

	MÉTODO ANALÍTICO PRUEBA ENZIMA SUSTRATO PARA COLIFORMES TOTALES Y <i>Escherichia coli</i>, SM 9223 B. VARIABLE MULTICELDA	
	Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá	
	Código: D-7.2-33	Versión: 10
	Revisó: Sub. Administrativo y Financiero	Aprobó: Director General (E)
	Fecha: 07 de Noviembre de 2025	Fecha: 07 de Noviembre de 2025
	Resolución: 100-03-10-23-2291-2025	Páginas: 1 de 10

1. DESCRIPCIÓN

Uno de los principales indicadores de la idoneidad de agua para usos domésticos, industriales u otros, es la presencia del grupo de bacterias coliformes, este grupo de la familia enterobacteriaceae se encuentran comúnmente en plantas, suelo, en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo de la misma y en el tracto intestinal de humanos y otros animales de sangre caliente. Por su amplia diversidad el grupo coliformes ha sido dividido en: coliformes totales y *Escherichia coli* (anteriormente conocida como coliformes fecales).

Los coliformes totales son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, oxidasa negativa con capacidad de crecimiento aeróbico y facultativamente anaeróbico en presencia de sales biliares que a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ causan fermentación de la lactosa con producción de gas, también poseen la enzima β -D-galactosidasa. Aunque en gran número se introducen al medio ambiente por las heces de humanos y animales no son indicadores concluyentes de contaminación de origen fecal dado que algunas bacterias de este grupo viven en el suelo y en las aguas dulces superficiales, pero si pueden indicar fallos en el tratamiento o distribución del agua. El grupo está conformado por 4 géneros principales: *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Escherichia sp.* y *Klebsiella sp.*

Escherichia coli (*E.coli*) es un subgrupo de los coliformes totales con la propiedad de producir indol a partir del triptófano a una temperatura de $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y además de poseer la enzima β -D-galactosidasa presenta la β -glucuronidasa la cual es detectada por medios cromogénicos o fluorógenos. Se encuentran casi exclusivamente en las heces de los animales de sangre caliente por esta razón se considera un indicador directo de contaminación fecal.

2. ALCANCE

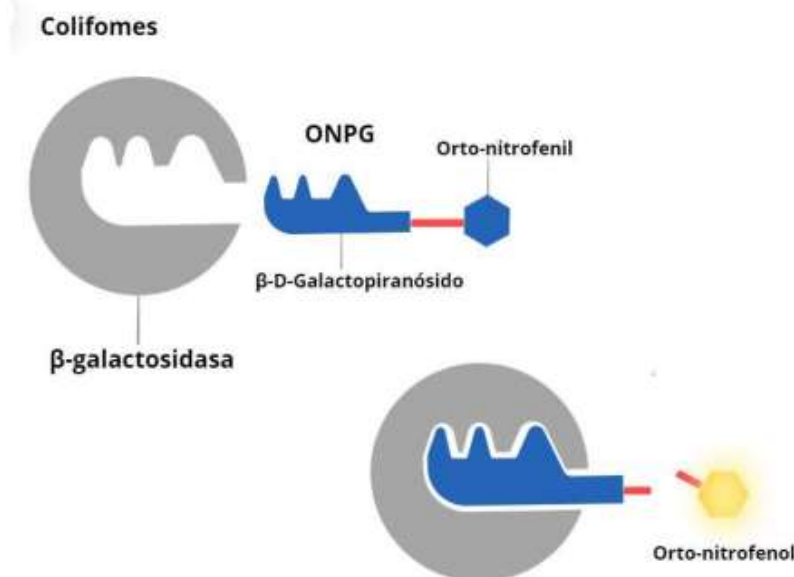
El método analítico de enzima sustrato para el recuento de coliformes totales y *E. coli* aplica para aguas con bajas y altas concentraciones microbianas, siendo recomendado para el análisis de agua potable, agua de manantial, agua subterránea, superficiales y aguas residuales.

3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

3.1 Principio

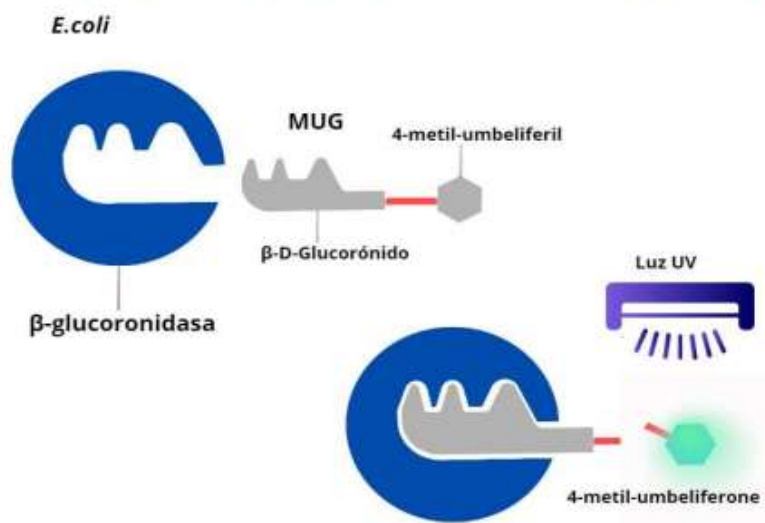
Este método se fundamenta en el empleo de Colilert 18, el cual contiene un sustrato cromogénico, el orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) para la detección de la enzima β -D-galactosidasa, enzima producida por el grupo coliformes y el sustrato fluorogénico β -glucoronido-4-metil-umbeliferilo (MUG) para la detección de la enzima β -glucuronidasa producida por *E. coli*.

El ONPG atraviesa la pared celular de la bacteria, una vez dentro, el sustrato es descompuesto por la enzima β -D-galactosidasa en galactosa y ortonitrofenil, que al liberarse en el medio alcalino toma un color amarillo pálido. Por su parte, el sustrato fluorogénico MUG al entrar en contacto con la enzima β -glucuronidasa es hidrolizado liberando al medio 4-metil-umbeliferona que produce fluorescencia visible bajo luz UV.



Fuente: propia

Figura 1. Fundamento de la técnica sustrato definido para la detección de coliformes totales



3.2 Interferencias

Interferencias Bacterias no coliformes, tales como *Aeromonas sp.*, *Flavobacterium sp.* Y *Pseudomonas sp.*, pueden producir pequeñas cantidades de β -D-galactosidasa, pero son inhibidas y generalmente no producen respuesta positiva a los tiempos de incubación cuando se encuentran en concentraciones menores a 10⁶ UFC/100mL.

En la determinación de *E. coli* encontramos que existen microorganismos interferentes como *Shigella sp.* y *Salmonella sp.*, que también pueden producir una respuesta fluorescente pero no cambiara su color porque carecen de β -D-galactosidasa, dichos resultados serán considerados como negativos.

Las matrices de agua que contienen altas concentraciones de materia orgánica (ácido húmico) u otro material, pueden presentar una coloración amarilla naturalmente. Si el agua es lo suficientemente amarilla como para ser malinterpretada como un positivo débil después de la incubación, utilice un medio alternativo. Si la matriz de agua tiene un cierto color en el fondo comparar el ítem de ensayo inoculado con Colilert con un blanco testigo de la misma de agua sin inocular.

El alto contenido de sal de calcio de algunas aguas puede causar precipitación, pero esto no debería afectar la reacción. En muestras con exceso de cloro, se puede observar un destello azul al agregar medios Colilert-24 o Colilert-18. Si esto ocurre, considere que la muestra no es válida y suspenda la prueba. Para evitarlo, los ítems de ensayo deben tomarse utilizando frascos que contengan tiosulfato de sodio. No utilice la prueba de sustrato enzimático para verificar cultivos presuntivos de coliformes o colonias de filtros de membrana, ya que el sustrato puede estar sobrecargado por el abundante inóculo de bacterias no coliformes que producen β -D-galactosidasa débil, lo que causa resultados falsos positivos.

Diluya las muestras de agua salobre/marina con agua estéril al menos diez veces para la prueba del Colilert-18 solamente para el recuento de *E.coli* (pero no para coliformes totales).

4. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

Los recipientes empleados para la toma del ítem de ensayo son de vidrio o plástico de boca ancha con una capacidad de 250mL previamente esterilizados con 100 μ L tiosulfato de sodio al 3% por cada 120mL de agua (potable o tratada), llenado siguiendo el procedimiento de PROTOCOLO DE MUESTREO cod. D-7.3-01, dejando un espacio libre (2,5 cm) para garantizar una buena homogenización antes del análisis. Para ítems de ensayo sin proceso de potabilización con cloro, no se requiere la adición de tiosulfato.

4.1 Agua potable para los propósitos de conformidad: Para los análisis de coliformes totales y *E. coli*, el tiempo de conservación desde la recolección hasta el

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.2-33	Versión: 10	Página: 3 de 10

análisis es de 30 horas, se deben mantener los ítems de ensayo fríos, pero no congeladas (<10°C) durante el transporte al laboratorio.

Nota: No acepte ningún ítem de ensayo para análisis microbiológicos que muestre evidencia de congelamiento. Analice los ítems el día de la recepción siempre que sea posible. Si los ítems de ensayo llegan demasiado tarde para procesarlas el mismo día, refrigérelas durante la noche si aún se pueden cumplir los límites de tiempo de conservación.

4.2 Agua no potable para propósitos de conformidad: Durante el transporte, el ítem de ensayo: agua de manantial, arroyos contaminados, agua recreativa y aguas residuales, se deben mantener frías pero no congeladas (<10°C) y no exceder las 8h entre la recolección y el análisis de laboratorio. Cuando lleguen al laboratorio, refrigérelas y procese dentro de las 2 h siguientes.

4.3 Otros tipos de agua sin fines normativos: Mantener el ítem de ensayo frío, pero no congelado (<10°C) entre la recolección y el análisis en el laboratorio no exceder 24horas.

5. MATERIALES Y EQUIPOS

Autoclave.

Incubadora.

Cámara de UV.

Sellador Quanti-Tray.

Porta dispositivo de goma.

Cabina de flujo laminar horizontal.

Mechero.

Probeta de 100 mL.

Micropipetas volumétricas de 100 a 1000 µL y de 1 a 10 mL.

Frascos plásticos o de vidrio con capacidad de 100-250 mL adicionados con tiosulfato de sodio al 3%.

Tubos estériles.

Tabla NMP IDEXX Quanti-Tray.

Quanti-Tray/2000.

6. REACTIVOS

IDEXX Colilert-18 y IDEXX Colilert-24.

Agua destilada estéril no tamponada.

Comparador Quánti-Tray/2000.

Escherichia coli ATCC 25922.

Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae ATCC 13883.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.2-33	Versión: 10	Página: 4 de 10

6.1 Preparación de reactivos

Colilert-18 y Colileirt-24: Reactivos preparados comercialmente y listos para su uso. Almacenados de 2-25°C alejado de la luz.

Tiosulfato de sodio: Preparar la solución de tiosulfato como se indica en la Tabla 1:

Concentración de la solución de Na ₂ S ₂ O ₃	Peso requerido del componente
3% anhidro	3 g/100 mL
3% pentahidratado	4,6 g/100 mL
10% anhidro	10 g/100 mL
10% pentahidratado	15,21 g/100mL

FUENTE: *Standard methods for the examination of wáter and wastewater*, 24ta Edición, 2023

7. PROCEDIMIENTO

- Agitar el ítem de ensayo vigorosamente durante 7 segundos o 25 veces por inversión para promover la distribución uniforme de las bacterias. Tomar 100 mL de ítem de ensayo con una probeta y transferir el contenido a un recipiente estéril. En caso de que el ítem de ensayo requiera dilución realícela solamente con agua esteril no tamponada conservando un volumen final de 100 mL.
- Añadir asépticamente el contenido del blíster de colilert a los 100 mL del ítem de ensayo. Sustener con una mano el dispositivo Quánti-Tray/2000, en posición vertical con el lado de la bandeja (pozos) orientado hacia la palma. Apretar la parte superior del dispositivo de modo que se doble hacia la palma. Abrir el dispositivo tirando suavemente de la pestana para separar el papel aluminio de la bandeja teniendo cuidado de no tocar el interior ya sea de papel de aluminio o bandeja.
- Vertir la mezcla de reactivo y muestra directamente dentro del Quánti-Tray/2000, evitando tocar la pestaña. Golpear suavemente los pocillos de la bandeja Quánti-Tray/2000 2 a 3 veces para liberar las burbujas de aire que puedan quedar atrapadas. Dejar que la espuma se asiente, aunque algo de espuma es aceptable.
- Colocar la bandeja en el inserto de goma apropiado con los pozo (matriz) hacia el lado de abajo para que encaje en el soporte e introdúzcalo en el sellador Quanti-Tray, el sellador dispersa la muestra en los pocillos y sella el paquete.
- Incubar el dispositivo sellado a 35°C ± 0,5 °C (o a 44,5°C ± 0,2°C para coliformes termotolerantes) por un periodo de 18 o 24 horas, para colilert-18 o colilert-24 respectivamente (No se necesita precalentar a 35 °C).

- f. Observar el cambio de coloración y la presencia de fluorescencia bajo UV, contar el número de pocillos positivos pequeños y grandes y consultar la tabla NMP. Interpretar los resultados de acuerdo al ítem 8 (CÁLCULOS Y RESULTADOS).

8. CÁLCULOS Y RESULTADOS

Cuente el número de pocillos positivos pequeños y grandes y consulte la Tabla NMP IDEXX Quanti-Tray/2000, para encontrar el número más probable de coliformes totales. Los resultados de *E. coli* se obtienen colocando los pocillos bajo luz UV y contar el número de pocillo fluorescentes. La concentración indicada en la tabla se reporta con unidades de NMP/100mL, si se realizan diluciones la concentración se multiplica por el factor de dilución.

REACTIVO	 Colilert-18 Tiempo incubación: 18-22 h		 Colilert-24 Tiempo incubación: 24-28 h	
RESULTADO COLIFORMES TOTALES T. de incubación: $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	 Positivo: amarillo	 Negativo: incoloro	 Positivo: amarillo	 Negativo: incoloro
RESULTADO COLIFORMES TERMOTOLERANTES T. de incubación: $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$	 Positivo: amarillo	 Negativo: incoloro	NO APLICA	
RESULTADO <i>E. coli</i> T. de incubación: $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	 Positivo: amarillo	 Positivo: amarillo y fluorescencia con luz UV	 Positivo: amarillo	 Positivo: amarillo y fluorescencia con luz UV
RESULTADO <i>E. coli</i> T. de incubación: $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	 Negativo: sin fluorescencia	 Negativo: sin fluorescencia	 Negativo: sin fluorescencia	 Negativo: sin fluorescencia

FUENTE: Propia

Tabla 2. Interpretación de resultados colilert-18 y colilert-24.

Si la respuesta cromogénica y fluorescente es ambigua (no se puede discernir) después de las 18 o 24 horas, incube el ítem de ensayo hasta 4 horas más para permitir que el color y la fluorescencia de la prueba se intensifique. Si el color amarillo y la fluorescencia azulada después de 22 o 28 horas es igual o mayor que la del comparador se interpreta el resultado como positivo de coliformes totales y *E. coli* pero si el color amarillo y la fluorescencia azulada permanece menor que la del comparador entonces se interpreta el resultado como negativo para coliformes totales y *E. coli*. Colilert-18 y Colilert-24 se puede incubar por un tiempo máximo de 22 o 28 horas respectivamente, después de este periodo los resultados negativos de la prueba aún se consideran válidos, pero los resultados positivos no.

9. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

Control positivo coliformes totales y *E. coli*.

Se realiza mensualmente para verificar que los medios Colilert no proporcionen falsos positivos o falsos negativos. Llene dos recipientes con 100 mL de agua estéril, no tamponada e inocule con un asa estéril cepas de *E. coli* ATCC 25922 (coliformes totales y *E. coli* positivos) y *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* ATCC 13883 (coliformes totales positivos y *E. coli* negativo), agregue el reactivo Colilert y proceda con el sellado y la incubación como se indica anteriormente.

Control especificidad.

Vierta 100 ml de agua esterilizada en un recipiente e inocule con un asa estéril una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (coliformes totales y *E. coli* negativos), agregue el reactivo Colilert y proceda con el sellado y la incubación como se indica anteriormente. Este control se realiza mensualmente.

Control selectividad.

Vierta 100 mL de agua esterilizada en un recipiente e inocule con un asa estéril una cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (coliformes totales y *E. coli* negativos), agregue el reactivo Colilert y proceda con el sellado y la incubación como se indica anteriormente. Este control se realiza mensualmente.

Blanco.

Vierta 100 ml de agua esterilizada en un recipiente, agregue el reactivo Colilert, tape y mezcle, vierta en la bandeja, selle e incube a $35\pm0,5^{\circ}\text{C}$ de 18-22 horas para colilert-18 y 24- 28 horas si usa colilert-24. Este control se realiza mensualmente con el fin de verificar la esterilidad de los pozos y/o del recipiente.

Control de auto fluorescencia.

Cada lote nuevo de Quanti-Tray/2000, debe revisarse antes de su uso con luz ultravioleta para detectar autofluorescencia. Si se observa alguna fluorescencia

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.2-33	Versión: 10	Página: 7 de 10

tenue, se debe registrar, descartar y reemplazar por un lote nuevo. Si algún medio hace que la muestra emita fluorescencia antes de la incubación, se debe utilizar otro lote de medio.

Control de sellador Quanti-Tray.

Agregue 1- 2 gotas de colorante de alimentos (curcumina u otro) en 100 mL de agua destilada estéril y pase por el sellador Quanti-Tray, esto con el fin de verificar si el sellador sella apropiadamente los pozos de Quanti-Tray. Este control se realiza mensualmente.

Duplicado de muestras:

Realice un duplicado por lote procesado por día, seleccionando aleatoriamente un ítem de ensayo. Evalúe los resultados obtenidos de acuerdo con el criterio de precisión establecido para el método. Verifique que la variabilidad observada en la carta de control no exceda el límite definido por dicho criterio, a fin de garantizar la precisión y la confiabilidad del método analítico.

Nota: cuando un duplicado no cumpla con el criterio de precisión de la carta de control para microbiología R-7.7-04, se realizará un trabajo no conforme y como acción correctiva se informará al cliente, solicitando su autorización para la nueva toma de la muestra y su posterior análisis.

Efecto matriz.

Se realiza mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de una muestra de agua añadida con una concentración de 10-100 bacterias/mL de *E. coli*, este porcentaje debe cumplir con el criterio de aceptación de microbiología que es de 70 a 130%.

$$\%R = (\bar{X} \text{ muestra inoculada}) / (\bar{X} \text{ cepa} + \bar{X} \text{ muestra}) \times 100$$

Donde:

%R = Porcentaje de recuperación.

$\bar{X}$ = Promedio de la concentración.

El efecto matriz se analiza cada vez que ingresa una matriz diferente de agua subterránea y superficial.

Muestras adicionadas.

En el caso de muestras en las que se sospeche una baja concentración microbiana (<30 NMP/100 mL), como las aguas potables o subterráneas, se deberá mantener el control del método mediante la preparación y análisis de muestras fortificadas. Estas muestras deberán procesarse por duplicado y sus resultados incorporarse en la carta de control del método, con el fin de verificar la precisión y confiabilidad del sistema analítico.

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.2-33	Versión: 10	Página: 8 de 10

Confirmación.

Trimestralmente, se tomará al azar, una bandeja que tenga pozos positivos para coliformes totales y *E. coli*; tomando el 10% de los pozos correspondientes a la misma, se le realizará una prueba confirmatoria en agar Chromocult, para esto, la bandeja será desinfectada y con un aza de chuzo se pincharán de forma aséptica los pozos, cada uno, será resembrado en agar Chromocult y las placas de este incubadas por 24 horas a $35 \pm 0,5$ °C; las colonias azules pertenecerán a *E. coli* y las rosadas o violetas a coliformes totales.

Todos los ensayos referentes al control de calidad serán consignados en el registro R-7.4-29 Captura de datos coliformes enzima sustrato.

10. MANTENIMIENTO

El mantenimiento de las incubadoras se realiza de acuerdo al R.6.4-09 Inventario metrológico y el R.6.4-06 Necesidad de mantenimiento y calibración.

11. BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps Wc, Braunt-Howland Eb, Baxter Te. Eds. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 24th Ed. Washington Dc: APHA PRESS;2023. Sección. 9223 B. C.
- Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf

12. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
11/08/2017	300-03-10-23-0990	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-72: MÉTODO ANALÍTICO PRUEBA ENZIMA SUSTRATO PARA COLIFORMES TOTALES Y ESCHERICHIA COLI, SM 9223 B.
15/08/2018	300-03-10-23-1436	02	Se usa como referencia del método - SM 9223 B, c, adaptado desde lo indicado en el procedimiento Quanti-Tray/2000 de Idexx. En la sección INTERFERENCIAS se menciona el tratamiento para muestras con alto contenido de materia orgánica y clorinas. En la sección PREPARACIÓN DE REACTIVOS se adiciona claridad sobre las condiciones de almacenamiento del blíster, así: "El blíster de colilert debe ser preservado a una temperatura de 2 a 25°C." En la sección de PROCEDIMIENTO, se añade: - Pretratamiento del blíster y manejo de la muestra, previos al inicio del ensayo. - Interpretación de resultados ópticos, relativos a la intensidad del color para la determinación del microorganismo de interés. En la sección de SEGUIMIENTO Y CONTROL se realizan los siguientes cambios: - Se modifica la frecuencia de realización del Control positivo de trimestral a mensual, e igualmente para el Control de sellador Quanti-Tray. - Se adiciona el: Control del multicelda y control del recipiente de toma de muestra y el Análisis de efecto Matriz

21/09/2018	300-03-10-23-1604	03	Se modifica el nombre de la técnica empleada especificando en el TÍTULO “4c” y “VARIABLE MULTICELDA”. En la sección de SEGUIMIENTO Y CONTROL se modifica la periodicidad con la que se realiza el duplicado de muestra, pasando de quincenal a semanal.
19/11/2019	300-03-10-23-1429	04	Se modifica el título del método, eliminando la especificación “4c” que indica vble multicelda. Se elimina la subsección 3.2 - Definición y se unifica con el criterio de descripción de la sección 1. Por otro lado, se adiciona dentro de la estructura del método la sección 2 – ALCANCE, así: “El método analítico prueba enzima sustrato para coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> aplica para agua con altas o bajas concentraciones microbianas, siendo recomendado mayormente para agua residuales, superficiales, piscina, agua tratada y envasada”. También se incluye la sección 12 - MANTENIMIENTO relacionado con el método. Se cambia la codificación del documento pasando de D-5.4-72 a D-7.2-33 de acuerdo a la nueva versión de la Norma – ISO/IEC 17025:2017, así como también se modifica el respectivo formato de captura de datos referenciado en éste.
06/10/2020	300-03-10-23-1125	05	Al ítem 11 (control de calidad) se le agrega el Duplicado de muestras: Realizar un duplicado de muestra semanalmente, escogiendo una muestra al azar. De acuerdo con los resultados y el criterio de precisión establecido para el método determine si la variabilidad supera el 20%. La carta control no debe exceder dos puntos por encima del criterio de precisión, esto con el fin de garantizar la reproducibilidad del método
16/11/2021	300-03-10-23-2356	06	Se incluye una nota para el control de calidad Especie-Especificidad de esta metodología analítica. Se actualiza el alcance de este análisis y se corrige el proceso de toma de muestra y almacenamiento
24/11/2023	300-03-10-23-2554	07	Se actualiza el documento del procedimiento D-7.2-33 MÉTODO ANALÍTICO PRUEBA ENZIMA SUSTRATO PARA COLIFORMES TOTALES Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> , SM 9223 B. 4 C., de acuerdo con la edición 24th del Standard Methods del 2022.
25/11/2024	300-03-10-23-2341	08	Se realizan ajustes del documento MÉTODO ANALÍTICO PRUEBA ENZIMA SUSTRATO PARA COLIFORMES TOTALES Y <i>Escherichia coli</i> , SM 9223 B. VARIABLE MULTICELDA, a nivel general en todos los ítems, teniendo en cuenta las recomendaciones del proveedor de Colilert y la edición 24th del Standard Methods del 2023.
09/07/2025	100-03-10-23-1338	09	Se actualizó la Bibliografía a la versión 24 th de Standard Methods (2023).
07/11/2025	100-03-10-23-2291	10	En el ítem 9 de CONTROL DE CALIDAD en el apartado de duplicado de muestras se elimina el criterio de precisión del 20% y se dejó que la variabilidad de los duplicados no puede superar el criterio de precisión determinado para el método, adicionalmente se agregó el apartado de muestras adicionadas para el control de muestras que se sospecha que tienen una concentración <30NMP/100 mL.

Última línea-----última línea-----última línea