

|                                                                                   |                                                                                                                                                                           |                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|  | <b>MÉTODO ANALÍTICO DE DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES POR FERMENTACIÓN EN TUBO MÚLTIPLE MEDIANTE LA TÉCNICA DE NÚMERO MÁS PROBABLE: SM 9221 B y E.</b> |                           |
|                                                                                   | Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá                                                                                                                       |                           |
|                                                                                   | Código: D-7.2-03                                                                                                                                                          | Versión: 09               |
|                                                                                   | Revisó: Subdirector de Planeación y O.T.                                                                                                                                  | Aprobó: Director General. |
|                                                                                   | Fecha: 20/04/2026                                                                                                                                                         | Fecha: 20/04/2026         |
|                                                                                   | Resolución: 300-03-10-23-0797                                                                                                                                             | Páginas: 1 de 11          |

1. DESCRIPCIÓN

Las bacterias coliformes se han utilizado durante mucho tiempo como indicadores de la calidad del agua, basándose en la premisa de que, debido a que estos organismos están presentes en los intestinos de animales de sangre caliente, su presencia en el agua podría indicar que ha ocurrido una contaminación fecal reciente. Históricamente, este grupo de organismos se ha definido por su capacidad de fermentar la lactosa, por lo que el grupo consiste en bacterias de varios géneros pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

El grupo coliformes incluye una amplia variedad de bacilos aerobios y anaerobios facultativos, Gram negativas no esporulantes, capaces de proliferar en presencia de concentraciones relativamente altas de sales biliares, fermentando la lactosa (enzima  $\beta$  galactosidasa) y producir ácido, aldehído y gas ( $\text{CO}_2$ ) en un plazo de 24 a 48 horas a  $35^\circ\text{C}$ , se caracterizan por ser microorganismos oxidasa negativa. Por su parte, *Escherichia coli* y otros coliformes termotolerantes, son un subgrupo del grupo de los coliformes totales que pueden fermentar la lactosa a temperaturas más altas ( $44,5^\circ\text{C}$ ), estas producen indol a partir de triptófano, también posee la enzima  $\beta$  galactosidasa, reacción positivamente en el ensayo de rojo de metilo y pueden descarboxilar el ácido L-glutámico, pero no son capaces de producir acetil metilcarbitol, de usar citrato como única fuente de carbono o de crecer en un caldo de cultivo con cianuro de potasio KCN.

2. ALCANCE

El método de detección de coliformes totales y termotolerantes por fermentación en tubos múltiples es aplicable a agua superficial, marina, subterránea y potable, al igual que a muestras de lodos y sedimentos.

3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

3.1 Principio

La determinación de coliformes mediante la técnica de fermentación en tubos múltiples comprende tres etapas: fase presuntiva, fase confirmativa y fase completada.

En la fase presuntiva se emplea caldo Lauril Sulfato de Sodio (LSS), un medio selectivo que favorece la recuperación de microorganismos estresados o dañados presentes en muestras de agua. Este medio permite el crecimiento de bacterias capaces de utilizar la lactosa como fuente de carbono, evidenciado por la producción de gas. La formación de gas en los tubos constituye un resultado presuntivo positivo para coliformes.

En la fase confirmativa, los cultivos presuntivamente positivos se siembran en caldo Bilis Verde Brillante Lactosa (BGLB), medio selectivo que contiene lactosa y sales biliares, además del colorante verde brillante como agente inhibidor. Este medio restringe el crecimiento de bacterias Gram positivas y otros microorganismos no coliformes, permitiendo únicamente el desarrollo de bacterias capaces de tolerar las sales biliares y el colorante, así como de fermentar lactosa con producción de gas.

En la fase completada se evalúa la presencia de coliformes termotolerantes, tradicionalmente denominados coliformes

fecales. Estos se definen como microorganismos capaces de fermentar lactosa con producción de gas a 44,5 °C. No obstante, se ha reportado su presencia en aguas con alta carga de materia orgánica o en climas tropicales, aun en ausencia de contaminación fecal reciente. Por ello, cuando se requiere una evidencia más específica de contaminación fecal, se recomienda la determinación de *Escherichia coli*, considerada un indicador más preciso. Sin embargo, diversas normativas sanitarias exigen la identificación y enumeración de coliformes termotolerantes. En la técnica de tubos múltiples, estos se identifican por su capacidad de fermentar lactosa en caldo EC con producción de gas a  $44,5 \pm 0,2$  °C en un periodo de  $24 \pm 2$  horas.

La cuantificación de coliformes se estima a partir del patrón de tubos positivos obtenidos en las distintas diluciones analizadas. El NMP representa una estimación estadística de la densidad media de coliformes presentes en la muestra, calculada mediante modelos probabilísticos específicos. Los resultados obtenidos, junto con información derivada de evaluaciones sanitarias permiten valorar la eficacia de los procesos de tratamiento y la calidad sanitaria del agua de origen.

La precisión del método depende del número de tubos y diluciones empleadas. Se obtiene mayor confiabilidad cuando el mayor volumen de inóculo presenta producción de ácido y/o gas en algunos o todos los tubos, mientras que el menor volumen no presenta producción en ninguno o en la mayoría de ellos. La densidad bacteriana puede determinarse mediante fórmulas estadísticas o utilizando tablas de NMP, las cuales se fundamentan en la distribución de Poisson, que asume una dispersión aleatoria de los microorganismos en la muestra.

### 3.2 Interferencias

Es indispensable garantizar una adecuada homogeneización de la muestra antes de la toma de alícuotas. Si la muestra no se agita correctamente o si las bacterias se encuentran agregadas, se altera el supuesto de distribución aleatoria, lo que puede generar una subestimación del NMP y, en consecuencia, de la densidad bacteriana real.

## 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 100mL previamente esterilizados con 100 µL tiosulfato de sodio al 3% por cada 120mL de agua (potable o tratada), llenado siguiendo el documento de D-7.3-01 PROTOCOLO DE MUESTREO 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 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. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

- Cabina de flujo laminar.
- Baño María.
- Micropipeta de 100 a 1000µL. y de 1 a 10mL.
- Asa redonda.
- Incubadora a 35°C.
- Incubadora a 44,5°C.
- Autoclave.
- Campanas de Durham.
- Balanza analítica.
- Tubos de ensayo.
- Gradilla.
- Mechero.

6. REACTIVOS

- Agua destilada.
- Agua de peptona.
- Lauril sulfato de sodio.
- Caldo lactosa bilis verde brillante.
- Caldo EC.

7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

**Agua Peptonada:** Se emplea a concentración de 0.1 % para hacer diluciones. Preparación: Disolver 25 g/L, distribuir eventualmente en tubos y esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C). pH 7.2 ± 0.1.

**Lauril sulfato de sodio:** Medio de cultivo selectivo para el ensayo previo orientativo de Coliformes y para el enriquecimiento selectivo de los mismos, en la investigación de aguas, productos lácteos y alimento. Prepare el caldo Lauril Triptosa según las indicaciones del fabricante. Distribuir en tubos de ensayo provistos de campanas de Durham y esterilizar en autoclave (12 a 15 min a 121°C), pH 6.8 ±0.2.

**Caldo Bilis Verde Brillante Lactosa (BGLB, Brilliant Green Lactose Bile Broth):** Caldo selectivo para crecimiento y enumeración de coliformes como *Escherichia coli* en aguas, leches, alimentos y otros materiales mediante el número más probable. Prepare el Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante según las indicaciones del fabricante. Distribuir en tubos de ensayo provistos de campanas de Durham y esterilizar en autoclave (12 a 15 min a 121 °C), pH 7.2 ±0.2.

**Caldo EC:** Caldo selectivo para Coliformes y *E. coli* en aguas, alimentos y otros materiales. Prepare el Caldo EC según las indicaciones del fabricante. Distribuir en tubos provistos de campanas de Durham y esterilizar en autoclave (12 a 15 min a 121 °C), pH 6.9 ± 0.2.

**Frascos con agua de dilución de 9mL:** El agua de dilución puede ser preparada con peptona al 0,1 % o una solución buffer fosfato, cloruro de magnesio o sulfato de magnesio como solución buffer.

## 8. PROCEDIMIENTO

Para el análisis microbiológico mediante la técnica de tubos múltiples (NMP), el procedimiento debe ejecutarse de la siguiente manera:

### 8.1 Fase presuntiva

#### 8.1.1 Aguas con baja carga microbiana (agua potable)

Se deben analizar 100 mL de muestra, distribuidos en diez tubos, cada uno con 10 mL de caldo Lauril Sulfato a doble concentración.

Cada tubo debe inocularse con 10 mL de la muestra, obteniendo un volumen final de 20 mL por tubo. Este esquema permite evaluar un volumen total de 100 mL de muestra.

#### 8.1.2 Aguas no potables

Para muestras con presunta alta carga microbiana, se deben utilizar tres diluciones decimales (por ejemplo: 10 mL, 1 mL y 0,1 mL), empleando cinco tubos por cada dilución.

Primera serie (10 mL): Inocular 10 mL de muestra en cada uno de cinco tubos que contengan 10 mL de caldo Lauril Sulfato a doble concentración, obteniendo un volumen final de 20 mL por tubo.

Segunda serie (1,0 mL): Inocular 1,0 mL de muestra en cinco tubos que contengan 9 mL de caldo Lauril Sulfato a concentración sencilla.

Tercera serie (0,1 mL): Inocular 0,1 mL de muestra en cinco tubos que contengan 9,9 mL de caldo Lauril Sulfato.

En caso de que todos los tubos resulten positivos (superación del límite superior de cuantificación de método), se deben preparar diluciones decimales adicionales en agua peptonada estéril e inocular 1,0 mL de cada dilución en tubos con 10 mL de caldo Lauril Sulfato.

#### 8.1.3. Incubación

Una vez inoculados, los tubos deben incubarse a  $35 \pm 0,5$  °C durante  $24 \pm 2$  horas. Al finalizar este período, cada tubo debe agitarse suavemente y evaluarse la presencia de: Crecimiento (turbidez), producción de gas (capturado en la campana de Durham), Reacción ácida (cambio de coloración hacia tonos amarillos). Si no se observa reacción, los tubos deben reincubarse y examinarse nuevamente a las  $48 \pm 3$  horas.

#### 8.1.4. Interpretación de resultados

Se consideran tubos presuntivos positivos aquellos que presenten simultáneamente: turbidez, producción de gas, reacción ácida.

En el caso de muestras de agua potable, los tubos que evidencien crecimiento sin producción de gas o sin reacción ácida deben someterse a la fase confirmativa.

En muestras de agua contaminada o aguas residuales que presentan resultados presuntivos positivos de manera constante, se puede optimizar el procedimiento confirmativo de la siguiente manera: si, transcurridas 24 horas de incubación, todos los tubos presuntivos resultan positivos en dos o más diluciones consecutivas, únicamente deberán remitirse a la fase confirmativa los tubos correspondientes a la mayor dilución (es decir, aquella que contenga el menor volumen de muestra inoculado) en la cual todos los tubos sean positivos, así como cualquier tubo que presenten resultado positivo en diluciones superiores, aunque no todos los tubos de esa dilución sean positivos. No obstante, si durante el período de incubación hasta 48 horas aparecen tubos adicionales con producción de gas en diluciones superiores, estos también deberán incluirse en la fase confirmativa.

**8.2 Fase confirmativa:**

**8.2.1 Determinación de coliformes totales**

Agitar o invertir suavemente los tubos presuntivos positivos. Con un asa de siembra estéril, transferir una o más asas del cultivo a un tubo que contenga 10 mL de Caldo Bilis Verde Brillante Lactosa (BGLB, Brilliant Green Lactose Bile Broth), asegurando que el volumen del medio cubra la campana de Durham al menos hasta la mitad o dos tercios de su capacidad y verificando previamente que la campana esté completamente libre de burbujas de aire. Como alternativa, introducir un aplicador de madera estéril al menos 2,5 cm dentro del cultivo presuntivo, retirarlo rápidamente y sumergirlo hasta el fondo del tubo que contiene el caldo BGLB. Posteriormente, retirar y desechar el aplicador.

Se pueden inocular simultáneamente caldo BGLB para coliformes totales y caldo EC para coliformes termotolerantes (fecales). Sin embargo, si se utiliza la misma asa o aplicador de madera para inocular más de un medio, se debe inocular en último lugar el medio más selectivo o inhibidor, es decir, el caldo BGLB, con el fin de evitar arra stre de inhibidores hacia otros medios.

Incubar rápidamente los tubos de caldo Brilla inoculados a 35°C±0,5. Cualquier cantidad de gas formado en el vial invertido del tubo de fermentación del caldo BGLB en cualquier momento dentro de 48± 3 horas, constituye una fase confirmada positiva. Para estimar la densidad de coliformes, calcule el valor de NMP a partir del número de tubos BGLB positivos

**8.3 Fase completada:**

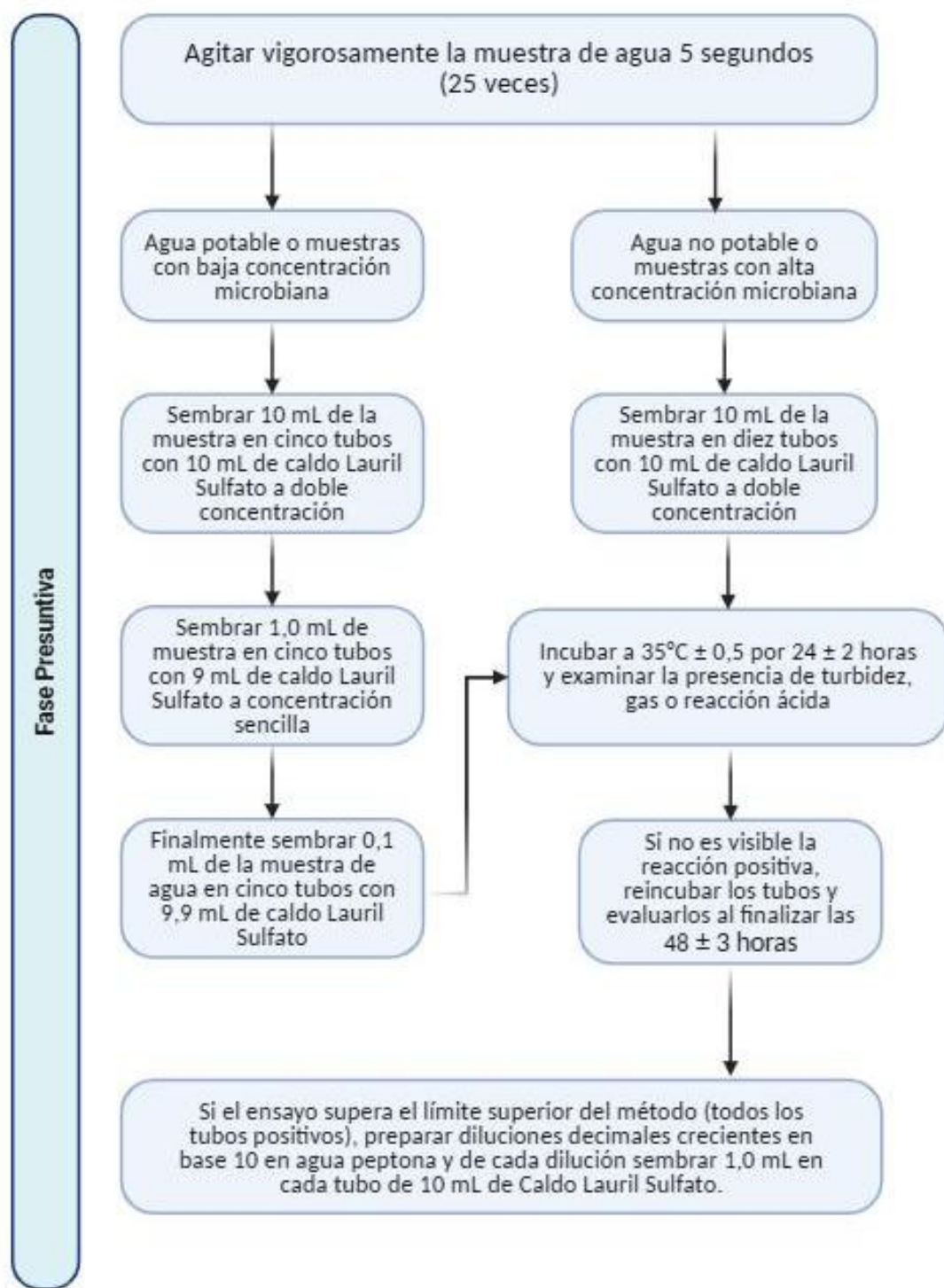
La prueba de coliformes termotolerantes utilizando medio EC es aplicable a investigaciones de agua potable, contaminación de arroyos, fuentes de agua cruda sin filtrar, sistemas de tratamiento de aguas residuales, aguas de baño, aguas marinas y monitoreo general de la calidad del agua. No utilice el medio EC para aislar directamente coliformes termotolerantes del agua; se requiere un enriquecimiento previo en un medio presuntivo para una recuperación óptima de los coliformes termotolerantes.

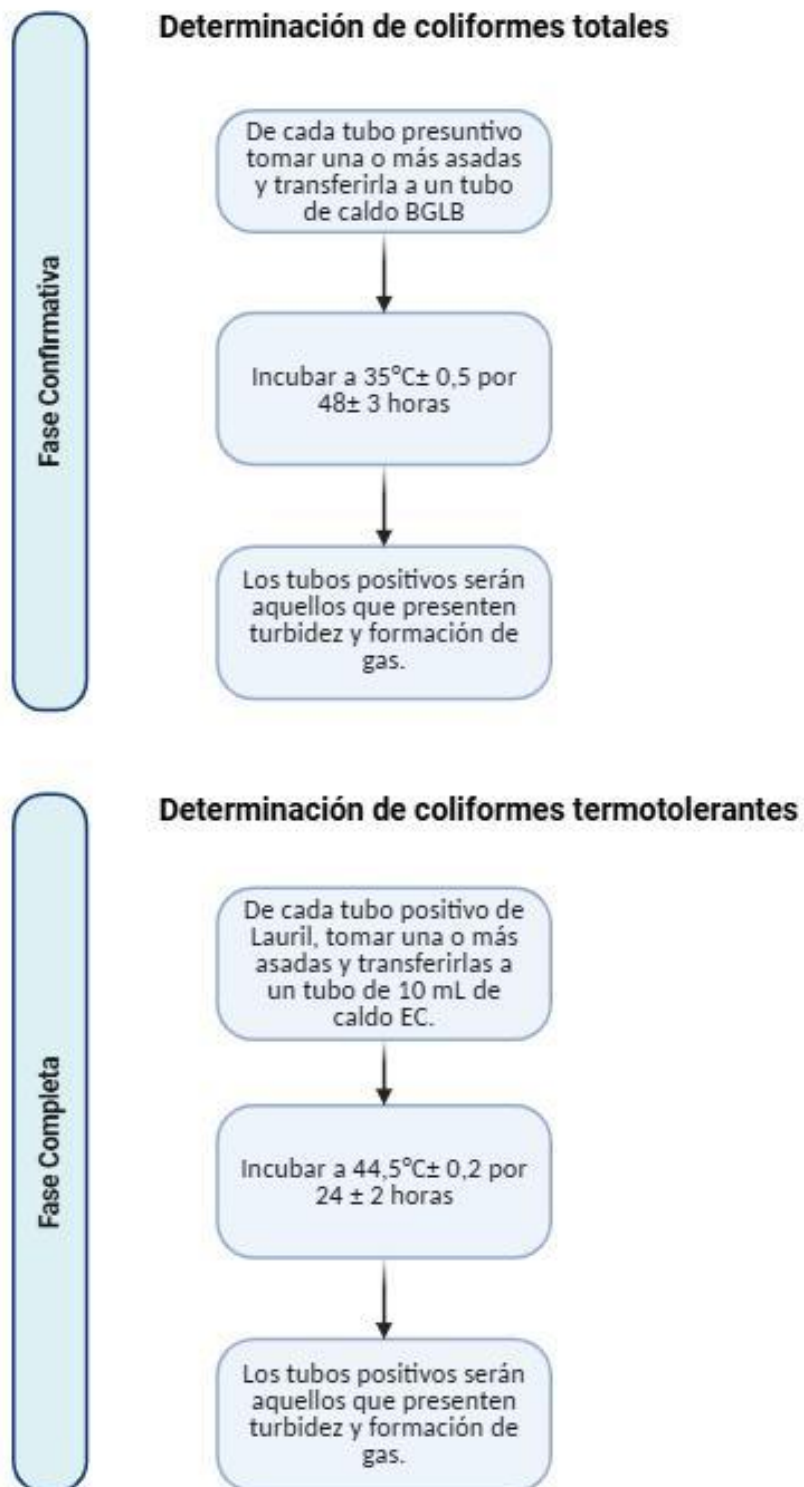
**8.3.1 Determinación de coliformes termotolerantes.**

Utilice un asa esteril para transferir una o mas asas del cultivo de los tubos presuntivos que muestren crecimiento con producción de acido o gas a un tubo de fermentación qu contenga EC, alternativamente se puede insertar un aplicador de madera estéril al menos 2,5 cm dentro del cultivo presuntivo. Incube los tubos de caldo EC inoculados 44 ,5 ± 0,2°C durante 24 ± 2 h.

La producción de gas con crecimiento en un cultivo de caldo EC en 24 ± 2 h o menos se considera una reacción positiva de coliformes (fecales ) termotolerantes . la falta de producción de gas (con poco o ningún crecimiento) constituye una reacción negativa. Calcule el NMP de coliformes termotolerantes a partir de los tubos positivos de caldo

# 9. ALGORITMOS.





10.

## CÁLCULOS Y RESULTADOS

|                                                     |             |                 |
|-----------------------------------------------------|-------------|-----------------|
| Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá |             |                 |
| D-7.2-03                                            | Versión: 09 | Página: 7 de 11 |

La estimación de la densidad microbiana se realiza conforme al método 9221 del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 24th edition*, utilizando las tablas correspondientes para el cálculo del Número Más Probable (NMP). En el caso de aguas potables, cuando se emplean 10 porciones de 10 mL, se utiliza la Tabla 9221:3. *MPN Index 95% Confidence Limits for All Combinations of Positive and Negative Results When Ten 10-mL Portions Are Used* ; mientras que para aguas no potables, cuando se aplican 5 tubos por dilución (10 mL, 1,0 mL y 0,1 mL), se utiliza la Tabla SM 9221:4. *MPN Index 95% Confidence Limits for Various Combinations Of Positive Results When Five Tubes Are Used per Dilution* . Si los volúmenes de muestra analizados coinciden con los establecidos en las tablas, el resultado se reporta directamente como NMP/100 mL según la combinación de tubos positivos y negativos obtenida. No obstante, cuando la serie de diluciones difiere de la indicada en las tablas, se debe seleccionar el valor de NMP correspondiente a la combinación de resultados positivos y ajustar el cálculo mediante la fórmula:

$$\frac{NMP}{100mL} = \left( \frac{tabla\ NMP}{100mL} \right) \times \frac{10}{V}$$

Dónde:

V= volumen de la porción de muestra a la dilución más baja seleccionada.

**11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD**

**11.1 Blancos de proceso:** Por cada lote de muestras analizadas se procesará un blanco utilizando agua destilada estéril. Este se analizará simultáneamente con las muestras, siguiendo el procedimiento estándar para la determinación de coliformes mediante la técnica de tubos múltiples, empleando tres tubos para la siembra directa. El blanco debe presentar ausencia total de crecimiento y producción de gas, confirmando la esterilidad de los reactivos, materiales y condiciones de trabajo.

**11.2. Control positivo:** Como verificación del desempeño del medio de cultivo y del procedimiento analítico, se utilizarán cepas de referencia certificadas, tales como *Escherichia coli* ATCC 25922 y/o *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. A partir de la suspensión estándar se inocularán tres series de cinco tubos, los cuales serán procesados conforme al procedimiento establecido para la determinación de coliformes. Este control se realizará por cada lote de medio preparado, y deberá evidenciar crecimiento y producción de gas en los medios correspondientes.

**11.3. Control negativo:** Para verificar la selectividad de los medios, se empleará una cepa no coliforme, como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se inocularán tres series de cinco tubos y se procesarán bajo el mismo procedimiento analítico. Este control se realizará por cada lote de medio preparado y deberá evidenciar ausencia de crecimiento y producción de gas en los medios selectivos para coliformes.

**11.4. Control de esterilidad del medio:** Por cada lote de medio preparado se incubará, sin inocular, una serie de tres tubos de cada uno de los siguientes medios: caldo Lauril Sulfato de Sodio (doble concentración), caldo Lauril Sulfato de Sodio (concentración simple), caldo Bilis Verde Brillante Lactosa (BGLB), caldo EC. Estos tubos se incubarán bajo las condiciones establecidas para cada medio y deberán permanecer sin turbidez ni producción de gas, confirmando la esterilidad del lote.

**11.5. Muestras duplicadas (control de precisión):** En cada corrida analítica se procesará una muestra por duplicado, seleccionada aleatoriamente. Los resultados obtenidos se evaluarán de acuerdo con el criterio de precisión establecido en las cartas de control del método. La variabilidad observada no deberá exceder los límites de control definidos (máximo dos puntos por encima del criterio de precisión), garantizando así la reproducibilidad del método.

**11.6. Muestras adicionadas o control de efecto matriz:** con el fin de evaluar posibles interferencias de la matriz, se analizará una muestra natural adicionada con una cepa de control interno. Se adicionará 1,0 mL de la suspensión estándar de E. coli a 100 mL de muestra, asegurando una concentración final entre 100 y 1000 NMP/100 mL. El porcentaje de recuperación esperado deberá encontrarse en el rango de 70 % a 130 %.

El efecto matriz se evaluará cada vez que se reciba una muestra de agua distinta a agua superficial, marina o subterránea. El porcentaje de recuperación (%R) se calculará mediante la siguiente expresión:

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

Dónde:

%R = Porcentaje de recuperación.

- = Promedio de la concentración.

Todo el control de calidad realizado se registra en el formato “R-7.4-30 CAPTURA DE DATOS COLIFORMES TUBOS MULTIPLES” en orden cronológico.

**11.4 Fase completada (confirmación):** empleada como control de calidad principalmente, pero también se puede emplear para verificar los valores de coliformes totales arrojados por este método. La fase completa se llevará a cabo trimestralmente sobre una muestra positiva para coliformes totales. Para esto, se inoculará en simultáneo los tubos positivos de Lauril sulfato en el caldo Brilla y en caldo EC. Los tubos de caldo Brilla positivos paralelos con cultivos de caldo EC negativos indican la presencia de coliformes no fecales. Los tubos paralelos positivos de EC y los cultivos negativos de caldo Brilla indican la presencia de coliformes termotolerantes (fecales) o *E. coli*, respectivamente.

Este control es registrado en “R-7.4-30 CAPTURA DE DATOS COLIFORMES TUBOS MULTIPLES”.

**11. MANTENIMIENTO**

El mantenimiento de las incubadoras se realiza entre 12 a 18 meses de acuerdo a lo evaluado por el laboratorio.

**12. BIBLIOGRAFÍA**

|                                                     |             |                 |
|-----------------------------------------------------|-------------|-----------------|
| Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá |             |                 |
| D-7.2-03                                            | Versión: 09 | Página: 9 de 11 |

- 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.
- Lightfoot, N. F y E. A Maier (Eds). 2002. Directrices para el aseguramiento de la calidad. Análisis Microbiológico de alimentos y aguas. Editorial Acribia S. A. Zaragoza- España.
- UAM, 2004. Microbiología aplicada, Manual del laboratorio. Apendice C. 7p.
- MERCK. 1994. Manual de medios de cultivo Agua peptonada (tamponada), Lauril sulfato de sodio, Caldo brilla. Pág194, 231, 197.

13. CONTROL DE CAMBIOS

| Fecha      | Resolución        | Versión | Detalle                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------|-------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12/12/2014 | 300-03-10-23-1864 | 01      | Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-03: MÉTODO ANALÍTICO DE DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES POR FERMENTACIÓN EN TUBO MÚLTIPLE MEDIANTE LA TÉCNICA DE NÚMERO MÁS PROBABLE PARA AGUA MARINA, SUPERFICIAL Y SUBTERRANEAS: SM 9221 B.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 24/06/2015 | 300-03-10-23-0789 | 02      | Se mejoró la descripción de los coliformes para el método del número más probable.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 05/10/2016 | 300-03-10-23-1303 | 03      | Se actualiza el logo corporativo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 15/08/2018 | 300-03-10-23-1436 | 04      | De acuerdo al Standard Methods Ed.23 de 2017 se especifican los siguientes cambios:<br>Se elimina la sección FISIOLOGÍA Y ESTRUCTURA.<br>Se adiciona Caldo EC a la sección REACTIVOS al igual que su respectiva preparación en la sección 6.<br>En la sección PROCEDIMIENTO para la determinación de coliformes tanto totales como termotolerantes se especifica para el preenriquecimiento tomar una asada o más de medio y transferirlas a un tubo de 10mL de caldo Brilla y EC respectivamente. Estos cambios se indicaron de igual modo en la sección ALGORITMO.<br>En la sección SEGUIMIENTO Y CONTROL se especifica para cuando aplica la realización del efecto matriz y la respectiva ecuación de cálculo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 27/05/2019 | 300-03-10-23-0615 | 05      | De acuerdo al Standard Methods Ed.23 de 2017 se tiene que:<br>En la sección 2.1 PRINCIPIO se adiciona el uso de caldo EC para la determinación de coliformes termotolerantes.<br>En la sección INSTRUMENTAL Y EQUIPOS se indica el uso de tubos y gradillas.<br>En la sección PROCEDIMIENTO se eliminó información correspondiente a tratamiento de muestras con mayor carga microbiana y se especificó que todas las muestras de agua serán tratadas de la misma forma, con una serie doble concentrada de Lauril sulfato de sodio y dos series de concentración simple, a las cuales se les añadirá 10; 1 y 0,1 ml respectivamente (de muestra). Además se modifica el ALGORITMO de acuerdo a lo indicado en el procedimiento.<br>En cuanto a la sección SEGUIMIENTO Y CONTROL:<br>Se adiciona control de esterilización por cada lote de medio preparado.<br>Se cambia el procesamiento de blancos de “cada muestreo” a “trimestralmente”.<br>En el control positivo se coloca como opción de trabajo la solución estándar de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , además se cambia el procesamiento de “por cada lote de muestras” a “trimestralmente”.<br>En el control negativo se cambia el uso de caldo Lauril por la solución estándar de <i>Enterococcus faecalis</i> , además se cambia el procesamiento de “por cada lote de muestras” a “trimestralmente”.<br>En cuanto a la elaboración de duplicados se cambia de “realizar sobre el 10% de muestras procesadas” a “realizar por corrida”.<br>El efecto matriz solo se llevará a cabo cada vez que ingrese una muestra de agua diferente a superficial. |
| 19/11/2019 | 300-03-10-23-1429 | 06      | Se elimina la subsección 3.2 – Definición, y la información allí contenida se adiciona a la sección 1 – DESCRPCIÓN. Además, se adiciona dentro de la estructura del método la sección 2 – ALCANCE, así: “El método de detección de coliformes totales y termotolerantes por fermentación en tubos múltiples es aplicable a agua superficial, marina, subterránea y potable, al igual que a muestras de lodos y sedimentos”.<br>Por otro lado, en la sección 10 – CÁLCULOS Y RESULTADOS se modifican el microorganismo utilizado para control de                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|            |                   |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------|-------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |                   |    | calidad negativo, pasando de <i>Enterococcus faecalis</i> a <i>Staphylococcus aureus</i> de acuerdo a lo indicado en la tabla 9020:VI del Standard Methods Ed.23 de 2017. Además, de acuerdo a la tabla 9221:IV se modifican las condiciones y expresión de cálculo. Además, en la sección 11 – SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD de acuerdo a lo establecido en la sección de calidad del capítulo 9 – (9020) del Standard Methods, se adiciona la fase de confirmación completa con el objetivo de verificar valores de coliformes totales y termotolerantes de manera trimestral.<br>También se incluye la sección 12 - MANTENIMIENTO relacionado con el método.<br>Se cambia la codificación del documento pasando de D-5.4-03 a D-7.2-03 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 | 07 | Se cambia el nombre del documento “MÉTODO ANALÍTICO DE DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES POR FERMENTACIÓN EN TUBO MÚLTIPLE MEDIANTE LA TÉCNICA DE NÚMERO MÁS PROBABLE PARA AGUA MARINA, SUPERFICIAL Y SUBTERRANEA: SM 9221 B y E”. a “MÉTODO ANALÍTICO DE DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES POR FERMENTACIÓN EN TUBO MÚLTIPLE MEDIANTE LA TÉCNICA DE NÚMERO MÁS PROBABLE: SM 9221 B y E”<br>Se documenta que en la carta de control de precisión, de los 20 puntos de control, dos pueden estar por fuera de este.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 09/07/2025 | 100-03-10-23-1338 | 08 | Se actualizó el ítem 13 Bibliografía, edición 24 th de Standard Methods (2023).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 20/04/2026 | 300-03-10-23-0797 | 09 | Se actualiza el apartado 4. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO especificando las directrices de almacenamiento, transporte y tiempo máximo de procesamiento de las muestras microbiológicas, en concordancia con la edición 24th de Standard Methods (2023). Se establecen condiciones de conservación, temperatura de transporte y tiempos máximos permitidos hasta el análisis, con el fin de garantizar la integridad microbiológica de la muestra y la validez de los resultados. Se incorpora el numeral 8.1.1 Aguas con baja carga microbiana (agua potable), en el cual se especifica que para muestras de agua potable deben analizarse 100 mL de muestra, distribuidos en diez tubos, cada uno conteniendo 10 mL de caldo Lauril Sulfato a doble concentración. Esta modificación armoniza el procedimiento con lo establecido en la Tabla 9221 correspondiente al método de tubos múltiples para aguas de baja carga microbiana. Se modifica la estructura del Item 9. ALGORITMOS, ajustando la secuencia de decisión para el análisis de aguas potables, en concordancia con el esquema de siembra de diez porciones de 10 mL en caldo Lauril Sulfato a doble concentración. Se adiciona Item 10. CÁLCULOS Y RESULTADO la Tabla 9221:3. MPN Index 95% Confidence Limits for All Combinations of Positive and Negative Results When Ten 10-mL Portions Are Used, para la interpretación de resultados en muestras de agua potable cuando se emplean diez porciones de 10 mL. Esta tabla se utilizará para la lectura de resultados obtenidos a partir de diez tubos con caldo Lauril Sulfato a doble concentración, conforme al esquema establecido para aguas potables. En el Item 11.5 Muestras duplicadas (control de precisión) se modifica el criterio de aceptación de precisión del método, dejando como único criterio el establecido en las cartas de control del laboratorio. Se elimina el criterio fijo del 20 %, adoptándose exclusivamente el control estadístico definido en las cartas control como parámetro de evaluación de la reproducibilidad del método. |

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