

APOYO EN EL ANALISIS DEL RECURSO HIDRICO DE LA JURIDICCION DE LA CAR,
EN LA DETERMINACION DE COLIFORMES TOTALES Y *ESCHERICHIA COLI*
MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO COLILERT POR EL MÉTODO
NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP).

DIANA CAROLINA ROBAYO CHAPARRO

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN QUIMICA

BOGOTÁ D. C. 2019

APOYO EN EL ANALISIS DEL RECURSO HIDRICO DE LA JURIDICCION DE LA CAR,
EN LA DETERMINACION DE COLIFORMES TOTALES Y *ESCHERICHIA COLI*
MEDIANTE LA TÉCNICA DE SUSTRATO DEFINIDO COLILERT Y EL MÉTODO
NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP).

DIANA CAROLINA ROBAYO CHAPARRO

Proyecto de Trabajo de Grado para optar por el Título de Licenciado en Química
Modalidad Pasantía

Directora
MSc JAIDITH MARISOL RAMOS RINCÓN
Director Externo
Ph.D. EDWIN GIOVANI GARCÍA MASMELA

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN QUIMICA
BOGOTÁ D. C. 2019

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a mi familia, mis padres quienes con esfuerzo, amor y constante apoyo me brindaron una educación, a mis hermanas quienes en el proceso de formación han sido incondicionales con sus consejos y fuerza para continuar cada día, a Ph.D. Edwin Giovani García Masmela y Ph.D Diana María Delgado Londono por brindarme la oportunidad de desarrollar la pasantía en la Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca (CAR), a la profesora MSc. Jaidith Marisol Ramos Rincón por dirigirme en el proceso de la pasantía y acompañarme en la formación académica universitaria, al área de microbiología Diana Catalina Pedraza zapata por brindarme sus enseñanzas en cada una de las actividades, análisis y protocolos importantes a desarrollar en el laboratorio, a Juan Carlos Segura por su cariño y apoyo, y a todas aquellas personas que durante lo largo de la carrera contribuyeron a mi formación académica.

A mi alma mater la Universidad Distrital Francisco José de Caldas por formarme como licenciada en Química y a la Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca (CAR) por abrirme sus puertas y permitirme realizar la pasantía en sus instalaciones.

Contenido

RESUMEN	5
INTRODUCCION	6
1. MARCO TEORICO.....	8
1.1 Calidad del agua.....	9
1.2 Microorganismo indicadores de la calidad del agua	9
1.3 Coliformes totales	10
1.3 Escherichia coli	10
1.5 Análisis microbiológico del agua.....	11
1.6 Medios de cultivo de los microorganismos.....	12
1.7 Prueba enzima sustrato definido colilert	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo general	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. METODOLOGIA	16
4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PASANTÍA.....	19
4.1 Cronograma de actividades.....	19
4.2 Desarrollo de las actividades realizadas.....	20
5. RESULTADOS.....	25
CONCLUSIONES	28
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	29

RESUMEN

En este informe se sintetizan las actividades de pasantía realizadas en la Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca (CAR), la cual tiene como función desarrollar y definir programas de medición, caracterización y seguimiento de la calidad de los recursos naturales (aire, agua y suelo), por medio de la implementación de técnicas y metodologías que sirvan de insumo para el control, identificación y seguimiento de las zonas de la jurisdicción más afectadas ambientalmente por la contaminación. Esta pasantía se llevó a cabo en el área de microbiología en un período de 15 semanas a partir de agosto hasta noviembre del 2019. La pasantía se centró en el apoyo de los procedimientos analíticos del laboratorio, cumpliendo como función principal el análisis en la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua mediante la técnica de sustrato definido colilert por el método número más probable (NMP), esta técnica es una de las más utilizadas ya que presenta un alto índice de precisión en la identificación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua. El desarrollo de la pasantía permitió fortalecer la formación profesional a través de la adquisición de nuevos conocimientos y la aplicación de estos en los procedimientos analíticos del laboratorio.

Palabras claves: Colilert, *E.coli*, coliformes totales, calidad de agua, número más probable, microbiología, CAR.

INTRODUCCION

Este informe final recoge el proceso de aprendizaje y presenta los resultados de índole académico correspondientes a la Pasantía realizada en el área de microbiología de la Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca (CAR), la cual es una entidad que está altamente certificada y cumple con los criterios en la toma, preservación de muestras y análisis de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en las matrices ambientales de agua, aire y suelo.

Uno de los parámetros principales en el área de microbiología es el análisis de la calidad del agua, ya que este recurso es vínculo de agentes patógenos (bacterias, virus y parásitos). Como función principal de la pasantía se me asignó el apoyo en el análisis en la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua mediante la técnica sustrato definido colilert y método número más probable (NMP).

La presencia de microorganismos patógenos en los cuerpos de agua es causal de riesgos en la salud, ya que su consumo puede ser fuente de numerosas enfermedades. En las matrices ambientales las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia son las que están presentes en el tracto digestivo del hombre o animales, estas son eliminadas a través de las heces o materia fecal (Larrea, Rojas, & Romeu, 2013). Debido a que su identificación y comprobación a nivel de laboratorio requiere de trabajo y tiempo prolongado, el grupo más utilizado por facilidad, heterogeneidad y rápida detección es el de coliformes totales y *Escherichia coli*, siendo adecuados como indicadores de contaminación bacteriana por aspectos como: se consideran microorganismos de contaminación común presentes en el tracto gastrointestinal del hombre y animales de sangre caliente, están presentes en altas cantidades, persisten por tiempo más

prolongado en matrices como aguas, lodos y suelos en comparación con otras bacterias patógenas, se comportan como otros patógenos en sistemas de desinfección. (Rios, Cadavid, & Gutierrez, 2017)

Para el análisis microbiológico de la calidad del agua se utilizó la técnica sustrato definido colilert, la cual es una prueba de enzima – sustrato que utiliza sustratos hidrolizables para la detección simultánea de enzimas bacterianas de coliformes totales y *Escherichia Coli*. Los coliformes totales son bacterias que poseen la enzima β -D-galactosidasa, la cual rompe el sustrato cromogénico, liberando el cromógeno. Estas bacterias producen un cambio de color, debido a que los coliformes totales poseen la enzima β -D-galactosidasa que rompe el complejo β -D-galactopiradosido y O-nitrofenil (ONPG) presente en el sustrato, liberando O-nitrofenol que genera la coloración amarilla. *Escherichia coli*, es una bacteria que responde como coliforme total positivo, y además, posee la enzima β -D-glucuronidasa, que libera el fluorógeno. Esta produce fluorescencia, la cual se debe a que *Escherichia coli* sintetiza la enzima β -D-glucuronidasa que rompe el complejo β -D-glucurónido-4-metil-umbeliferilo (MUG), presente en el sustrato, liberando 4-metil-umbeliferona que genera la fluorescencia azulada cuando se observa en la luz ultravioleta (UV) de onda larga (365-366nm). (Tsuchioka, Izumiyama, Endo, Wada, & Harada, 2019)

Esta prueba de sustrato enzimático se recomiendan para el análisis de agua potable, embotellada, de abastecimiento, residual, subterráneas, de lagunas, de embalses, de piscinas, de playa y para la elaboración de productos farmacéuticos y alimenticios.

1. MARCO TEORICO

El marco teórico que se fundamenta a continuación permite conocer los conceptos básicos respecto a los factores e indicadores de contaminación microbiológicos del agua y como estos pueden ser detectados por medio de la técnica sustrato definido colilert utilizada en el área de microbiología del la Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca (CAR).

Colombia posee grandes afluentes de aguas naturales que son vitales para el consumo doméstico, industrial, agrícola, preservación de flora y fauna, entre otros. La Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR) realiza el seguimiento al recurso hídrico en su jurisdicción sobre las diez cuencas hidrográficas correspondientes a los ríos Bogotá, Sumapaz, Seco y otros afluentes directos al Magdalena, Alto Suárez, Medio y Bajo Suárez, Carare, Negro, Guayuriba, Garagoa y Guavio, a través del monitoreo y análisis de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos (franco & Clavijo, 2018). Adicionalmente, presta el servicio a cualquier usuario externo que tenga un vertimiento o desee realizar un análisis de una muestra de agua.

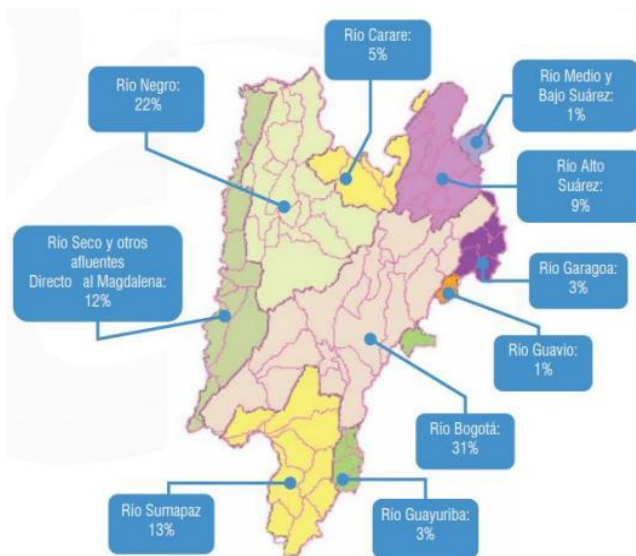


Fig 1. Mapa General Cuencas de Segundo Orden de la jurisdicción CAR.

Fuente: (franco & Clavijo, 2018)

1.1 Calidad del agua

La calidad del recurso hídrico se define a través de la composición química y características físicas y biológicas, que ha adquirido mediante los diferentes procesos naturales y antropogénicos (Larrea, Rojas, & Romeu, 2013). Entre los contaminantes naturales del agua se encuentran los parásitos, virus, bacterias y otras formas de vida, sustancias orgánicas solubles, sólidos orgánicos e inorgánicos y especies minerales disueltas (Larrea, Rojas, & Romeu, 2013). No obstante, un agente contaminante natural no siempre es considerado una sustancia dañina que pueda atacar la naturaleza, lo que hace que se considere una sustancia contaminante es su presencia en altas concentraciones (García, Sánchez, & al, 2001). La concentración de estos contaminantes naturales puede aumentar o aún ser reemplazados por otras sustancias resultado de actividades industriales, agrícolas, ganaderas, minerales, domésticas, entre otros. Es por esto, que para preservar y asegurar la calidad del agua en los sistemas de abastecimiento, se recomienda realizar un seguimiento, control y monitoreo constante, con el fin de garantizar los parámetros y normas establecidas para sus diferentes usos (Larrea, Rojas, & Romeu, 2013).

1.2 Microorganismo indicador de la calidad del agua

Los microorganismos indicadores son todos aquellos que nos informan que la muestra de agua estuvo expuesta a medios de contaminación por la llegada de microorganismos patógenos. Estos microorganismos deben presentar ciertos requisitos para que sean considerados indicadores de contaminación: encontrarse en heces humanas o animales en altas cantidades, no multiplicarse en el agua y ser descubiertos por métodos sencillos, asimismo, su susceptibilidad de eliminación y persistencia debe ser parecida a la de los microorganismos patógenos (Halaby, Ricaurte, Rodríguez, & Estupiñán, 2017). Las principales bacterias que se utilizan como indicadores de la

calidad del agua (cruda, residual, tratada) son las bacterias del grupo coliforme, ya que estas son más resistentes a procesos de eliminación que las bacterias patógenas intestinales. Los coliformes son empleados para conocer la calidad sanitaria del agua y su presencia indica contaminación fecal (Vinueza, 2015).

1.3 Coliformes totales

Son bacterias Gram negativas de forma alargada, poseen metabolismo respiratorio y fermentativo de lactosa con producción de ácido y gas (CO₂) a una temperatura de 35 °C en un tiempo de 24 horas. Se clasifican por su capacidad de desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, adicionalmente son oxidasa negativa que no forman esporas y presentan actividad enzimática de la β-galactosidasa. Son indicadoras de contaminación microbiológica del agua para consumo humano. La unidad de medición es ([Número Más Probable] NPM / l) (Bartram & Pedley, 1996)

1.4 *Escherichia coli*

Es un bacilo grueso de 1.5 por 4μ, la mayoría de las especies son móviles porque tienen flagelos peritricos típicos de las enterobacterias (Guido, 2015). Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, poseen metabolismo respiratorio y fermentativo, forman parte de la microbiota normal del intestino del ser humano y animales de sangre caliente (Vinueza, 2015). Se considera un microorganismo indicador de contaminación de origen fecal, habitualmente las cepas de *Escherichia coli* que colonizan el tracto gastrointestinal son comensales, no obstante, dentro de esta especie se encuentran bacterias patógenas causales de numerosas enfermedades.

Dentro de los *Escherichia coli* patógenos se incluyen: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), y la más virulenta de todas las *E. coli* enterohemorrágicas, también llamada *E. coli* verocitotóxica (EHEC o VCEC) (Bellido & Arnedo, 2011). La vía de eliminación de estos microorganismos es a través de las heces, y la ruta de transmisión es “fecal-oral”. Los alimentos y agua contaminada son las formas más comunes de ser expuestos a *E. coli* (Rock & Rivera, 2014).

1.5 Análisis microbiológico del agua

El análisis microbiológico se realiza con el fin de evaluar la presencia o ausencia, cantidad y tipo de microorganismos que se encuentran presentes en una muestra de agua, ya sea para uso potable, doméstico, etc. En cuanto a los indicadores de microorganismos, se recomienda que ninguna muestra de agua exceda el contenido de *Escherichia coli* en 100 cm³ independientemente del análisis utilizado. Para realizar un análisis más completo en cuanto a la calidad del agua es importante realizar una prueba complementaria para la determinación de microorganismos mesófilos, cuyo valor no exceda de 100 UFC / 100 cm³ (Vinueza, 2015).

Técnicas utilizadas	Coliformes Totales	Escherichia coli
Filtración por membrana	0 UFC/100 cm ³	0 UFC/100 cm ³
Enzima sustrato	< de 1 microorganismo en 100 cm ³	< de 1 microorganismo en 100 cm ³
Sustrato definido	0 microorganismos en 100 cm ³	0 microorganismos en 100 cm ³
Presencia – Ausencia	Ausencia en 100 cm ³	Ausencia en 100 cm ³

Tabla 1. Características microbiológicas del agua Potable. Fuente: (Vinueza, 2015)

1.5 Medios de cultivo de los microorganismos

Un medio de cultivo es un ambiente artificial que contiene una solución de nutrientes la cual permite el crecimiento microbiano, además debe presentar condiciones idóneas en cuanto al grado de humedad y presión de oxígeno, acidez o alcalinidad y temperatura, generalmente los medios de cultivo deben tener elementos necesarios como nitrógeno, carbono, fósforo, azufre, elementos trazas y vitaminas para una buena nutrición y síntesis biológica del microorganismo, adicional no debe estar infectada por microorganismos contaminantes.

Los medios de cultivo se clasifican de la siguiente manera:

- Medio selectivo: debido a su composición específica permite el crecimiento de solo un tipo de microorganismo, impidiendo el desarrollo de otros.
- No selectivos: son aquellos que se componen de nutrientes necesarios para el crecimiento de gran variedad de microorganismos.
- Medio enriquecido: es un medio no selectivo, su composición de nutrientes es de acuerdo al microorganismo que se va a cultivar, este puede contener sustancias de naturaleza inorgánica e orgánica o químicas puras.
- Medio Diferenciales: es un medio donde su composición contiene una sustancia química que al reaccionar enzimáticamente con algún producto del metabolismo produce una coloración característica del organismo, lo que permite identificar dos o más tipos de bacterias.
- Medios inhibidores: Beneficia el crecimiento de un solo tipo de bacteria y los restantes crecen poco o lentamente. (Vinueza, 2015)

1.7 Prueba enzima sustrato definido Colilert

Esta prueba se encuentra patentada por IDEXX, utilizan sustratos cromogénicos y fluorogénicos hidrolizables para detectar simultáneamente enzimas producidas por coliformes totales y *Escherichia coli* en un periodo de 24 horas (Vinueza, 2015). Este método emplea nutrientes indicadores que hacen que los microorganismos objetivos que estén presentes en la muestra, produzcan un cambio de color en el medio de cultivo.

Colilert es un método enzimático con base en sales y sustratos con nitrógeno y carbono específicos, para coliformes totales y *Escherichia coli*, cuenta con dos nutrientes indicadores, ONGP y MUG, que son las principales fuentes de carbono y pueden ser metabolizados por la enzima coliforme β -galactosidasa y la enzima β -glucuronidasa de *Escherichia coli* (Wastewater, 2017).

La enzima β -galactosidasa presente en todas las bacterias coliformes, reduce el orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), compuesto capaz de atravesar la pared celular y descomponerlo en galactosa y ortonitrofenil que al liberarse en medio alcalino pasa de un estado incoloro a amarillo (Wastewater, 2017).

En el caso de *Escherichia coli*, el sustrato fluorogénico 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) se utiliza para detectar la enzima β -glucuronidasa, que es producida por la mayoría de las cepas de *Escherichia coli*. La enzima β -glucuronidasa hidroliza el sustrato fluorogénico que produce fluorescencia azulada cuando se observa bajo luz ultravioleta (UV) de onda larga (365-366 nm) (Hakalehto, Heitto, & Heittoc, 2013).

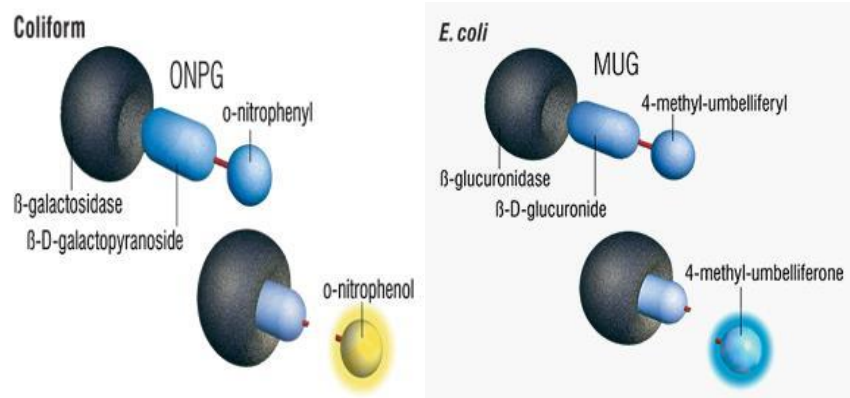


Fig 2. Fundamento bioquímico del reactivo colilert, tanto para coliformes totales como *Escherichia coli*. Fuente: (IDEXX, 2012)

El ensayo Colilert contiene sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, sales minerales y sulfito de sodio para ayudar a recuperar los coliformes, así mismo inhibe selectivamente el crecimiento de las bacterias no-coliformes mediante la acción de detergentes y antibióticos (INS, 2017).

Esta técnica está diseñada específicamente para cuantificar las bacterias por el método del número más probable (NMP), la cual se basa en las leyes de probabilidades y se utiliza para obtener una estimación del número de bacterias en una muestra. Adicionalmente, la metodología Colilert permite procesar simultáneamente un volumen importante de muestras, por el reducido espacio que se requiere y por la minimización de materiales y reactivos empleados en comparación con otras metodologías (Arboleda, Arismendi, & Sepúlveda, 2018). Este método se recomienda para el análisis microbiológico en muestras de agua ya sea potable, no tratadas, residuales, de consumo humano, de río, ect.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Apoyar el procedimiento en la determinación de coliformes totales y Escherichia Coli en muestras de agua superficial, residual, subterránea y potable, mediante la técnica de sustrato definido Colilert y el método número más probable (NMP).

2.2 Objetivos específicos

Determinar la calidad del agua de las muestras por medio de la técnica de sustrato definido Colilert y el método número más probable (NMP).

Apoyar los procedimientos realizados en el área de microbiología de la Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca CAR.

Fortalecer los conceptos teórico- prácticos adquiridos durante la formación académica universitaria mediante el desarrollo de la pasantía.

3. METODOLOGIA

Durante el desarrollo de la práctica se apoya el proceso de análisis de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua superficial, subterránea, residual y potable por la técnica de sustrato definido colilert y método número más probable (NMP). La recolección de las muestras está a cargo del área de muestreo, quienes posterior las llevan a las instalaciones de la Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca CAR.

3.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

Retirar las muestras de la nevera de microbiología y dejarlas aclimatar por una hora aproximadamente.

3.2 SIEMBRA.

Realizar diluciones (Tabla 1) de la muestra con agua destilada estéril si es necesario. A la última dilución adicionar un vial de sustrato colilert y agitar vigorosamente. Tomar un sobre Quanti-tray 2000, separar un poco el recubrimiento halando la pestaña de la parte superior y verter en el sobre todo el contenido del frasco de dilución que contiene el sustrato y la muestra.

La dilución inicial SIEMPRE es 10-1: 10 ml de muestra original en 90 ml de agua	
Diluciones seguidas	Diluciones saltadas
10 ⁻² 10 ml de 10 ⁻¹ en 90 ml de agua	10 ⁻³ 1 ml de 10 ⁻¹ en 99 ml de agua
10 ⁻³ 10 ml de 10 ⁻² en 90 ml de agua	10 ⁻⁵ 1 ml de 10 ⁻³ en 99 ml de agua
10 ⁻⁴ 10 ml de 10 ⁻³ en 90 ml de agua	10 ⁻⁷ 1 ml de 10 ⁻⁵ en 99 ml de agua
10 ⁻³ 10 ml de 10 ⁻⁴ en 90 ml de agua	10 ⁻⁹ 1 ml de 10 ⁻⁷ en 99 ml de agua
10 ⁻⁶ 10 ml de 10 ⁻⁵ en 90 ml de agua	10 ⁻¹¹ 1 ml de 10 ⁻⁹ en 99 ml de agua

Tabla 1. Diluciones en el análisis de muestras. Fuente: (Wastewater, 2017).

3.3 SELLADO.

Encender previamente la selladora Quanti-tray y dejarla calentar hasta que la luz verde se encienda. Colocar el sobre Quanti-tray que contiene la muestra en la plantilla de caucho y pasarlo a través de la selladora, ésta distribuye la muestra homogéneamente en todas las celdas, y sella el sobre automáticamente.

3.4 INCUBACION.

Incubar los sobres a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas en la incubadora.

3.5 LECTURA

3.5.1 Coliformes totales

➤ Después de las 24 ± 2 horas de incubación examinar las celdas de los sobres para determinar el cambio de color. Las celdas que presentan color amarillo son positivas para Coliformes Totales y las que no cambian de color o coloración muy tenue, son negativas.

➤ Si el análisis realizado es de aguas residuales, superficiales, limpias, subterráneas, de embalses o de lagunas, contar el número de celdas amarillas grandes y pequeñas. Y por medio de la tabla de NMP Quanti- tray 2000 informe NMP de Coliformes Totales/100ml de muestra teniendo en cuenta el factor de dilución realizado.

➤ Si el análisis es de agua potable cuenta el número de celdas amarillas y por medio de la tabla NMP Quanti-tray 200 informar igual que en el caso anterior. Si la respuesta cromogénica es dudosa después del tiempo de incubación se debe incubar por cuatro horas adicionales bajo la misma temperatura.

3.5.2 *Escherichia coli*.

➤ Exponer el sobre evaluado para Coliformes Totales bajo luz UV de longitud de onda larga (365 nm), si observa celdas fluorescentes son positivas para *E. coli*. Para informar NMP realizar el procedimiento igual al descrito para Coliformes totales. Reportar como NMP de *E. coli* / 100ml de muestra.

Metodología tomada de Standard Methods (Wastewater, 2017).

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PASANTÍA

4.1 Cronograma de actividades.

La Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca (CAR) establece el cronograma de actividades que consiste en un total de quince (15) semanas, en las cuales se trabajó semana a semana cada componente.

ACTIVIDADES	CRONOGRAMA DE EJECUCION
-Revisión de información existente. - Capacitación manual de calidad y seguridad en el laboratorio.	Semana 1 28-08-2019 al 30-08-2019
-Apoyo en el diligenciamiento de base de datos para el parámetro matriz agua. - Capacitación para la verificación de material volumétrico.	Semana 2 02-09-2019 al 06-09-2019
- Entrenamiento en el análisis de coliformes totales y Escherichia coli mediante la técnica de sustrato definido colilert por el método número más probable (NMP).	Semana 3 09-13-2019 al 06-09-2019
- Capacitación en el análisis de condiciones del área. -Capacitación en la preparación de reactivos para el análisis de Giardia y huevos de Helminto.	Semana 4 16-09-2019 al 20-09-2019

<ul style="list-style-type: none"> - Apoyo en la determinación de sólidos suspendidos totales por el método de secado a 103 – 105 °C. 	<p style="text-align: center;">Semana 5 23-09–2019 al 27-09–2019</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Realización de análisis en la determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> mediante la técnica sustrato definido colilert por el método NMP. <li style="padding-left: 40px;">- Preparación de reactivos - Verificación de material volumétrico: micropipetas y macropipetas. - Realización de análisis de las condiciones del área (superficial y ambiental). 	<p style="text-align: center;">Semana 6 a la semana 15 01-10–2019 al 29-11-2019</p>

Tabla2. Cronograma de actividades. Elaboración propia.

4.2 Desarrollo de las actividades realizadas.

➤ La función principal durante el desarrollo de la pasantía fue el apoyo en el procedimiento de análisis para la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua subterráneas, superficiales, residuales y potables mediante la técnica de sustrato definido colilert y el método número más probable (NMP). La cantidad de muestras analizadas al día fueron aproximadamente 4. Cabe aclarar, que la procedencia de las muestras es información confidencial de la CAR, igualmente los resultados obtenidos de dichos análisis. La metodología empleada ya fue descrita en el documento.

➤ Se realizó la preparación del reactivo tiosulfato de sodio al 10% para frascos de muestreo, caldo nutritivo no selectivo (bacterias) y medio Agar PDA (hongos) para el análisis de condiciones del área, Buffer fosfato (PBS) para el análisis de Giardia y tween 80 para el análisis de huevos de helminto.

➤ Se hizo la verificación volumétrica de micropipetas y macropipetas con el fin de garantizar la precisión y exactitud en los procedimientos analíticos llevados a cabo en el área de microbiología.

Para la verificación se realizó el siguiente Procedimiento:

- Se determinó el volumen del agua (se recomienda un 10% menos del valor nominal como volumen máximo y un 10% más del volumen mínimo).
- Se usó un erlenmeyer de 25 ml con boca angosta, limpio y seco, posterior Se pesó en la balanza analítica y se anotó el peso con 4 cifras decimales.
- Se dispense con la micropipeta y macropipeta el volumen fijado de agua dentro del recipiente pesado.
- Se pesó el erlenmeyer con agua.
- Se repitió el procedimiento 8 veces.
- Se midió la temperatura del agua con un termómetro calibrado.
- Se determinó la densidad del agua de acuerdo a la temperatura.
- Se calculó el volumen del agua vertido por la micropipeta y macropipeta según la fórmula:

$$V = \frac{PH_2O}{\rho H_2O}$$

Dónde:

V = Volumen.

P_{H_2O} = Peso del agua.

ρ_{H_2O} = Densidad del agua a la temperatura medida.

- Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.
- Por último, se comparó con los límites de tolerancia dados por el fabricante

➤ Se apoyó el procedimiento en el análisis para la determinación de sólidos suspendidos totales por el método de secado a 103 – 105 °C. Este método se realiza con el fin de determinar la calidad del agua por medio del contenido de materia suspendida en muestras de tipo residual, superficial, subterránea y potable. Para la realización del análisis la muestra se pasó a través de un filtro de vidrio de 25 μm de diámetro previamente pesado, el residuo obtenido se secó en la estufa a una temperatura de 103 a 105 °C para conseguir el peso estándar, el incremento del peso del filtro represento los sólidos suspendidos totales. Estos solidos están constituidos por sólidos sedimentables, sólidos en suspensión y sólidos coloidales.

➤ Se realizó el control de calidad del área de microbiología con el fin de evaluar la cantidad de microorganismos presentes en el ambiente y superficies. Para determinar el control microbiológico del aire se utilizó el método de sedimentación en placas de agar, este método nos permitió conocer la cantidad de hongos y bacterias presente en el ambiente de trabajo. Las áreas analizadas fueron las siguientes: área de muestras crudas, área de muestras

tratadas, área general, área de cuarto oscuro, cabina de muestras crudas y cabina de muestras tratadas.

El procedimiento que se empleó fue el siguiente:

- Se preparó cajas Petri con un medio de cultivo nutritivo no selectivo (Agar Plate Count (APC), Agar Saboureaud, Agar Nutritivo).
- Se ubicaron las cajas Petri abiertas durante 1 hora en las áreas determinadas.
- Se incubó la placa a 35 ± 2 ° C en posición invertida durante 24 horas.
- Se contó el número de colonias en la placa (este número se expresa como ufc / placa / minuto (unidades formadoras de colonias)).

Para la determinación del control microbiológico de las superficies se utilizó la técnica del Hisopo húmedo en placa. Este análisis nos permitió conocer las condiciones de limpieza y desinfección de las superficies del área de trabajo. Las áreas de análisis fueron las siguientes: mesón del área de muestras crudas, mesón del área de muestras tratadas, mesón del área general, mesón del área del cuarto oscuro, mesón de la cabina de muestras crudas y mesón de la cabina de muestras tratadas.

Para este análisis se realizó el siguiente procedimiento:

- Se preparó cajas Petri con un medio de cultivo nutritivo no selectivo (Agar Plate Count (APC), Agar Saboureaud, Agar Nutritivo) para bacterias y medio Agar PDA o Saboureaud para hongos.
- Se delimitó la superficie que se iba analizar.
- Se humedeció el hisopo estéril en una solución de 10 ml de agua peptonada al

0.7% y se pasó varias veces sobre la superficie delimitada a evaluar, por lo menos dos direcciones distintas, rotándolo suavemente.

- Se introdujo de nuevo el hisopo en el tubo con solución salina estéril y se dejó durante 15 minutos de manera que los microorganismos se liberaran del algodón al agua estéril.
- Se sembró en la placa.
- Se incubó durante 24 horas a 35 ± 2 ° C para de bacterias, 5 días para mohos y 48 horas para levaduras a una temperatura de 25 ± 3 ° C.

5. RESULTADOS

Durante el desarrollo de la pasantía se cumplió satisfactoriamente las funciones asignadas por el área de microbiología de la Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca (CAR), apoyando los diferentes parámetros y análisis de la matriz agua. Lo anterior permitió llevar a la práctica la mayor parte de los conceptos teóricos adquiridos durante la formación académica universitaria y a la vez adquirir nuevos conocimientos y habilidades en los procedimientos de laboratorio.



Fig 4. Registro fotográfico en el desarrollo de la metodología de la técnica colilert en las instalaciones de Dirección de Laboratorio e Innovación Ambiental de la Corporación Autónoma regional de Cundinamarca (CAR)

La técnica sustrato definido colilert empleada en el análisis de muestras de agua superficial, residual, subterránea y potable por el área de microbiología es altamente confiable, ya que es una técnica que brinda precisión y exactitud en la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli*. Al ser un procedimiento metodológico rápido y sencillo permite el análisis de un alto número de muestras y la obtención de resultados en un corto periodo de tiempo; generalmente la presencia en concentración elevada de estas bacterias indica contaminación en las muestras de agua.

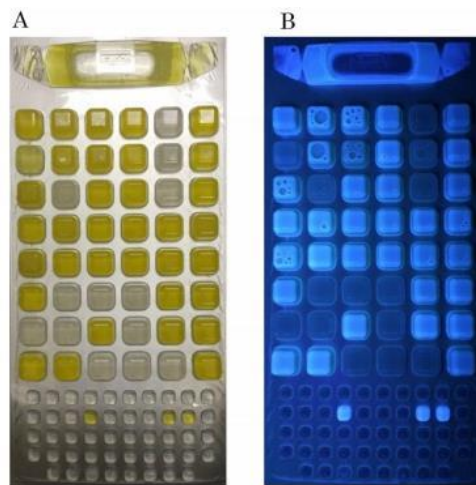


Fig 4. Presencia de Coliformes totales y *E. coli*.(Tsuchioka, Izumiyama, Endo, Wada, & iHarada, 2019)

En la figura 4 se evidencia los resultados obtenidos después de implementar el método colilert, tras la incubación de las muestras, la imagen A indica la presencia positiva de coliformes totales a partir de los pozos color amarillo y la imagen B indica la presencia de *E. colia* través de los pozos de coloración azul fluorescente; para la lectura de *E. coli* es necesario exponer la muestra a la luz ultravioleta de onda larga (365-366nm).

Durante el desarrollo de la pasantía se analizaron aproximadamente 20 muestras a la semana, donde apoye el procedimiento en la determinación de coliformes totales y *Eschericha*

coli en muestras de agua entregadas al laboratorio de la CAR. El reporte de resultados obtenidos no es posible informarlo, ya que este es un dato confidencial por la entidad, al igual que la procedencia de las muestras a analizar.

Verificación volumétrica

Es importante realizar la verificación volumétrica del material de laboratorio, ya que su buen funcionamiento permite la precisión y exactitud de los procedimientos analíticos en las muestras a estudiar. Se realizó la verificación volumétrica de las micropipetas y macropipetas del área de microbiología, donde se encontró que no todas cumplían con el rango de calibración reportada por el fabricante, 2 micropipetas excedían el valor asociado al rango de error, siendo mayor a 0.2. Por este motivo, se suspendió el uso de este material ya que el mal funcionamiento no permite la precisión y exactitud en los procedimientos analíticos desarrollados en el laboratorio. Para realizar la verificación volumétrica es necesario determinar correctamente el volumen del agua destilada y la densidad de la misma de acuerdo a la temperatura.

Calidad de las condiciones de área

Los métodos de hisopo húmedo en placa y sedimentación en placas de agar empleados para el análisis de control microbiológico en las áreas de superficie y ambiente, permitieron detectar hongos y bacterias presentes en el laboratorio de microbiología, al realizar la lectura a partir de la cuantificación de las colonias en las cajas Petri y comparadas con los resultados obtenidos en análisis anteriores se evidenció que las condiciones del área se encontraban entre los límites permitidos, ya que no excedieron el valor de < 20 para bacterias y < 30 para hongos.

CONCLUSIONES

- La implementación del método colilert para determinación de coliformes totales y *E. coli* es altamente confiable, ya que las referencias bibliográficas exponen que es un método de alta precisión y costo efectivo, además la facilidad en el procedimiento metodológico permite el análisis de un amplio número muestras.
- Los coliformes totales y *E. coli* son indicadores efectivos para la determinación de la calidad del agua, debido a su fácil presencia e identificación en la técnica, son considerados buenos indicadores ya que se encuentran en grandes cantidades en heces humanas o animales de sangre caliente y generalmente están asociados a microorganismos patógenos.
- El desarrollo de la pasantía permitió adquirir destrezas en los diferentes procedimientos analíticos en el laboratorio, así, contribuir en la formación profesional frente a la adquisición de conocimientos que son complementarios a los conceptos aprendidos durante la formación académica universitaria, y laboral ya que los conocimientos son aplicados de manera práctica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arboleda, C., Arismendi, L., & Sepúlveda, M. (2018). VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA COLILERT PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli* EN UNA MATRIZ DE AGUA NATURAL. *POLITECNICA*.
- Bartram, J., & Pedley, S. (1996). MICROBIOLOGICAL ANALYSES . En J. Bartram, & S. Pedley, *Water Quality Monitoring - A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater*.
- Bellido, J., & Arnedo, A. (2011). Epidemiology of Infectious Diarrhea. En J. Bellido, & A. Arnedo, *Encyclopedia of Environmental Health*.
- franco, N., & Clavijo, C. (2018). *Boletín calidad hidráulica*. Bogotá: CAR.
- Garcia, M., Sanchez, D., & al, e. (2001). El agua. En IDEAM, *El medio ambiente en colombia* (págs. 115 -189). bogota: IDEAM.
- Guido, C. (2015). DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES Y *E. Coli* EN AGUA DE CONSUMO HUMANO DEL CENTRO POBLADO DE TRAPICHE- ANANEA - PUNO. *UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA*.
- Hakalehto, E., Heitto, A., & Heittoc, L. (2013). Fast coliform detection in portable microbe enrichment unit (PMEU) with Colilert® medium and bubbling. *Pathophysiology*, 257-262.

Halaby, N., Ricaurte, K., Rodriguez, J., & Estupiñan, S. (2017). Evaluación de la calidad bacteriológica de las aguas naturales de algunos sitios de Colombia. Revisión de la literatura. *BIOCIENCIAS*.

IDEXX. (2012). *IDEEX*. Obtenido de <https://www.idexx.es/es/water/water-products-services/colilert/>

INS. (2017). *Determinación de coliformes totales y e.coli en agua por sustrato definido*. Bogota.

Larrea J; Rojas M; Alvarez, B; Rojas, N; Perez, M. (2012). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *CENIC Ciencias Biológicas*, 25-26.

Larrea, J., Rojas, M., & Romeu, B. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *CENIC*, 44(3).

Rios, S., Cadavid, R., & Gutierrez, L. (2017). Pathogens and Microbiological Indicators of the Quality of Water for Human Consumption. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 236-247.

Rock, C., & Rivera, B. (2014). La Calidad del Agua, E. coli y su Salud. *COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES*.

Tsuchioka, H., Izumiyama, S., Endo, T., Wada, T., & iHarada, H. (2019). Hydroxyapatite powder cake filtration reduces false positives associated with halophilic bacteria when evaluating *Escherichia coli* in seawater using Colilert-18. *Journal of Microbiological Methods*, 69-74.

Vinueza, S. (2015). *COMPARACIÓN ENTRE LAS PRUEBAS ENZIMAS SUSTRATOS DEFINIDO "COLILET Y TUBOS MÚTIPLAS FLUROCULT PARA EL DIAGNOSTICO DE escherchia coli y coliformes totales" EN AGUAS TRATADAS. QUITO.*

Wastewater, S. M. (2017). *9223 ENZYME SUBSTRATE COLIFORM TES*

