-16 "Gráficos de control"

## 7. ANEXOS

### 7.1. REFERENCIAS



<b>SERVICIUDAD E.S.P.</b>	<b>Código</b> STLABIN-01	<b>Versión</b> 01
Instructivo de Coliformes Totales y Fecales ISO 9308-1: 2014	<b>Páginas</b> 13 de 13	

## 6. REGISTROS

STLABPR-01 "Toma de Muestras Fisicoquímicas y Microbiológicas"

STLABFO-29 "Registro de Resultados Primarios"

STLABFO-23 "Controles de calidad Microbiología".

STLABFO-25 "Operación Diaria Microbiología"

## 7. ANEXOS

### 7.1. REFERENCIAS

- ISO 8199-2:2005. Water quality – General guidance on the enumeration of microorganisms by culture.
- ISO 9308-1:2014 Water quality – Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. Version vigente Washington, DC.
- NTC-ISO/IEC 17025 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración.
- Decreto 1575. (2007). Ministerio de la protección social. "Por el cual se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano".
- Resolución 2115. (2007). Ministerio de la protección social, ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. "Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano".
- Instrucciones de Uso de la cepa LYFO –DISK. Disponible en: <https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=530&c=915960&h=fe0261b9ecb4cb8f6a9c&xt=.pdf> Consultado: Mayo 08 de 2020