



## 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.

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá

Código: D-7.2-03

Versión: 08

Revisó: Subdirector de Planeación y O.T.

Aprobó: Director General (E).

Fecha: 09 de Julio de 2025

Fecha: 09 de Julio de 2025

Resolución: 100-03-10-23-1338-2025

Páginas: 1 de 10

### 1. DESCRIPCIÓN

Las bacterias coliformes se han utilizado durante mucho tiempo como indicadores de calidad del agua basados en la premisa de que, dado que estos organismos están presentes en los intestinos de los animales de sangre caliente, su presencia en el agua podría indicar que ha ocurrido una contaminación fecal reciente.

El grupo coliformes incluye una amplia variedad de bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gram negativos 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 termotolerante, 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 técnica se basa en la capacidad fermentativa del grupo coliformes y la utilización de múltiples tubos para su análisis. La determinación de coliformes consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa. En la fase presuntiva se utiliza el caldo Lauril sulfato de sodio, el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentran presentes en las muestras de agua y que sean capaces de usar la lactosa como fuente de carbono. Por su parte, en la fase confirmativa para coliformes totales se emplea caldo lactosa bilis verde brillante que es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante. La determinación de coliformes se realiza mediante el análisis de los tubos positivos de la prueba confirmativa, mientras que la

determinación de coliformes termotolerantes se realiza en caldo EC que se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de  $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  por un periodo de  $24 \pm 2$  h.

Cuando se usan tubos múltiples, la densidad de coliformes se estima a través de una tabla de números más probables (NMP). Este número, generado mediante fórmulas de probabilidad específicas, es una estimación de la densidad media de coliformes en la muestra.

### **3.2 Interferencias**

La interferencia en esta prueba puede estar relacionada con una mala homogenización de la muestra antes de tomar la alícuota a analizar, una baja densidad del microorganismo de interés en la muestra de agua, además del empleo de una serie muy corta de tubos.

## **4. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO**

El volumen de muestra a recolectar es de 100mL en un recipiente previamente esterilizado. Durante la toma de muestra, el recipiente es colocado de manera cerrada bajo la superficie del agua y la tapa es abierta de manera parcial a una profundidad de aproximadamente 30cm para permitir el llenado del frasco en 2/3 partes con la muestra. Una vez lleno se cierra el frasco evitando que las manos de la persona que recolecta la muestra contaminen la boca del mismo.

Cuando la muestra sea tomada desde una embarcación se realizará en contracorriente con el fin de evitar la contaminación. En ningún caso el envase puede llenarse completamente, siempre se debe dejar un espacio de aire para que la muestra pueda homogeneizarse mediante agitación.

Cuando se requieren muestras de profundidad se emplean botellas Nansen o Niskin, las cuales deben ser previamente desinfectadas. Después de la recolección de la muestra es necesario dejar correr un poco de la muestra antes de tomar el volumen requerido para el análisis en el recipiente de muestreo.

Las muestras microbiológicas son almacenadas en una nevera, garantizando su conservación a temperatura  $<10^{\circ}\text{C}$  durante el transporte, son llevadas al laboratorio, donde serán procesadas lo antes posible ( $\leq 2\text{h}$ ).

## **5. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS**

- Cabina de flujo laminar.
- Baño María.
- Micropipeta de 100 a 1000 $\mu\text{L}$ . y de 1 a 10mL.
- Asa redonda.
- Incubadora a  $35^{\circ}\text{C}$ .

- 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  $7,2 \pm 0,1$ .

**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. Preparación: Disolver 35,5 g/L o más de caldo, distribuir en tubos de ensayo provistos de campanas de Durham y esterilizar en autoclave (15min a 121°C), pH 6,8.

**Caldo lactosa bilis verde brillante:** Caldo selectivo para crecimiento y enumeración de coliformes como *Escherichia coli* en aguas, leches, alimentos y otros materiales mediante el número más probable. Preparación: Disolver 40 g/L, distribuir en tubos de ensayo provistos de campanas de Durham y esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C).

**Caldo EC:** Caldo selectivo para Coliformes y *E. coli* en aguas, alimentos y otros materiales.

Preparación: Disolver 37 g/L o bien 74 g/L, distribuir en tubos provistos de campanas de Durham y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. pH  $6,9 \pm 0,1$ .

**Tubos con 10mL de medios de cultivo:** Por cada muestra se requiere al menos 3 series de 5 tubos de caldo lauril sulfato de sodio, caldo brilla y caldo EC con campana de Durham.

**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 todas las muestras de agua cruda deben emplearse mínimo tres series de cinco

tubos de dilución (10, 1 y 0,1mL). Previa dilución de la muestra teniendo en cuenta su origen y presunta carga contaminante. Todos los tubos empleados en esta técnica deben contener campanas de Durham de forma invertida en su interior, destinadas a la recolección del gas producido en el proceso de fermentación. La muestra debe agitarse vigorosamente de 25 a 30 veces y posteriormente ser inoculadas en cada serie con volúmenes de muestra determinado.

### **Fase presuntiva**

Sembrar 10 mL de la muestra en cinco (5) tubos con 10 mL de caldo lauril sulfato a doble concentración. Posteriormente sembrar 1,0 mL de muestra en cinco (5) tubos con 9 mL caldo lauril sulfato concentración sencilla y finalmente sembrar 0,1 mL de la muestra de agua en cinco (5) tubos con 9,9 mL caldo lauril sulfato.

Después de inoculados los tubos, incubar a  $35 \pm 0,5$  °C por  $24 \pm 2$  horas. Finalizado el tiempo, examinar la presencia de turbidez y producción de gas en los tubos, si esta reacción no es visible reincubar los tubos y evaluarlos al finalizar  $48 \pm 3$  horas.

Finalizado el tiempo de incubación se consideran tubos presuntivos positivos aquellos que presentan turbidez.

### **Fase confirmativa:**

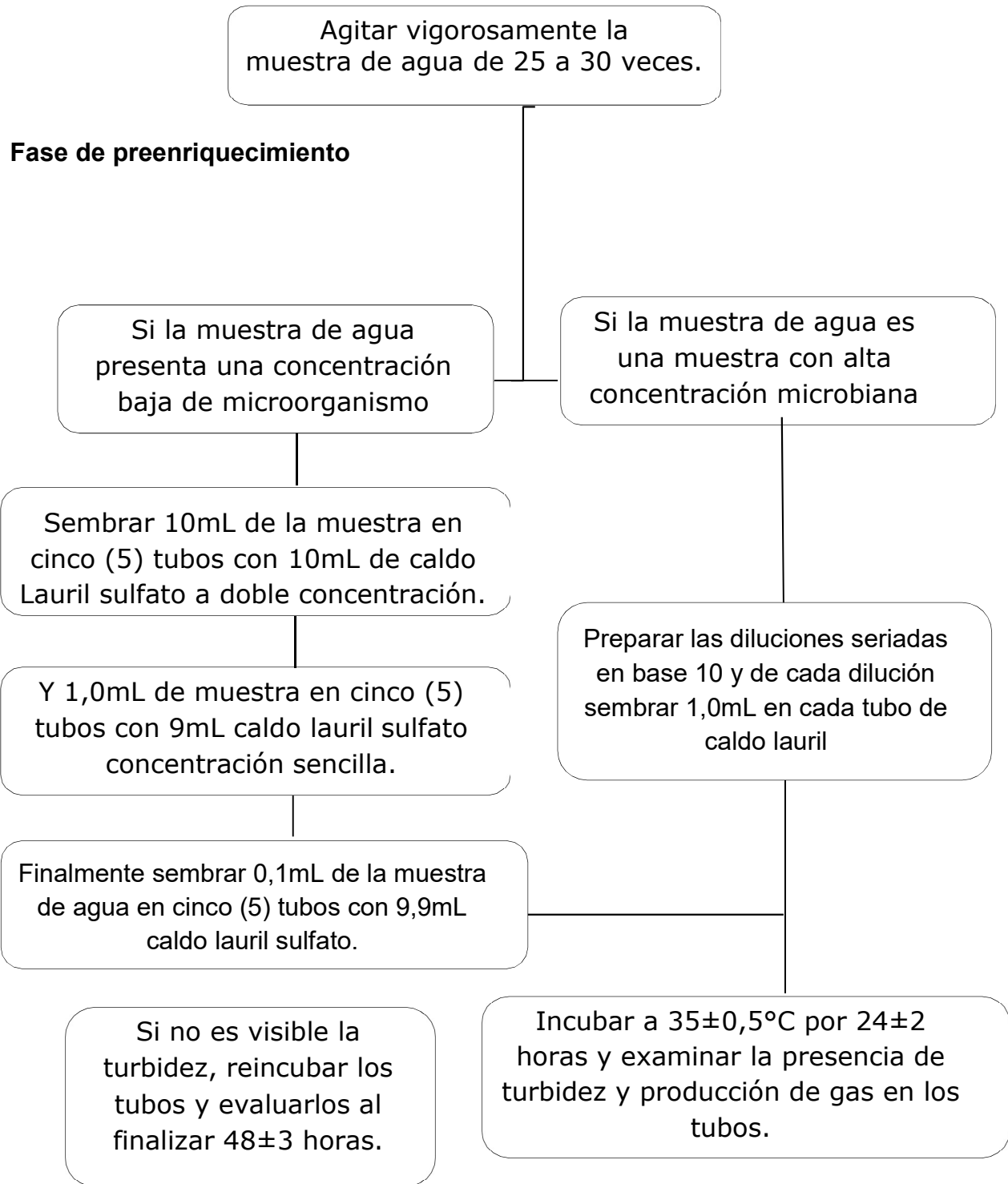
#### **Determinación de coliformes totales**

De cada tubo positivo provenientes de la fase presuntiva, tomar una asada o más de medio y transferirlas a un tubo de 10mL de caldo Brilla de concentración normal. Incubar a  $35 \pm 0,5$  por  $24$  a  $48 \pm 3$  horas. Finalizado el tiempo de incubación, determinar los tubos positivos como aquellos que presenten turbidez y formación de gas.

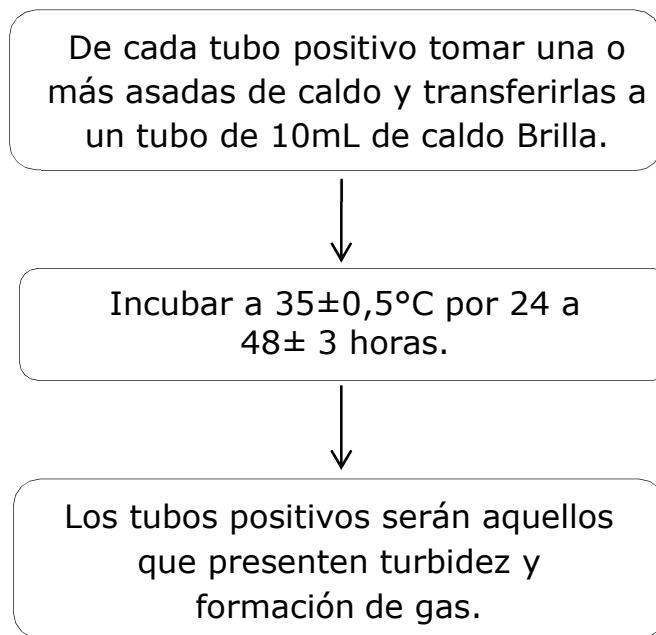
#### **Determinación de coliformes termotolerantes**

De cada tubo positivo proveniente de caldo Brilla o Lauril tomar una o más asadas y transferirlas a un tubo de 10 mL de caldo EC. Incubar a  $44,5 \pm 0,2$  por un periodo de  $24 \pm 2$  horas en baño maría o incubadora. Finalizado el tiempo de incubación determinar los tubos positivos como aquellos que presenten turbidez y formación de gas. La falta de producción de gas y poco o nulo crecimiento constituyen una reacción negativa. La presencia de gas y turbidez significa presencia de coliformes fecales. La alta turbidez sin producción de gas sugiere la presencia de Coliformes termotolerantes o *E. coli*, en dicho caso, se debe usar un medio diferente como EMB para confirmar.

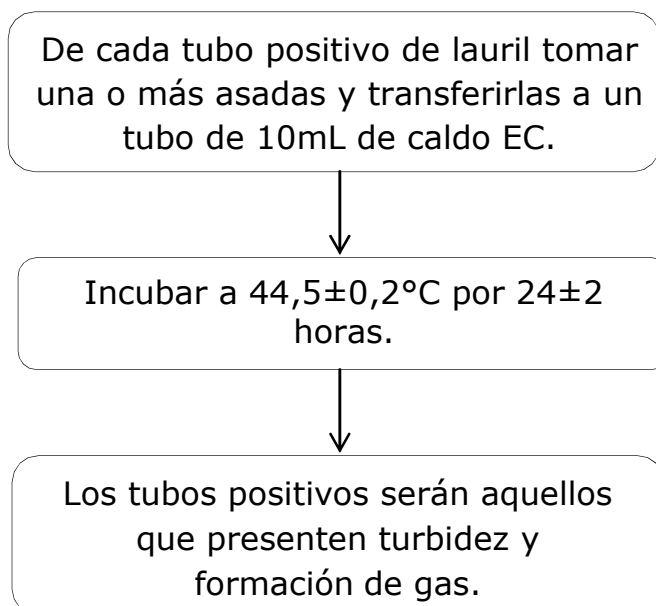
## 9. ALGORITMOS



### Determinación de coliformes totales



### Determinación de Coliformes termotolerantes



## 10. CÁLCULOS Y RESULTADOS

Cuando se analizan cinco volúmenes de 10 ml, cinco de 1,0 ml y cinco porciones de muestra de 0,1 ml de agua no potable, se estima la densidad microbiana mediante lo establecido en la tabla 9221:IV del Standard Methods que ilustra los valores de MPN para combinaciones de resultados positivos y negativos (APHA, 2023). Si los volúmenes de porción de muestra analizados son idénticos a los que se encuentran en las tablas, informe el valor correspondiente a la combinación apropiada de resultados positivos y negativos como NMP / 100 mL. Sin embargo, si la serie de diluciones decimales es diferente, seleccione el valor de NMP en la tabla 9221:IV que corresponda a la combinación de resultados positivos y calcule la NMP real utilizando la siguiente fórmula:

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

Dónde:

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

## 11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

### Control de calidad del medio de cultivo:

**Blancos:** trimestralmente un frasco con agua de dilución estéril será llevado a campo y se analizará junto con las muestras recolectadas siguiendo el procedimiento estándar usando tres tubos para la siembra directa de la muestra.

**Control positivo:** De la solución estándar de *E. coli* ATCC 25922 y/o *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 se inocula tres series de cinco tubos. Los tubos son procesados siguiendo el procedimiento establecido para la determinación de Coliformes. El control positivo se realizará trimestralmente.

**Control negativo:** De la solución estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se inocula tres series de cinco tubos. Los tubos son procesados siguiendo el procedimiento establecido para la determinación de Coliformes. El control negativo se realizará trimestralmente.

**Control de esterilización:** Por cada lote de medio preparado, se incuba una serie de tres tubos con caldo Lauril sulfato de sodio doble concentrado, caldo Lauril sulfato concentración simple, caldo Verde brilla y caldo EC.

**Muestras duplicadas:** Realizar un duplicado por corrida, 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

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.2-03	Versión: 08	Página: 7 de 10

**Muestras adicionadas o control de efecto matriz:** realizar el análisis de una muestra natural adicionada con una cepa de control interno. La cantidad adicionada será tal que garantice una concentración final entre 100-1000NMP/ 100mL. Para esto adicionar 1,0mL del estándar de *E. coli* a 100mL la muestra. Se espera que el porcentaje de recuperación sea al menos de un 70%.

El efecto matriz se lleva a cabo cada vez que ingrese una muestra de agua diferente a Agua superficial, marina o subterránea, para ello se calcula el porcentaje de recuperación, así:

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

Dónde:

%R = Porcentaje de recuperación.

$\bar{x}$  = 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.

**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”.

## 12. MANTENIMIENTO

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

## 13. 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:

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.2-03	Versión: 08	Página: 8 de 10



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.

## 14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
12/12/2014	300-03-10-23-1864	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-03: 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: Se elimina la sección FISIOLÓGICA Y ESTRUCTURA. Se adiciona Caldo EC a la sección REACTIVOS al igual que su respectiva preparación en la sección 6. En la sección PROCEDIMIENTO para la determinación de coliformes tanto totales como termotolerantes se especifica para el pre-enriquecimiento 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. 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: En la sección 2.1 PRINCIPIO se adiciona el uso de caldo EC para la determinación de coliformes termotolerantes. En la sección INSTRUMENTAL Y EQUIPOS se indica el uso de tubos y gradillas. 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. En cuanto a la sección SEGUIMIENTO Y CONTROL: Se adiciona control de esterilización por cada lote de medio preparado. Se cambia el procesamiento de blancos de “cada muestreo” a “trimestralmente”. 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”. 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

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá

D-7.2-03

Versión: 08

Página: 9 de 10

			<p>“trimestralmente”.</p> <p>En cuanto a la elaboración de duplicados se cambia de “realizar sobre el 10% de muestras procesadas” a “realizar por corrida”.</p> <p>El efecto matriz solo se llevará a cabo cada vez que ingrese una muestra de agua diferente a superficial.</p>
19/11/2019	300-03-10-23-1429	06	<p>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”.</p> <p>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.</p> <p>También se incluye la sección 12 - MANTENIMIENTO relacionado con el método.</p> <p>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.</p>
06/10/2020	300-03-10-23-1125	07	<p>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”</p> <p>Se documenta que en la carta de control de precisión, de los 20 puntos de control, dos pueden estar por fuera de este.</p>
09/07/2025	100-03-10-23-1338	08	<p>Se actualizó el ítem 13 Bibliografía, edición 24 th de Standard Methods (2023).</p>

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