



Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1205:2013
Primera revisión

**AGUA. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE
BACTERIAS EN PLACAS**

Primera edición

WATER. DETERMINATION OF TOTAL NUMBER OF BACTERIA IN PLATES

First edition

DESCRIPTORES: Protección ambiental y sanitaria. Seguridad, agua potable, determinación de bacterias en placa
AL 01.06-327
CDU: 644.61
ICS: 13.060.20

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	AGUA DETERMINACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE BACTERIAS EN PLACAS	NTE INEN 1205:2013 Primera revisión 2013-09
<p>0. INTRODUCCIÓN</p> <p>0.1 El procedimiento del contaje del número total de bacterias en placas provee un método normalizado para la determinación de la densidad de bacterias heterotróficas aerobias y anaerobias facultativas en el agua. Este es un método aproximado, debido a que las bacterias se presentan en forma: unitaria, en pares, cadenas, racimos, o en paquetes; además, el medio o el conjunto de condiciones físicas y químicas no pueden satisfacer los requerimientos de todas las bacterias en una muestra de agua, consecuentemente, el número de colonias que se desarrollan por cm³ puede ser sustancialmente más bajo que el número real de bacterias viables presentes. Además, algunas bacterias, a causa de daños, requerimiento de nutrientes especiales, reacción con el oxígeno, temperaturas desfavorables de incubación u otros factores, son incapaces de formar colonias visibles bajo las condiciones empleadas.</p> <p>0.2 Para facilitar la toma de datos reales para el control de calidad de agua, especialmente con fines de comparación y propósitos legales, es esencial contar con método normalizado para la “determinación del número total de bacterias en placa”.</p> <p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece el número de recuento en placa para determinar la densidad de las bacterias heterotróficas y anaerobias facultativas presentes en el agua.</p> <p style="text-align: center;">2. DEFINICIONES</p> <p>2.1 Para efectos de esta norma, se adopta la siguiente definición:</p> <p>2.1.1 <i>Área de trabajo.</i> Mesa nivelada de superficie amplia en un cuarto limpio, bien iluminado y bien ventilado, libre de polvo y corrientes de aire. La superficie de la mesa no debe ser porosa y será desinfectada antes de cada análisis. Esta área de trabajo debe ser exclusiva para los análisis microbiológicos del agua.</p> <p style="text-align: center;">3. DISPOSICIONES GENERALES</p> <p>3.1 El muestreo para el examen bacteriológico deberá realizarse de acuerdo a la norma INEN 1105.</p> <p>3.2 Después de preparada la dilución no deben transcurrir más de 30 minutos a la temperatura ambiente; pues, puede ocurrir la multiplicación o la muerte de microorganismo.</p> <p>3.3 Realizar la siembra tan pronto como sea posible para minimizar los cambios en la población microbiana. El lapso máximo recomendado entre la recolección de la muestra y la siembra de muestras no refrigeradas es de 6 h; cuando la muestra no puede ser sembrada en 6 horas, mantenerla en refrigeración a una temperatura de 10°C; en este caso el tiempo de almacenamiento no debe exceder las 30 horas.</p> <p>3.4 Muestras de agua embotellada obtenida en ventas al detal, pueden mantenerse o transportarse sin refrigeración a una temperatura que no exceda de 20 a 25°C. Muestras frescas de agua embotellada (menos de 24 horas) deben ser sembradas a las 6 horas de recolección si no son refrigeradas, y en 30 horas si se han mantenido refrigeradas.</p> <p>3.5 Todo el material que va a utilizarse en el análisis microbiológico, debe esterilizarse.</p> <p>3.6 Normalmente no es conveniente sembrar más de 1 cm³ de agua en una placa.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Protección ambiental y sanitaria. Seguridad, agua potable, determinación de bacterias en placa.</p>		

4. MÉTODO DE ENSAYO

4.1 Equipos

4.1.1 Incubadoras. Deben mantener una temperatura constante y uniforme en todo momento y en todas sus partes.

4.1.2 Equipo de esterilización: Uno de los siguientes:

4.1.2.1 Estufa de esterilización de aire caliente

4.1.2.2 Autoclave

4.1.2.3 Esterilizador a gas

4.1.3 Contador de colonias

4.1.4 Medidor de pH

4.1.5 Balanzas

4.1.5.1 Con una sensibilidad de 0,1 g con una carga de 150 g

4.1.5.2 Balanza analítica con una sensibilidad de 0,1 mg con una carga de 10 g

4.1.6 Refrigerador. Para guardar las muestras entre 0 a 4°C hasta su análisis o para almacenar los medios preparados.

4.1.7 Baño María. Con temperatura controlada termostáticamente.

4.2 Reactivos y materiales

4.2.1 Medios de dilución

4.2.1.1 Agua para uso en bacteriología: el agua debe ser destilada o desmineralizada, libre de trazas de metales disueltos y compuestos inhibidores o bactericidas. Los análisis para el control de calidad del agua deben realizarse según en tabla 1.

TABLA 1. Parámetros para el control de calidad del agua para análisis microbiológico

ANÁLISIS	FRECUENCIA	LÍMITE
Químicos:		
Conductividad	Continuamente con cada uso	5 µ mohos/cm a 25°C
pH	Con cada uso	5,5 – 7,5
Carbón orgánico total	Mensualmente	
Metales pesados (Cci, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn)	Mensualmente	0,05 mg/l
Metales pesados total	Mensualmente	1 mg/l
Amoniaco/nitrógeno orgánico	Mensualmente	0,1 mg/l
Cloro libre	Con cada análisis	0,1 mg/l
Biológicos:		
Número total de bacterias en placa		
Agua destilada fresca	Mensualmente	1000 colonias/ml
Agua desionizada o almacenada	Mensualmente	10000 colonias/ml

4.2.1.2 Agua amortiguada para dilución.

a) Para preparar la solución madre amortiguadora de fosfato se disuelven 34,0 g de fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4 , en 500 cm^3 de agua, ajustar a pH 7,2 con NaOH 1N, y diluir a 1000 cm^3 con agua destilada.

(Continúa)

- b) Añadir, 1,25 cm³ de solución madre amortiguadora de fosfato y 5 cm³ de solución de cloruro de magnesio (38 g Mg Cl₂/l de agua destilada) a 1 litro de agua destilada.
- c) El agua amortiguadora se distribuye en porciones que permitan obtener diluciones de 1:100 ó 1:10 respectivamente.

4.2.1.3 Agua peptonada de dilución:

- a) Preparar una solución de peptona al 10% en agua destilada.
- b) Diluir un volumen determinado para obtener una solución final de 0,1%.
- c) El pH final debe ser 6,8.
- d) El agua peptonada se distribuye en porciones que permitan obtener volúmenes 99 ± 2 cm³ ó $9 \pm 0,2$ cm³ después de 15 minutos en esterilización en el autoclave.

4.2.2 Medios de cultivo

4.2.2.1 Agar nutritivo. Preparación (ver en la NTE INEN 1529-1)

4.2.2.2 Agar con extracto de carne, triptona y glucosa. Preparación (ver en la NTE INEN 1529-1)

4.2.2.3 Agar para enumeración de colonias (agar con triptona, glucosa y extracto de levadura).

4.2.3 Materiales

4.2.3.1 Utensilios para preparación de medios. Se deben utilizar utensilios de vidrio pyrex y de materiales anticorrosivos, como acero inoxidable.

4.2.3.2 Pipetas. Las pipetas pueden ser de cualquier tamaño, que entreguen con exactitud y rapidez la cantidad requerida. El error de fabricación dado por el fabricante no debe ser mayor al 2,5%.

4.2.3.3 Portapipetas. Cajas de aluminio o acero inoxidable; sino se dispone de ellas se puede utilizar papel de empaque o papel aluminio.

4.2.3.4 Frascos o tubos de dilución. Deben utilizarse frascos o tubos de material resistente, que puedan cerrarse con tapones de algodón o con tapa osca con empaques que no produzcan compuestos tóxicos o bactericidas durante la esterilización.

4.2.3.5 Cajas Petri

4.2.3.6 Frascos de muestreo. Con capacidad para contener el volumen de agua necesario para el análisis y de material resistente a la acción disolvente del agua.

4.3 Procedimiento

4.3.1 Preparación de la muestra

4.3.1.1 Preparar cada dilución por duplicado. Marcar cada placa con el número de muestra, dilución, fecha y cualquier otra información necesaria antes de la siembra.

4.3.1.2 Mezclar perfectamente la muestra, haciendo movimientos de arriba hacia abajo. Se puede usar opcionalmente un agitador mecánico para agitar las diluciones.

4.3.2 Dilución de muestras

4.3.2.1 Para muchas muestras de agua, se obtienen placas convenientes para el recuento, si se siembra 1 cm³ ó 0,1 cm³ de muestra sin dilución.

(Continua)

4.3.2.2 Medición de los volúmenes de muestra. Usar una pipeta estéril para la transferencia inicial y siguiente a partir de cada recipiente. Si la pipeta se contamina antes de que la transferencia se complete hay que reemplazar por otra estéril. Usar una pipeta diferente para cada dilución. No se deben preparar las diluciones y las placas a la luz solar directa. Debe evitarse la contaminación de las pipetas para lo cual hay que tomarse precauciones al sacarlas del porta pipetas, no arrastrar la punta sobre los extremos expuestos de las pipetas o a través de los bordes o cuellos de las botellas de dilución. No debe introducirse la pipeta más de 2,5 cm bajo la superficie al extraer la muestra.

4.3.2.3 Medición de las diluciones. Cuando se mide una muestra de agua, colocar la pipeta en un ángulo aproximado a 45°, con la punta topando un lado del cuello de la botella de dilución. Levantar la tapa de la caja Petri hasta una altura suficiente para introducir la pipeta y transferir 1 cm³, a la caja Petri. Es recomendable usar las diluciones de las muestras para preparar volúmenes menores de 1cm³. En el análisis de agua de desecho o aguas turbias, es más conveniente preparar una dilución para medir 0,1 cm³ de inóculo. Preparar por lo menos por duplicado cada dilución de muestra. Después de depositar la porción de inóculo añadir el medio de cultivo.

4.3.3 Siembra en placa

4.3.3.1 Fusión del medio. Fundir el agar estéril solidificado en agua hirviendo o exponiéndolo al vapor en un recipiente parcialmente cerrado, pero evitar una exposición prolongada a altas temperaturas durante y después de fundido. No re esterilizar el medio. Descartar el agar fundido que contenga precipitado. La temperatura del medio para uso debe ser entre 44°C a 47°C. Para controlar la temperatura adecuada del medio utilizar un recipiente similar como testigo que contenga un termómetro y la misma cantidad de agua.

4.3.3.2 Adición del medio a las placas. Limitar el número de muestras de cada serie, de manera que el período no sea mayor a 20 minutos (preferible 10) entre la dilución de la primera muestra y la adición del medio en la última placa. Levantando la tapa de la caja Petri hasta una altura que permita la operación, adicionar en cada placa, por lo menos 10 a 12 cm³ de medio fundido y templado a 44 a 46°C. Adicionar el medio, evitando derramar por las paredes del recipiente o la parte interna de la tapa de la caja Petri. Luego de la adición del medio en la placa, mezclar perfectamente con la porción de muestra, evitando salpicar la mezcla por medio de movimientos rotatorios en direcciones opuestas. Dejar sobre la superficie nivelada para que el medio se solidifique (10 minutos). Colocar la placa invertida, dentro del incubador.

4.3.3.3 Control de la esterilidad. Comprobar la esterilidad del medio y de las aguas de dilución, usando placas de control en cada serie de muestras. Puede hacerse controles adicionales de la contaminación del aire en el laboratorio.

4.3.4 Incubación. Todas las muestras para el recuento total de bacterias, con excepción de aguas embotelladas. Deben ser incubadas a una temperatura de 35 ± 0,5°C por 24-48 ± 2 horas. Puesto que muchas bacterias encontrada en aguas embotelladas demuestran un prolongado período de adaptación para crecer en el agar con extracto de carne, triptona y glucosa, están bacterias no forman colonias que puedan ser contadas después de 48 horas de incubación, de tal forma que se requiere un período total de 72 horas para obtener el valor real.

4.3.5 Recuento de colonias. Después del período de incubación, contar las colonias en las placas seleccionadas. Si el recuento debe ser postergado temporalmente, guardar las placas a 5 – 10°C por un período no mayor de 24 horas, pero evitar que sea ésta una práctica de rutina. Para el recuento del número de colonias, usar un contador de colonias apropiado, que tenga un buen aumento e iluminación. Solo las placas que presentan entre 30 a 300 colonias deberían ser consideradas en el recuento, con excepción de aquellas que poseen menos de 30 colonias desarrolladas a partir de 1 cm³ de muestra.

4.3.6 Si no hay placas con 30 a 300 colonias y unas o más poseen más de 300, usar las placas que tengan máximo un recuento de 300 colonias. Cuando el número de colonias por placa exceda en mucho las 300 colonias, no se debe registrar el resultado como “demasiado numerosas para contar” (incontables), sino que hay que tener en cuenta los siguientes casos:

- a) Si hay menos de 10 colonias/cm², contar las colonias de 13 cuadros que sean representativos de la distribución; si es posible, seleccionar siete cuadros consecutivos horizontalmente y seis cuadros consecutivos en ángulo recto, cuidando de no contar un mismo cuadro más de una vez. Multiplicar el número de colonias, de los 13 cuadros por 5 para calcular el número de colonias estimado por placa, cuando el área de la placa es 65 cm².

- b) Si el número de colonias/cm², es mayor que 10, tomar 4 cuadros representativos y obtener el promedio del número de colonias/cm² y multiplicar por el factor apropiado, para obtener el factor estimado por placa.
- c) Si el número es mayor que 100 colonias/cm², registrar el resultado como mayor a 6500 veces mayor al recíproco de la dilución más alta sembrada.
- d) Si se encuentra que las colonias han invadido (confluentes) la placa seleccionada, contar las colonias en porciones representativas solo cuando:
 - d.1) Exista área con colonias bien aisladas
 - d.2) Si el área cubierta por la invasión, no excede la mitad de la placa.
- e) Cuando las colonias confluentes, deben ser contadas, registrar como una unidad los siguientes tipos:
 - e.1) La primera es una cadena de colonias que parece producida por la disgregación de un grupo de bacterias al mezclar el agar y la muestra. Contar cada cadena como una colonia simple, y no cada colonia individual de la cadena.
 - e.2) El segundo tipo, la invasión desarrollada como una película entre el agar y el fondo de la caja Petri;
 - e.3) El tercer tipo, forma una película de agua al borde o sobre la superficie del agar. Los tipos b y c se desarrollan a causa de una acumulación de humedad en el sitio en el cual se origina la invasión. Frecuentemente cubren más de la mitad de la placa o interfieren en la obtención de datos reales.

4.4 Cálculos

4.4.1 Para calcular el número total de bacterias viables en placa, multiplicar el promedio de las colonias por el recíproco de la dilución usada. Registrar el número de colonias contadas o estimadas en cada placa.

4.4.2 Cuando las colonias en placa sembradas por duplicado y/o diluciones consecutivas son contadas y los resultados promediados antes de su registro, redondear el número a 2 cifras significativas. Redondear el segundo dígito al número inmediato superior, solo cuando el tercer dígito es 5, 6, 7, 8 ó 9; usar ceros por cada dígito apto a la derecha del segundo dígito. Por ejemplo un recuento de 142, debe registrarse como 140 y un conteo de 155 como 160, mientras que un recuento de 35 es registrado como 35.

5. INFORME DE RESULTADOS

5.1 Cuando el número de bacterias desarrolladas por placa esté entre 30 y 300, reportar como recuento total de bacterias viables por cm³.

5.2 Si el recuento se ha hecho en placas que posee más de 300 colonias, reportar como un valor estimado por cm³.

5.3 Si las placas de todas las diluciones de cualquier muestra no tienen colonias, reportar el resultado como menor que una vez la correspondiente dilución más baja. Por ejemplo; si en la dilución 1:100 no se han desarrollado colonias, reportar el resultado como número total de bacterias viables estimado menor que 100/cm³.

5.4 Si las placas poseen demasiado crecimiento confluyente, reportar como recuento en placa confluyente.

5.5 Cuando el número de colonias son incontables por causa de diluciones erradas, goteo accidental y contaminación, o las placas de control indican contaminación del medio u otro material, repetir el análisis.

(Continúa)

APÉNDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1105 *Aguas. Muestreo para examen microbiológico.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma internacional. ISO 7218:2007. *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General rules for microbiological examinations.* Ginebra, 2007.

Norma ASTM D5465:2004. *Standard Practice for Determining Microbial Colony Counts from Waters Analyzed by Plating Methods.* Philadelphia, 2004

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 1205 Primera revisión	TÍTULO: AGUA. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE BACTERIAS EN PLACAS	Código: AL 01.06-327
--	--	---------------------------------------

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo 1985-07-05 Oficialización con el Carácter de Obligatoria por Acuerdo No. 554 de 1985-07-31 publicado en el Registro Oficial No. 263 de 1985-09-03 Fecha de iniciación del estudio: 2012-07-30
--	--

Fechas de consulta pública: 2012-12-03 a 2013-01-02

Subcomité Técnico de:

Fecha de iniciación:

Fecha de aprobación:

Integrantes del Subcomité:

NOMBRES:

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

Mediante compromiso presidencial N° 16364, el Instituto Ecuatoriano de Normalización – INEN, en vista de la necesidad urgente, resuelve actualizar el acervo normativo en base al estado del arte y con el objetivo de atender a los sectores priorizados así como a todos los sectores productivos del país.

Para la revisión de esta Norma Técnica se ha considerado el nivel jerárquico de la normalización, habiendo el INEN realizado un análisis que ha determinado su conveniente aplicación en el país.

La Norma en referencia ha sido sometida a consulta pública por un período de 30 días y por ser considerada EMERGENTE no ha ingresado a Subcomité Técnico.

Otros trámites: ♦⁴ Esta norma sin ningún cambio en su contenido fue DESREGULARIZADA, pasando de OBLIGATORIA a VOLUNTARIA, SEGÚN RESOLUCIÓN DEL Consejo Directivo de 1998-01-08 y oficializada mediante Acuerdo Ministerial No. 235 de 1998-05-04 publicado en el Registro Oficial No. 321 de 1998-05-20.

Esta NTE INEN 1205:2013 (Primera revisión), reemplaza a la NTE INEN 1205: 1985

La Subsecretaría de la Calidad del Ministerio de Industrias y Productividad aprobó este proyecto de norma

Oficializada como: Voluntaria
Registro Oficial No. 83 de 2013-09-18

Por Resolución No. 13285 de 2013-08-13

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: direccion@inen.gob.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gob.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gob.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gob.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inenlaboratorios@inen.gob.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gob.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gob.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gob.ec
URL: www.inen.gob.ec**