

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
3377:1998**

**EQUIPOS PURIFICADORES DE AGUA.
EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA**



PROLOGO

La presente norma fue elaborada de acuerdo a los lineamientos del Comité Técnico de Normalización **CT10 Productos Alimenticios**, por el Subcomité Técnico **SC3 Microbiología de Alimentos** y aprobada por **FONDONORMA** en la reunión del Consejo Superior No. **98-08** de fecha **09/09/1998**.

En la elaboración de esta norma participaron las siguientes entidades: Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (División de Higiene de los Alimentos); Universidad Simón Bolívar; INDECU; Tecnia Alimentos, C.A.; Distriozón; Industrias El Manantial, Purificadores Caracas.



NORMA VENEZOLANA.
EQUIPOS PURIFICADORES DE AGUA.
PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACION
MICROBIOLÓGICA

COVENIN
3377:1998

1 OBJETO

Esta Norma Venezolana establece el método de ensayo, para la evaluación microbiológica de la eficiencia de los equipos purificadores de agua mediante bujía, ozonización u otro sistema adecuado, aprobados por la autoridad sanitaria competente.

2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Venezolana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda norma está sujeta a revisión se recomienda, a aquéllos que realicen acuerdos en base a ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las normas citadas seguidamente.

COVENIN 1126-89. Alimentos. Identificación y preparación de las muestras para el análisis microbiológico.

COVENIN 2614-94. Agua potable. Toma de muestras.

COVENIN 902-87. Alimentos. Método para el recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri.

COVENIN 3047-93. Agua potable. Método de determinación del Número más Probable de bacterias coliformes.

COVENIN 2409-86 Agua. Método de Membrana Filtrante para el análisis Microbiológico

COVENIN 1431-82 Agua potable . Requisitos.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta Norma Venezolana se aplican las siguientes definiciones:

3.1 Primera etapa : Consiste en determinar la eficiencia del equipo bajo condiciones normales empleando el agua de una red o reservorio en la cual se toman las muestras M1 y M2.

3.1.1 Muestra M1: Es el agua de la red o reservorio.

3.1.2 Muestra M2: Es el agua tratada por la unidad del equipo purificador instalado, con un caudal establecido para el equipo.

3.2 Segunda etapa: Consiste en evaluar la capacidad del purificador de eliminar, retener o disminuir una población microbiana conocida y cuantificable. En esta etapa se prepara la muestra M3 y se recolecta la muestra M4.

Esta etapa se puede realizar mediante dos procedimientos: Inyección en línea e inoculación en tanque, los cuales se encuentran descritos en esta norma.

3.2.1 Muestra M3: Es el agua inoculada con una población microbiana conocida.

3.2.2 Muestra M4: Es el agua tratada con el purificador, una vez contaminada con una población microbiana conocida.

3.3 Volumen muerto: Es la cantidad de agua que retiene el equipo desde el punto de inyección del inóculo hasta la salida del mismo.

3.4 Volumen de remoción: Es la cantidad de agua que se mide desde el punto de inicio de salida del inóculo hasta que deja de salir del equipo.

Nota 1: El volumen de remoción de los purificadores no debe ser mayor a 1,5 veces del volumen muerto del mismo equipo.

4 PRINCIPIO

4.1 El método consiste en comprobar a través de ensayos microbiológicos, la capacidad que tiene el sistema purificador de eliminar, retener o disminuir poblaciones microbianas.

4.2 El procedimiento consta de dos etapas.

4.2.1 En la primera etapa, se prueba la capacidad del equipo de retener, disminuir o eliminar la población microbiana nativa en aguas tratadas para consumo.

4.2.2 En la segunda etapa, se evalúa su eficiencia en condiciones extremas, frente a muestras de agua contaminadas con una población microbiana conocida y cuantificada.

5 APARATOS Y MATERIALES

5.1 Equipo para la preparación de muestras (Véase Norma Venezolana COVENIN 1126).

5.2 Frascos de vidrio, con tapa hermética y capacidad de 100 a 500 ml estériles.

5.3 Placas de Petri de 15 mm x 100 mm, estériles.

5.4 Equipos de uso común en el laboratorio.

5.5 Dos tanques de prueba con capacidad mínima de 15 l.

5.6 Bomba centrífuga de capacidad mínima de 12,5 Kg./seg. (42,5 psi) y que permita obtener la presión de trabajo nominal en circuito para el caudal de evaluación de la unidad de purificación.

5.7 Válvula reguladora.

5.8 Red de suministro de agua no clorada (Véase Nota 2).

5.9 Regulador de flujo y presión de la línea.

5.10 Punto de inoculación, preferiblemente de goma látex que permita la inyección con aguja y el sellado después del proceso de inyección.

5.11 Punto de conexión para el purificador.

5.12 Cronómetro.

5.13 Espectrofotómetro.

6 REACTIVOS

6.1 Diluentes

6.1.1 Agua peptonada al 0,1 % (Véase Norma Venezolana COVENIN 1126).

6.2 Medios de cultivo

6.2.1 Agar estándar para recuentos en placas (Agar triptona glucosa levadura). (Véase Norma Venezolana COVENIN 902).

6.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa, doble concentrado. (Véase Norma Venezolana COVENIN 3047).

6.2.3 Caldo lactosa bilis verde brillante, al 2%.

6.2.4 Caldo cerebro corazón o caldo tripticasa soya.

6.2.5 Agar Mc Conkey. o Agar Endo-Les.

6.2.6 Agar tripticasa soya y/o Agar nutritivo.

7 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

7.1 Las muestras de agua M1 y M2 deben tomarse según el punto 5.2 de la norma COVENIN 2614. El volumen a recolectar de cada una es de 200 a 500 ml.

7.2 La toma de la muestra M4 se debe realizar según el procedimiento utilizado en la segunda etapa (Véase punto 9.2).

7.2.1 En el caso del procedimiento de inyección en línea se debe tener en cuenta el volumen muerto y el volumen de remoción (Véase Anexos A y B), para el momento de captación.

7.2.2 En el caso del procedimiento por inoculación en tanque, la muestra M4 se toma después de dos minutos de operación del purificador, si el volumen muerto es de menos de la mitad del caudal del equipo. (Véase Anexos A y B).

7.3 La toma de muestra M3 se realiza a la entrada del equipo, por el procedimiento por inoculación en tanque.

Nota 2 : En el caso de purificadores que traten volúmenes fijos de agua, se toma la muestra de acuerdo a las características del recipiente y se mantienen las condiciones de asepsia requeridas para el ensayo.

8 CONDICIONES DEL ENSAYO

8.1 El equipo purificador debe ser instalado por el personal de la empresa fabricante ó distribuidora, y el mismo debe estar acompañado de la información relacionada con las características, condiciones de uso y eficiencia del equipo.

8.2 Se regula el caudal de salida a un rango de 2 a 3 l/min.

8.3 Una vez tomadas las muestras de agua, éstas deben ser analizadas en un periodo máximo de 2 horas entre la captación y el análisis. Si la fase de captación no se efectúa en el laboratorio de análisis, se recomienda refrigerar las muestras durante su transporte.

8.4 Todos los análisis se deben realizar en condiciones de asepsia.

9 PROCEDIMIENTO

9.1 Primera etapa:

9.1.1 Tomar una muestra de agua (M1) del grifo que esté conectado a la misma tubería que surte al equipo purificador.

9.1.2 Tomar una muestra de agua tratada (M2) a la salida del equipo purificador.

9.1.3 Realizar en ambas muestras el recuento de aerobios mesófilos (Véase Norma Venezolana COVENIN 902) y la determinación de coliformes (Véase Norma Venezolana COVENIN 3047 ó COVENIN 2409).

9.2 Segunda etapa:

9.2.1 Inyección en línea

9.2.1.1 Preparación de la población bacteriana para el procedimiento por inyección en línea y evaluación con este sistema.

9.2.1.1.1 Repicar las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (previamente controladas en su identidad y pureza) en tubos caldo cerebro corazón o caldo tripticasa soya. Incube a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 ± 2 horas.

9.2.1.1.2 Al finalizar el período de incubación se considera teóricamente que la población bacteriana es del orden de 10^8 ufc/ml. Preparar las diluciones correspondientes de acuerdo a la población estimada para cada cepa y a la capacidad de eliminación, retención, o disminución del equipo declarado por el fabricante.

9.2.2 Procedimiento de inoculación

9.2.2.1 Para los purificadores de agua que se conectan a la tubería de suministro, determinar el volumen muerto y el volumen de remoción del equipo para el caudal de evaluación del mismo (Véase Anexo A).

Con el equipo funcionando a la presión y caudal de evaluación, inyectar 1 ml del inóculo. Medir con el cilindro graduado el volumen muerto e inmediatamente cambiar el envase por un recipiente estéril, recoger un volumen de agua tratada igual al volumen de remoción previamente determinado. Esta es la muestra M4.

En otro recipiente estéril añadir 1 ml del inóculo y un volumen de agua peptonada igual al volumen de remoción. Esta es la muestra M3.

Ejemplo: Si se declara que el equipo es capaz de eliminar poblaciones de 10^4 ufc/ml, realizar las diluciones decimales seriadas de la mezcla de cultivos hasta 10^4 , utilizando ésta última (10^4) como población de prueba (M3).

9.2.2.2 Para los equipos purificadores que traten volúmenes fijos de agua, añadir la población de prueba previamente calculada, aplicar el tratamiento purificador indicado por el fabricante, y luego tomar la muestra de agua (M4).

9.2.3 Procedimiento de inoculación en tanque

9.2.3.1 Preparación de la población bacteriana para el procedimiento por inoculación en tanque con un volumen determinado de agua y evaluación con este sistema.

9.2.3.2 Repicar las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* (previamente controladas en su identidad y pureza) a un tubo conteniendo un bisel (Agar inclinado) de agar nutritivo o agar tripticasa soya. Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

9.2.3.3 Transferir los cultivos con ayuda de perlas de vidrio estériles y 3 ml. de solución salina al 0,85 % a cada una de las botellas de Roux conteniendo 250 ml. de agar tripticasa soya. Extender el inóculo en la superficie mediante un movimiento de vaivén y con ayuda de perlas de vidrio. Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

9.2.3.4 Recoger los cultivos así obtenidos con 50 ml. de solución salina al 0,85% en un recipiente estéril para obtener una suspensión de cada cepa.

9.2.3.5 Preparar diluciones seriadas con 10 ml. de solución salina al 0,85 % y determinar el contenido de bacterias viables.

9.2.3.6 A su vez determinar en la suspensión de gérmenes la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. en el espectrofotómetro.

9.2.3.7 Establecer una curva de correlación de absorbancia versus número de bacterias viables para cada cepa (Véase Anexo C) para cada una.

Para el ensayo determinar el volumen de inóculo a añadir al tanque de prueba en base al volumen de éste, la capacidad teórica de eliminación del equipo y la concentración de bacterias viables del inóculo.

9.2.4 Evaluación del equipo

9.2.4.1 Añadir el volumen de inóculo de prueba así calculada al tanque de prueba T1 (Véase figura 1). mezclar el contenido del tanque por un minuto.

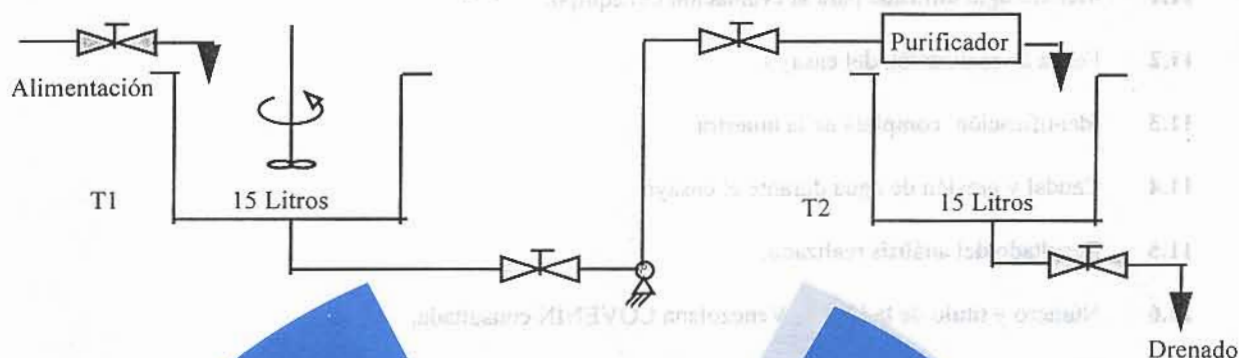


Figura 1: Inoculación en Tanque

9.2.4.2 Tomar la muestra de agua inoculada M3 en la llave previa al equipo. Hacer circular el agua por el purificador, evaluar con regulación del caudal y la presión adecuada, según las especificaciones.

9.2.4.3 Después de al menos dos minutos de operación tomar la muestra de agua purificada. Muestra M4.

9.2.5 Evaluación microbiológica de las muestras M3 y M4 para ambos equipos

9.2.5.1 Evaluar la carga de la población de prueba (M3) y la calidad microbiológica del agua tratada por el equipo (M4) mediante recuento de aerobios mesófilos, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Hacer las diluciones correspondientes de acuerdo a la población bacteriana teóricamente esperada en cada caso.

9.2.5.2 Para realizar los recuentos de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en la población de prueba (M3), sembrar volúmenes de 0.1 ml de las diluciones de la muestra en la superficie de placas previamente secas de agar Mc. Conkey, y extender el inóculo con una espátula de vidrio. En el caso de M4 sembrar 1 ml de la muestra sin diluir, repartiendo volúmenes de 0.3 ml, 0.3 ml y 0.4 ml en la superficie de cada una de las 3 placas agar Mc. Conkey, previamente secas.

Extender el inóculo con una espátula de vidrio y dejar las placas sin invertir por aproximadamente 10-15 min., a fin de permitir que el inóculo se absorba totalmente en el agar. Incubar las placas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

9.2.5.4 Lectura de las placas: finalizando el período de incubación, realizar los recuentos. Multiplicar el número de colonias obtenido correspondiente a cada tipo por el inverso de la dilución, a fin de obtener el recuento en ufc/ml. En el caso de la M4, sumar el número de colonias de iguales características obtenida en las 3 placas y exprese el resultado en ufc/ml.

Nota 3: Las colonias de *Escherichia coli* aparecen de color rojo y las *Pseudomonas aeruginosa* incoloras.

10 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

10.1 Los resultados de los contajes obtenidos para cada una de las muestras de agua se expresan como unidades formadoras de colonias por mililitros (ufc /ml) ó Número más probable por 100 mililitros de agua (NMP/ml de agua), dependiendo de la metodología utilizada.

10.2 La eficiencia del equipo purificador para eliminar poblaciones microbianas bajas, se calcula por la diferencia entre los resultados obtenidos entre las muestras M1 y M2; mientras que la eficiencia para reducir poblaciones microbianas altas se calcula por la diferencia entre M3 y M4.

11 INFORME

El informe debe contener lo siguiente:

- 11.1 Metodología utilizada para la evaluación del equipo.
- 11.2 Fecha de realización del ensayo.
- 11.3 Identificación completa de la muestra.
- 11.4 Caudal y presión de agua durante el ensayo.
- 11.5 Resultado del análisis realizado.
- 11.6 Número y título de la Norma Venezolana COVENIN consultada.
- 11.7 Nombre del analista.
- 11.8 Observaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Apha. Water and waste water.

Información suministrada por la Industria

Participaron en la elaboración de esta norma: Briceño, Ana Graciela; Chacín, Ludmila; Díaz, Claudia; Escobar, Gustavo; Forgione, Maite; Méndez, Safir; Ortíz, Mirían; Soulavy, Carin; Suarez, Mirían.

**ANEXO A
(INFORMATIVO)**

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN MUERTO EN EL EQUIPO

- A.1 Instalar el equipo a evaluar.
- A.2 Tomar lectura del medidor de volumen (medidor de flujo tipo paleta) instalado.
- A.3 Abrir la válvula 100%.
- A.4 Abrir la válvula principal en un cuarto de vuelta.
- A.5 Mantener la válvula principal entre abierta hasta que se aprecie el agua a la salida del filtro (flujo estable).
- A.6 Cerrar la válvula principal.
- A.7 Tomar lectura del medidor.
- A.8 Calcular la diferencia de lecturas equivalentes al volumen muerto.
- A.9 Convertir el diferencial de lectura en litros/minutos de ser necesario.

ANEXO B (INFORMATIVO)

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO Y VOLUMEN DE REMOCIÓN EN EL EQUIPO

B.1 Ajuste del flujo de agua

Colocar una medida cilíndrica de 1000 ml en la salida de agua purificada. Abrir el grifo y ajustar la cantidad de agua de salida a la presión de trabajo nominal para el caudal requerido por el equipo.

B.2 Determinación del tiempo de flujo del agua para el espacio comprendido entre el punto de inyección de la suspensión y la salida del agua purificada.

B.2.1 Disponer de varias medidas cilíndricas de 500 ml con unas gotas de solución de fenolftaleína a la salida del agua.

B.2.2 Inyectar con una jeringa, 1 ml de solución de Hidróxido de Sodio al 10%.

B.2.3 Anotar el tiempo que tarda el agua en virar el indicador, desde el momento de la inyección.

B.3 Determinación del tiempo de remoción

B.3.1 Proceder igual que en los subpuntos B.2.1 y B.2.2.

B.3.2 Anotar el tiempo transcurrido entre la inyección del hidróxido de sodio y el momento en que deje de producirse el viraje del indicador.

B.4 Determinación del volumen de remoción

Anotar los ml de agua acumulada desde la inyección del hidróxido hasta el momento en que no se produce más viraje del indicador, y luego calcular el diferencial de lectura del volumen muerto.

ANEXO C (INFORMATIVO)

ESTABLECIMIENTO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

- C.1 Realizar diluciones de la suspensión obtenida a partir de la botella de Roux hasta obtener una población estimada de 10^8 ufc/ml.
- C.2 Leer la absorbancia de cada una de las diluciones anteriormente preparadas.
- C.3 Construir una curva absorbancia vs población bacteriana viable (ufc/ml).
- C.4 Determinar la absorbancia de la dilución que se corresponda con la población bacteriana de 10^{12} (ufc/ml).
- C.5 Calcular el volumen de inóculo a añadir al tanque de 15 litros de capacidad.



COVENIN
3377 :1998

CATEGORÍA
C

FONDONORMA
Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12
Telf. 575.41.11 Fax: 574.13.12
CARACAS

publicación de:



I.C.S: 7.100.20

ISBN: 980-06-2096-6

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

Descriptores: Alimento, método microbiológico, agua, purificador, evaluación microbiológica.