



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 1 de 16	

1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento e instrucciones para el conteo de microorganismos mesófilos aerobios en muestras de aguas crudas y tratadas en el Laboratorio de Microbiología de Serviciudad ESP.

2. ALCANCE Y RESPONSABLES

Este procedimiento aplica para muestras de aguas crudas y tratadas realizadas en el Laboratorio de Control de Calidad de la planta de tratamiento de agua de Serviciudad ESP.

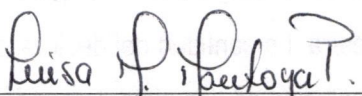
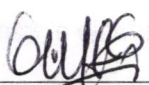
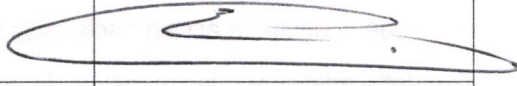
La administración, control y ajustes de este documento es responsabilidad del técnico de microbiología bajo la supervisión del Técnico de calidad de agua. La ejecución de los ensayos será responsabilidad del técnico de microbiología.

3. DEFINICIONES

Agua potable: Agua que ha sido sometida a tratamiento para su potabilización por lo cual es apta para el consumo humano y que cumple con los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos establecidos en la norma NTC 813.

Microorganismos mesófilos: Microorganismos aerobios o anaerobios facultativos que crecen en temperaturas desde los 25 hasta los 40 °C., descomponen la materia orgánica, pueden ser saprófitos o patógenos. La presencia de microorganismos es indicador de calidad de agua y alimentos.

Inocuidad: Condición de un alimento o agua para consumo humano donde se asegura que estos no representan riesgo para la salud del consumidor.

ELABORADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
 Luisa Marina Montoya Pózada Técnico de Calidad de agua	 Genny Marcela Hurtado Giraldo Profesional Planta de Tratamiento	 Eduardo Andrés Brand Ruíz Subgerente Técnico y Operativo
Fecha: 2024-02-20	Fecha: 2024-02-22	Fecha: 2024-02-23



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
	Páginas 2 de 16	

4. GENERALIDADES

4.1. APLICACIONES

El recuento en placa heterotrófica (HPC), anteriormente conocido como recuento en placa estándar, es un procedimiento para estimar el número de bacterias heterótrofas cultivables vivas en el agua y para medir cambios en piscinas o durante el tratamiento y distribución del agua. Las colonias pueden surgir de pares, cadenas, grupos o células individuales, todas las cuales se incluyen en el término unidades formadoras de colonias (UFC). El recuento final también depende de la interacción entre las colonias en desarrollo.

4.2. MÉTODO

Método de vertido en placa: El método de vertido en placa (SM: 9215B) es sencillo de realizar y puede admitir volúmenes de muestra o de muestra diluida que oscilan entre 0,1 y 2,0 mL. Produce colonias subsuperficiales que son relativamente pequeñas, compactas y menos propensas a invadir unas a otras que las colonias superficiales. Sin embargo, las colonias sumergidas a menudo crecen más lentamente y son difíciles de transferir. Un baño de agua controlado termostáticamente es esencial para templar el agar.

4.3. TOMA, PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Tenga en cuenta las recomendaciones para la toma de muestra establecidas en el procedimiento STLABPR-01 Toma de Muestras Físicoquímicas y Microbiológicas

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 sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) es un buen agente de dechloración que neutraliza todos los residuos halógenos y evita que continúe la acción bactericida durante el transporte de muestra. La cantidad del dechlorante 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.



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 3 de 16	

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 y se tapa de manera inmediata.

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 a $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$ pero no permita que se congele durante el tránsito. En este caso, el tiempo de almacenamiento debe mencionarse en el informe de prueba. Es conveniente asegurar que los



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
	Páginas 4 de 16	

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.

4.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método de vertido en placa consiste en contar el número de colonias desarrolladas en una placa de medio de cultivo sólido, en el que se ha sembrado un volumen conocido de muestra de agua transcurrido un tiempo y una temperatura de incubación determinados.

El agar Plate Count es un medio de cultivo sólido, no selectivo, diseñado para la cuantificación de la carga microbiana aerobia presente en muestras de agua de consumo, entre otras. Está compuesto por extracto de levadura, tripteína, glucosa y agar; esta formulación contiene elementos básicos que permite el desarrollo de la carga microbiana aerobia presente, no exigente. Como el medio no contiene inhibidores, las bacterias pueden desarrollarse sin ningún tipo de restricciones, por ello, es ideal para el recuento general de colonias. Sin embargo, la técnica de cuantificación en placa no detectará todas las bacterias presentes, sino solo aquellas que sean capaces de crecer bajo las condiciones ambientales a la que sea sometido el agar.

En este sentido la técnica de cuantificación en placa busca determinar por lo general la cantidad de bacterias del tipo mesófilas aerobias, es decir, aquellas que se desarrollan en temperaturas entre 25 y 40 °C con una temperatura óptima de crecimiento a 37 °C.

La cuantificación microbiana se expresa en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra.



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 5 de 16	

4.5. INTERFERENCIAS

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

4.6. CONTROLES DE CALIDAD

Control Negativo: La cepa KWIK-STIK *Pseudomonas aeruginosa* ATCC™ 10145, será usada como control negativo para verificar el desempeño del análisis, los reactivos y la selectividad del medio. Registrar los resultados en el formato STLABFO-23 Controles de Calidad Microbiológicas

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.

Registrar los resultados en el formato STLABFO-23 Controles de Calidad Microbiológicas

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 ± 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



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 6 de 16	

menos de $121 \pm 0,5$ °C (245 kPa) experimentan una destrucción total. A temperatura más baja o tiempo de 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.

4.7. 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.

4.8. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

4.8.1. EQUIPOS

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 la temperatura requerida por la metodología seleccionada y cuenta colonias.



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 7 de 16	

4.8.2. REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO, Y CONTROLES

4.8.2.1. Reactivos

Tiosulfato de Sodio 3%: Pese 4,6 g 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.

4.8.2.2. 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.

Los usuarios deben asegurarse de que las formulaciones de los medios adquiridos coincidan con las que se describen a continuación. Compare los lotes nuevos de medios con el lote actual en uso de acuerdo con las Secciones SM: 9020B.5j y 9b.

Agar Plate Count (también llamado agar de levadura de glucosa triptona): Este medio se puede utilizar para examinar bacterias heterótrofas en una amplia variedad de matrices. Se puede utilizar tanto para métodos de vertido como de placa esparcida. Este agar rico en nutrientes, ampliamente utilizado en el pasado, puede dar recuentos más bajos que los agares R2A o NWRI. Debe usarse el medio deshidratado comercialmente disponible cuando esté disponible.

Triptona	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua grado reactivo	1 L

Preparación: Pese 22,5 g de agar Plate, diluya en un poco de agua destilada y complete el volumen en un frasco tapa rosca azul de 1000 mL.

Nota: El pH debe ser de $7,0 \pm 0,2$ después de esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 8 de 16	

Agua peptonada: Funciona como un medio de cultivo que sirve como diluyente potencial y permite el crecimiento de microorganismos.

Preparación: Pese 14,67 g de agua 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.

Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón): El caldo BHI con enriquecimiento Fildes es un medio de cultivo nutritivo tamponado que contiene infusiones de tejido de cerebro y corazón y peptonas para suministrar proteínas y otros nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes.

Preparación: Pese 37,0 g de caldo BHI, disuelva en un agua destilada y complete hasta 1000 mL en un frasco tapa rosca azul.

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

Registrar la preparación de los medios de cultivo en el formato STLABFO-24 Preparación de Medios de Cultivo

4.8.2.3. Controles de calidad

Controles Positivos: Se procede a tomar de la cepa de trabajo *E. coli* ATCC 25922 conservada en tubo de ensayo con caldo BHI, la cantidad que se recoja en un asa estéril, diluir en 100 mL de agua peptonada, agitar vigorosamente para lograr una distribución uniforme y seguir el procedimiento descrito para el análisis de la muestra descrita en el presente documento.

Control Negativo: Se procede a tomar de la cepa de trabajo KWIK-STIK *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 conservada en tubo de ensayo con caldo BHI, la cantidad que se recoja en un asa estéril, diluir en 100 mL de agua peptonada, agitar vigorosamente para lograr una distribución



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 9 de 16	

uniforme y seguir el procedimiento descrito para el análisis de la muestra descrita en el presente documento.

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 y/o desempeño.

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.

Control de Ambientes y superficies: Se realiza una vez a la semana, el cual se describe en el Instructivo Control de Medio Ambiente, Superficies y Agua STLABIN-20 y su resultado se registra en el formato STLABFO-21 Control de Medio Ambiente y Superficies.

4.8.3. MATERIALES

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



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 10 de 16	

5. DESARROLLO

5.1. ÁREA DE TRABAJO

Proporcione un mesón de acero inoxidable de trabajo nivelado con un área amplia en una habitación limpia, sin corrientes de aire y bien iluminada o dentro de una cabina de flujo laminar horizontal. Use mesas de trabajo con superficies no porosas y desinfecte antes de realizar cualquier análisis.

5.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Marque cada placa con el número de muestra, la dilución, la fecha y cualquier otra información necesaria antes de la siembra. Para los métodos de vertido o extensión en placa, utilice placas de Petri de vidrio estéril (65 cm²) o de plástico desechable preesterilizado (57 cm²).

Mezcle completamente todas las muestras o diluciones agitándolas suavemente durante 7 s a mano (aproximadamente 25 veces con un movimiento de 1 pie) o mediante un agitador mecánico durante 15 s a baja velocidad. Los resultados analíticos dependen de una mezcla adecuada de la muestra; si la muestra no se agita adecuadamente antes de extraer las alícuotas, la densidad bacteriana real podría subestimarse.

Medición de porciones de muestra: No prepare diluciones ni vierta placas bajo la luz directa del sol. Use una pipeta estéril para todas las transferencias de cada contenedor; una pipeta por dilución. Si alguna pipeta se contamina antes de que se completen las transferencias, reemplácela por una estéril. Tenga cuidado al retirar las pipetas estériles del recipiente, para evitar la contaminación, no arrastre la punta de la pipeta por los extremos expuestos de las pipetas en el recipiente de la pipeta ni por los labios y cuellos de los frascos de dilución. Al retirar la muestra, no inserte la pipeta > 2 a 3 cm por debajo de la superficie de la muestra o dilución.

Medición de diluciones: Agregue la muestra a una placa de Petri estéril antes de agregar el medio de cultivo templado y derretido. Al descargar porciones individuales de la muestra, sostenga la punta de la pipeta o micropipeta en un ángulo de aproximadamente 45 ° con la punta tocando el fondo de



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 11 de 16	

la placa de Petri o el cuello interior de la botella de dilución. Levante la tapa de la placa de Petri lo suficiente como para insertar la punta de la pipeta o micropipeta. Espere de 2 a 4 s para que el líquido drene desde la marca de graduación de 1 mL hasta la punta de la pipeta. Cuando mida cantidades de 0,1 mL, deje que la muestra diluida se drene de la graduación de referencia elegida hasta que se hayan entregado 0,1 mL. Utilice diluciones decimales cuando prepare volúmenes de muestra < 0,1 mL.

Si la pipeta no es del tipo de soplado, toque la punta de la pipeta una vez contra un punto seco en el fondo de la placa de Petri. Si utiliza una pipeta de soplado con tapones de algodón y un bulbo de pipeta (menos preferible), sople suavemente el volumen restante de la dilución de la muestra. Retire la pipeta sin tocarla más al plato.

Después de depositar las porciones de prueba para cada serie de placas, vierta el medio de cultivo y mezcle cuidadosamente. No deje que transcurran más de 20 minutos entre el inicio del pipeteo y el vertido de las placas.

5.3. MEDIOS PARA LA SIEMBRA

Placas de vertido: Limite el número de muestras que se van a sembrar en cualquier serie para que no transcurran más de 20 min (preferiblemente 10 min) entre la dilución de la primera muestra y el vertido de la última placa de la serie. Después de agregar la muestra a la placa de Petri, levante suavemente la tapa lo suficiente como para verter al menos 10 a 12 mL de medio licuado (mantenido de 44 a 46 °C) en cada placa. Cuidadosamente, evite derramar el medio sobre la parte exterior de la tapa del plato al verter. Cuando vierta agar de matraces o tubos que se han mantenido en un baño de agua, limpie el exterior de la botella con una toalla limpia y evite que gotee agua del baño de agua sobre la superficie de trabajo. A medida que se vierte cada placa, mezcle bien el medio derretido con las porciones de prueba en la caja de Petri, teniendo cuidado de no salpicar la mezcla sobre el borde, girando la placa en sentido horario y antihorario, o girando e inclinando. Deje que las placas se solidifiquen (dentro de 10 min) sobre una superficie nivelada. Después de que el medio se solidifique, invierta las placas y colóquelas en la incubadora. Para placas incubadas a 35 °C, no apile más de cuatro platos de alto.



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 12 de 16	

Controles de esterilidad: Compruebe la esterilidad de los medios vertiendo placas de control para cada serie de muestras. Prepare controles adicionales para determinar la contaminación de placas, pipetas y aire ambiental.

5.4. INCUBACIÓN

Los medios se deberán incubar de la siguiente manera: a 35 °C durante 48 ± 3 h.

5.5. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

5.5.1. CONTAR Y REGISTRAR

Vierta y extienda las placas: Cuente todas las colonias en las placas seleccionadas inmediatamente después de la incubación. Si el conteo debe retrasarse temporalmente, almacene las placas refrigeradas por ≤24 h, pero evite esto como práctica de rutina. Registre los resultados de los controles de esterilidad en el formato STLABFO-24 Preparación de Medios de Cultivo.

Cuente las colonias manualmente usando un contador de colonias. Si dicho equipo no está disponible, entonces se pueden usar otros contadores en las muestras que no cumplan con los requisitos, siempre que proporcionen un aumento equivalente. Se encuentran disponibles instrumentos automáticos de conteo de placas; generalmente usan un programa de computadora y un escáner y dan resultados calculados. Su uso es aceptable si, cuando se evalúan al ejecutarse en paralelo con un método manual, los resultados del conteo son comparables.

Cuando prepare placas, pipetee volúmenes de muestra que producirán entre 30 y 300 colonias/placa. El objetivo es tener al menos una dilución que produzca recuentos de colonias dentro de estos límites, excepto en los casos que se indican a continuación.

Por lo general, no pipetee > 2,0 ml de muestra; sin embargo, si este volumen de muestra produce < 30 colonias, registre el resultado observado.

De lo contrario, utilice únicamente placas que contengan de 30 a 300 colonias cuando determine el recuento de placas. Calcule el recuento bacteriano por mililitro de la siguiente manera:



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 13 de 16	

$$UFC/mL = \frac{\text{colonias contadas}}{\text{volumen real de muestra en placa (mL)}}$$

Si ninguna placa contiene de 30 a 300 colonias y una o más placas tienen > 300 colonias, use la(s) placa(s) cuyo conteo sea más cercano 300 colonias. Calcule el conteo como se indicó anteriormente e informe como UFC/mL estimado.

Si las placas de todas las diluciones de una muestra no tienen colonias, informe el recuento como < 1 dividido por el volumen de muestra más grande correspondiente utilizado. Por ejemplo, si no se desarrollan colonias a partir del volumen de muestra de 0,01 mL, informe el recuento como < 100 UFC/mL.

Si el número de colonias por placa supera las 300, informe los resultados como "demasiado numerosos para contar" (DNPC). Si hay 10 colonias/cm², cuente las colonias en 13 cuadrados (del contador de colonias) con una distribución de colonias representativa. Si es posible, seleccione siete cuadrados consecutivos horizontalmente a lo largo del plato y seis cuadrados consecutivos verticalmente, teniendo cuidado de no contar un cuadrado más de una vez. Calcule las colonias estimadas por placa de la siguiente manera: cuando la placa mida 65 cm² (el área típica de una placa de vidrio), multiplique la suma del número de colonias en 13 centímetros cuadrados representativos por 5; cuando la placa mida 57 cm² (el área típica de una placa de plástico), multiplique la suma del número de colonias en 19 centímetros cuadrados representativos por 3. Cuando haya >10 colonias/cm², cuente cuatro cuadrados representativos, tome el promedio cuente por cm² y multiplique por el factor apropiado (57 para placas de plástico desechables y 65 para placas de vidrio) para estimar colonias/placa.

NOTA: El diámetro nominal de las placas de plástico desechables y de vidrio no desechables es de 100 mm. Sin embargo, el diámetro interno de las placas desechables está más cerca de los 85 mm y el de las placas no desechables está más cerca de los 90 mm). Cuando los recuentos bacterianos en un plato están por encima de 100, notifique los resultados como > 6500 dividido por el volumen de muestra más pequeño sembrado para placas de vidrio o > 5700 dividido por el volumen de muestra más pequeño sembrado para placas de plástico. Informar como CFU/mL estimado.



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 14 de 16	

Si se detectan colonias esparcidas (o esparcidores) en la(s) placa(s) seleccionada(s), contar las colonias en áreas representativas únicamente si están uniformemente distribuidas en zonas libres y si el área cubierta por las colonias esparcidas no supera la mitad del área total de la placa.

Cuando se deben contar las colonias en expansión, cuente cada uno de los siguientes tipos como uno: una cadena de colonias que parece ser causada por la desintegración de un grupo bacteriano cuando se mezclaron el agar y la muestra; un esparcidor que se desarrolla como una película o crecimiento entre el agar y el fondo de la placa de Petri; y una colonia que se forma en una película de agua en el borde o sobre la superficie del agar. Los dos últimos tipos se desarrollan en gran medida debido a la acumulación de humedad en el punto de origen del esparcidor. Con frecuencia cubren más de la mitad de la placa e interfieren con la obtención de un conteo de placa confiable.

Cuente las colonias adyacentes similares como colonias individuales siempre que no se toquen y la distancia entre ellas sea al menos igual al diámetro de la colonia más pequeña. Cuente las colonias impactantes que difieren en apariencia (p. ej., morfología o color) como colonias individuales.

Si las placas tienen un crecimiento excesivo del esparcidor, notifíquelo como "esparcidor (Spr)". Cuando las placas son incontables debido a una dilución omitida, caída accidental o contaminación, o si las placas de control indican que el medio u otro material estaba contaminado, notifíquelo como "Accidente de Laboratorio" (LA).

5.6. CÓMPUTO Y REPORTE DE CONTEOS

El término unidad(es) formadora(s) de colonias (UFC) es descriptivo de los métodos usados; por lo tanto, reporte todos los conteos como UFCs. Indique también el método utilizado, la temperatura y el tiempo de incubación y el medio. Por ejemplo: UFC/mL, método de vertido en placa, 35 °C/48 h, agar de recuento en placa.

Para calcular el recuento de placas heterótrofas para los métodos de vertido en placa, placa extendida y filtro de membrana (UFC/mL), divida el número total o promedio de colonias por placa por el volumen de muestra. (Use el número promedio de colonias si se duplican las placas de la



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 15 de 16	

misma dilución). Registre los volúmenes de muestra utilizados y el número de colonias en cada placa contadas o estimadas.

Cuando se cuenten las colonias en placas duplicadas y/o diluciones consecutivas y se promedien los resultados antes de registrarlos, redondee los recuentos a dos cifras significativas solo cuando convierta a UFCs.

Evite crear precisión y exactitud ficticias al calcular UFCs registrando solo los dos primeros dígitos. Redondee hacia arriba el segundo dígito cuando el tercer dígito sea del 5 al 9 y redondee hacia abajo cuando el tercer dígito sea del 1 al 4 (por ejemplo, reporte un conteo de 142 como 140, 155 como 160 y 35 como 35).

6. REGISTROS

STLABPR-01 "Toma de Muestras Fisicoquímicas y Microbiológicas"

STLABFO-21 "Control de Medio Ambiente y Superficies"

STLABFO-23 "Controles de Calidad Microbiología"

STLABFO-24 "Preparación de Medios de Cultivo"

STLABFO-25 "Registro de Operación Diaria Microbiología"

STLABFO-29 "Registro de Resultados Primarios"

7. ANEXOS

7.1. REFERENCIAS

- 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.



SERVICIUDAD E.S.P.	Código STLABIN-13	Versión 01
Instructivo de Microorganismos Mesófilos SM: 9215B	Páginas 16 de 16	

- 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 KWIK-STIK PLUS. Disponible en: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=530&c=915960&h=fe0261b9ecb4cb8f6a9c&_xt=.pdf Consultado: mayo 08 de 2020
- Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología médica (ANMAT). Análisis microbiológico de los alimentos, metodología analítica oficial, microorganismos indicadores. 2014 volumen 3.