

	<b>RECuento DE <i>Escherichia coli</i> Y DE BACTERIAS COLIFORMES, MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA AGUAS CON BAJA CONCENTRACIÓN DE MICROBIOTA. ISO 9308-1:2014</b>	
	Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá	
	Código: D-7.2-06	Versión: 06
	Revisó: Subdirector Administrativo y Financiero (E)	Aprobó: Subdirector de Planeación y O.T
	Fecha: 31 de Octubre de 2024	Fecha: 31 de Octubre de 2024
	Resolución: 300-03-10-23-2200-2024	Páginas: 1 de 9

## 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 gran 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  $\beta$ -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 esta 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  $\beta$ -D-galactosidasa presenta la  $\beta$ -glucoronidasa 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

Este método es aplicable para aguas con bajo contenido de carga microbiana, como lo son agua de piscina desinfectada, potable, lavado de fruta y subterránea.

### 3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

#### 3.1 Principio

Este método se fundamenta en determinar la presencia de *E.coli* y coliformes totales en agua por medio de la filtración de la misma a través de una membrana de celulosa de tamaño de poro de 0,45 µm, la cual permite la retención de microorganismos y el cultivo de estos, para la diferenciación de las bacterias de interés estas son cultivadas en medio de cultivo cromogénico selectivo y diferenciador para coliformes.

#### 3.2 Interferencias

La alta presencia de microorganismos no coliformes y la turbidez son los principales interferentes en este metodo por tal motivo no se recomienda realizar pruebas de filtración por membrana para ítems de ensayo:

- 1.Con gran cantidad de material en suspensión.
- 2.Con altas concentraciones de bacterias heterótrofas, ya que estas pueden interferir con el crecimiento de las bacterias coliformes.
- 3.Con altas concentraciones de metales y compuestos orgánicos tóxicos, que inhiben el crecimiento de los coliformes.

Este método no es adecuado para ítems de ensayo de aguas superficiales y pozos poco profundos.

### 4. TOMA DE ÍTEMS DE ENSAYO Y ALMACENAMIENTO

El ítem de ensayo será tomado en frascos plásticos o de vidrio con capacidad de 250mL a 500mL, boca ancha, estériles con adición de 100 uL de tiosulfato de sodio al 3% por cada 120 mL de agua, para el caso de agua de consumo o tratada y 100 uL tiosulfato al 10% por cada 120 mL para agua de piscina, se debe tener en cuenta que el llenado de los recipientes debe ser dos terceras partes de la capacidad del envase.

- **Para agua de consumo o potable con fines normativos:** El ítem de ensayo debe ser transportado a temperatura  $\leq 10^{\circ}\text{C}$  y ser conservado a la misma temperatura en nevera destinada para ese propósito. El ítem de ensayo debe

ser analizado en un tiempo no mayor a 30 horas contadas a partir de la hora de toma del ítem de ensayo.

- **Agua no potable con fines normativos:** Las aguas procedentes de manantiales, arroyos contaminados, aguas recreativa y aguas residuales deben ser transportadas frías pero no congeladas ( $<10^{\circ}\text{C}$ ) y no exceder 8 h entre la recolección y el análisis de laboratorio. Cuando los ítems de ensayo lleguen al laboratorio, refrigérelas, y procese los ítems de ensayo dentro de las 2 h.
- **Para otro tipo de agua para propósitos de no conformidad:** El ítem de ensayo debe conservarse a temperatura  $\leq 10^{\circ}\text{C}$  y no debe exceder las 24 horas entre su toma y procesamiento.

No se deben almacenarse matrices de agua tratada y cruda juntas, con el fin de evitar contaminación cruzada.

## 5. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

- Manifold para filtración
- Bomba de vacío.
- Papel kraft.
- Autoclave.
- Membranas de 0,45 micras estériles.
- Pinzas estériles.
- Incubadora.
- Mechero.
- Pipetas volumétricas de 10mL.
- Probeta 100mL.

## 6. REACTIVOS

- Agar chromocult.
- Agua peptonada.

## 7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Agar Chromocult:** Medio de cultivo cromogénico selectivo y diferenciador, el cual favorece el crecimiento de las bacterias gram negativos debido a la presencia de tergitol (inhibidor de gram positivas), además de permitir la

diferenciación de los coliformes totales y *Escherichia coli* al proporcionar una coloración roja y azul respectivamente.

**Preparación:** Disolver 26,5 g/Litro de agua destilada en frasco shott, calentar esta solución en baño maría. No autoclavar ni sobre calentar, verificar que el pH se encuentra entre  $6,8 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Verter posteriormente en cajas de Petri y esperar hasta que se solidifique.

- **Agua Peptonada 0.1%:** Caldo para el crecimiento previo no selectivo de bacterias.

**Preparación:** Disolver 2.55g de Buffered Peptone Water en 1L ( Equivalente a 1g/L de peptone) distribuir eventualmente en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ . El pH debe estar a  $7,2 \pm 0,1$ .

## 8. PROCEDIMIENTO

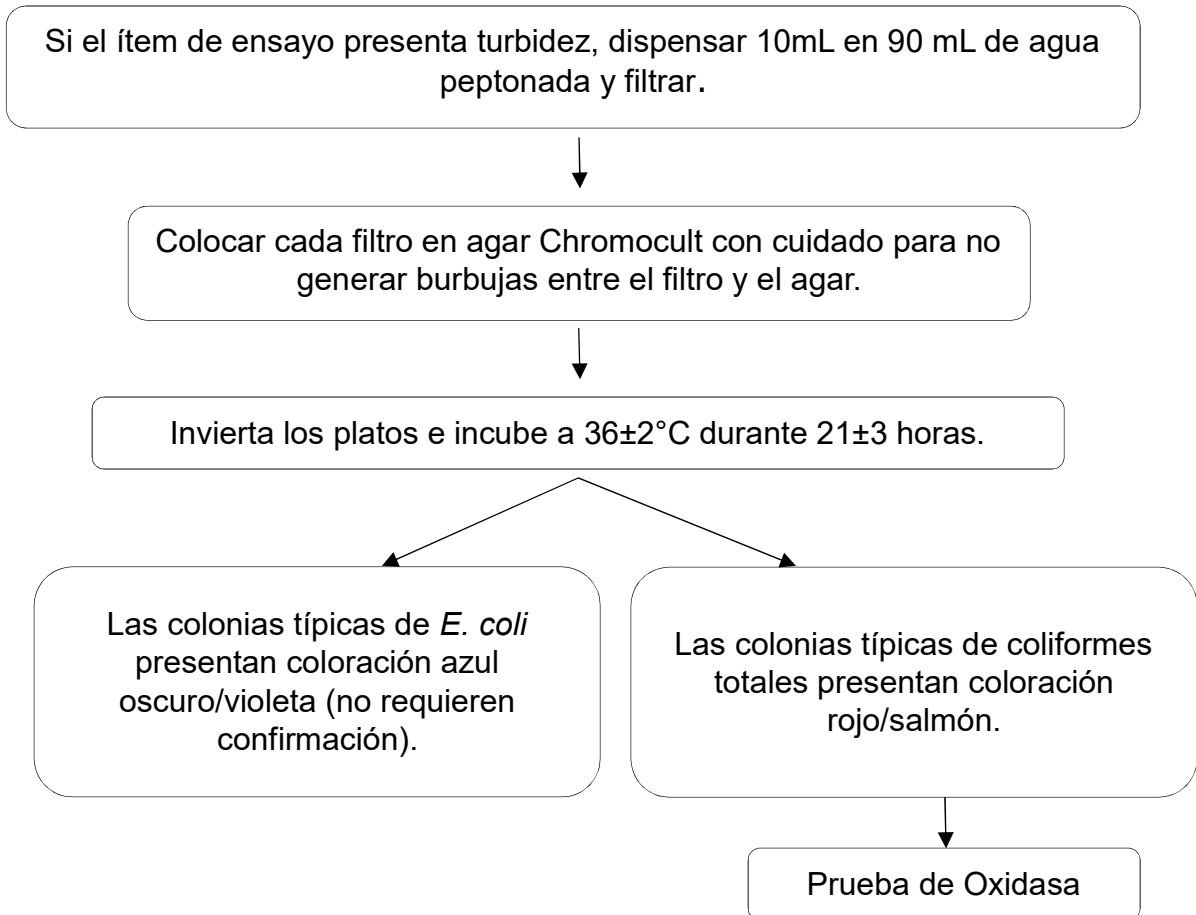
- Filtrar 100ml para agua de consumo y agua de piscina, o menos de 100mL para agua natural (para ítems de ensayo con alta turbidez filtrar 10ml y completar con agua peptonada) a través de una membrana de 0,45 micras.
- Colocar cada filtro sobre agar chromocult, de tal forma que no se generen burbujas de aire entre el filtro y la superficie del agar.
- Invierta la caja petri e incube a  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $21 \pm 3$  horas.
- Determinar la presencia de coliformes totales y *E. coli*, teniendo en cuenta que, las colonias típicas de coliformes presentan una coloración que va de rosado a rojo, mientras que, las de *E. coli* presentan una coloración que va de violeta - azul oscura.
- Para confirmar las bacterias coliformes presuntivas distintas a *E. coli*, realizar ensayo de oxidasa (según el fabricante), aquellas colonias oxidasa negativas, es decir, al frotarlas en las tirillas de oxidasa no presenten cambios de color. Aquellas colonias oxidasa positiva (coloración violeta tirilla de oxidasa) serán descartadas serán descartadas como coliformes.
- Preferiblemente se realiza este ensayo sobre todas o al menos sobre 10 colonias de color rosa a rojo.
- Reportar la concentración del microorganismo de interés en UFC/100mL.

## 9. ALGORITMO

Filtrar 100mL de agua natural, con filtro de 0,45micras.



Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.2-06	Versión: 06	Página: 4 de 9



## 10. CÁLCULOS Y RESULTADOS I

A partir del número de colonias confirmadas resultante del recuento en el filtro de membrana se determina el número de coliformes totales y *E. coli* presentes en 100mL (o el volumen filtrado). El recuento de coliformes totales corresponde a la sumatoria de colonias rojas/salmon y las colonias violeta/azul. El reporte se realiza en UFC/100mL, en caso de requerir el conteo en UFF/mL realizar la siguiente fórmula.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\# \text{ de colonias positivas contadas } \times \text{ factor de dilución}}{\text{Volumen de siembra (mL)}}$$

## 11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

Para cada lote de medio de cultivo nuevo y una vez al mes del medio preparado:

### Control Negativo

1. Durante el análisis de agua y con el fin de descartar cualquier contaminación externa, se realiza un control negativo que garantice una correcta esterilidad en el proceso de preparación y montaje del método, para ello se incuba una placa del medio de cultivo (agar chromocult) sin inocular.
2. En el caso de los caldos nutritivos (Agua peptonada), estos serán dejados 24 horas en una incubadora, con el fin de analizar si hay un posible crecimiento de microorganismos antes de su inoculación.

### Control de Selectividad y Especificidad

El agar chromocult es un medio de cultivo cromogénico diferencial el cual, no es 100% selectivo para Coliformes totales y *E. Coli*, permitiendo el crecimiento de otros microorganismos. Con el fin de evaluar la selectividad del medio se utiliza la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 la cual, presenta una inhibición total o parcial.

Para evaluar la especificidad del medio se usa la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la cual es capaz de crecer generando colonias incoloras.

**Tabla 1.** Morfología macroscópica en agar Chromocult control de selectividad y especificidad.

CEPA CERTIFICADA	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Crecimiento nulo o escaso con bordes definidos de coloración blanco/beige. <b>Morfología microscópica:</b> pequeños cocos gram positivos en cadena. <b>Bioquímica:</b> Catalasa negativa.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Crecimiento de colonias incoloras <b>Morfología microscópica:</b> bacilos gram negativos pequeños. <b>Bioquímica:</b> oxidasa positiva.

### Control Positivo

Se procesan cepas ATCC de acuerdo al método en conjunto con los ítems de ensayo de tal manera que lleven la misma trazabilidad de los ensayos.

**Tabla 1. Morfología macroscópica en agar Chromocult control positivo.**

CEPA CERTIFICADA	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Crecimiento óptimo de colonias redondas cóncavas de coloración azul oscuro/violeta. <b>Morfología microscópica:</b> pequeños bacilos gram negativos. <b>Bioquímica:</b> Citrato negativo.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Crecimiento óptimo de colonias redondas mucoides de coloración rojo/salmón. <b>Morfología microscópica:</b> bacilos regulares gram negativos. <b>Bioquímica:</b> Citrato positivo.

Se realiza un duplicado del ítem de ensayo semanalmente; tomando una ítem al azar.

**Análisis de Efecto matriz:** se realiza mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de un ítem de ensayo de agua añadida con una concentración de 10-100 bacterias/mL de *E. coli*.

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

Dónde:

%R = Porcentaje de recuperación

$\bar{x}$  = Promedio de la concentración

El efecto matriz es analizado cada vez que ingresa una matriz diferente de agua potable al laboratorio. Esta nueva matriz será adicionada con el microorganismo blanco del método. EL criterio de aceptación corresponde al %R entre el 70%-80%.

Todo el control de calidad realizado se registra en el formato “R-7.4-22 CAPTURA DE DATOS COLIFORMES FILTRACIÓN” en orden cronológico.

## 12. MANTENIMIENTO

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

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- ISO 9308-1:2014. Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION: WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater, 24 TH EDITION.2023. Washington DC. 9222.
- 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-Colifot-fecales-Ecoli-NMP\\_6529.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colifot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf).
- UNE-EN ISO 9308-1:2014. Recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido microbiota.

### 14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
12/12/2014	300-03-10-23-1864	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-06: MÉTODO ANALÍTICO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA LA DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> , SM 9222 B.
05/10/2016	300-03-10-23-1303	02	Se actualiza el logo corporativo.
25/05/2017	300-03-10-23-0590	03	Se hacen ajustes relacionados con la temperatura de incubación, el almacenamiento y transporte y se extiende y define el control de calidad.
15/08/2018	300-03-10-23-1436	04	Se cambia el método de referencia SM empleado para la realización de la detección de coliformes y <i>E. coli</i> en muestras con baja concentración de microbiota, por la norma ISO 9308-1:2014. En la sección INTERFERENCIAS se especifica la no aplicación del método para aguas: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Con alto contenido de material suspendido.</li> <li>- Con altas concentraciones de bacterias heterótrofas.</li> <li>- Con alto contenido de metales y compuestos orgánicos tóxicos.</li> </ul> De acuerdo al SM Ed. 23 de 2017 se tiene que, en la sección de TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO se cambia la concentración de tiosulfato usado para decolorar muestras de agua de consumo y se especifica la concentración para muestras



			<p>de aguas de piscina. Además se cambiaron las temperaturas y los tiempos de transporte y almacenamiento de acuerdo al SM. En la sección PROCEDIMIENTO se ajusta el volumen a filtrar para los diferentes tipos de agua que aplican en presente ensayo. También se cambia la temperatura de incubación de las cajas de Petri utilizadas. Por otro lado se indica la confirmación de coliformes totales diferentes de <i>E. coli</i> y se especifican las unidades de concentración para expresar los resultados. La sección de ALGORITMO se modifica de acuerdo a los cambios indicados en el procedimiento.</p> <p>En la sección de SEGUIMIENTO Y CONTROL se ajustan los términos para la realización del Control de especificidad y selectividad de acuerdo a la ISO, así como también se adiciona el control de efecto matriz para matrices no validadas experimentalmente.</p>
19/11/2019	300-03-10-23-1429	05	<p>Se elimina la subsección 3.2 - Definición y se unifica con el criterio de descripción de la sección 1.</p> <p>Por otro lado, se adiciona dentro de la estructura del método la sección 2 – ALCANCE, así: “Este método es aplicable para aguas con bajo contenido de carga microbiana, es decir, para aguas: tratada, envasada, lavado de fruta, subterránea”. También se incluye la sección 12 - MANTENIMIENTO relacionado con el método. Finalmente, en la sección 11 – SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD se modifica la periodicidad de realización de los duplicados, pasando de diario a semanal. Esto debido a la periodicidad con la que se realiza la prueba de acuerdo a las solicitudes de los usuarios.</p> <p>Se cambia la codificación del documento pasando de D-5.4-06 a D-7.2-06 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.</p>
31/10/2024	300-03-10-23-2200	06	<p>Se realiza modificación y actualización de los ítems del procedimiento con base al método de referencia ISO 9308-1:2014. Empleando terminología técnica, tables e imágenes para mejorar la comprensión del procedimiento.</p>

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