	<b>MÉTODO ANALÍTICO PRUEBA ENZIMA SUSTRATO PARA COLIFORMES TOTALES Y <i>Escherichia coli</i>, SM 9223 B. VARIABLE PRESENCIA - AUSENCIA</b>	
	Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá	
	Código: D-7.2-46	Versión: 03
	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 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  $\beta$ -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 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  $\beta$ -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

El método analítico de enzima sustrato variable presencia-ausencia se recomiendan para el análisis de agua potable, agua de manantial, agua subterránea y aguas residuales en caso que se requiera de un resultado cualitativo del grupo coliforme total y *E. coli*.

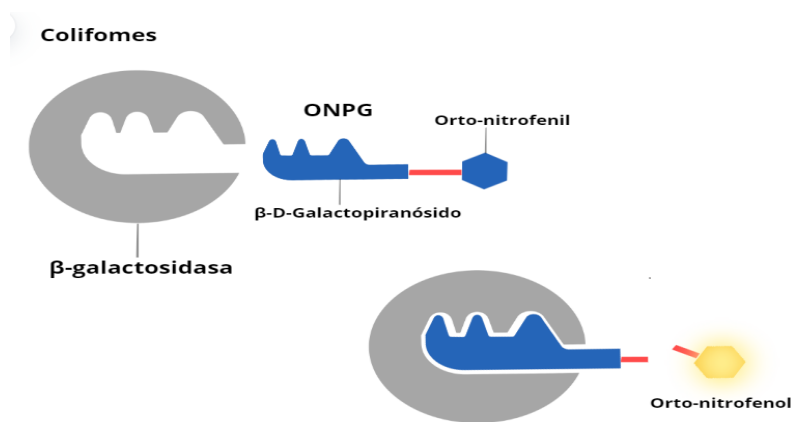
### 3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

#### 3.1 Principio

El reactivo Colilert 18 o 24, proporcionan dos nutrientes indicadores específicos: ONPG (Orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido) y MUG (4-metil-umbeliferil-beta-D-glucoronido) para detectar simultáneamente coliformes totales y *E. Coli*. El indicador ONPG actúa como fuente principal de carbono para el desarrollo de bacterias coliformes a través de la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, presente en este grupo, generando como resultado un producto cromóforo que produce cambio de color en el medio.

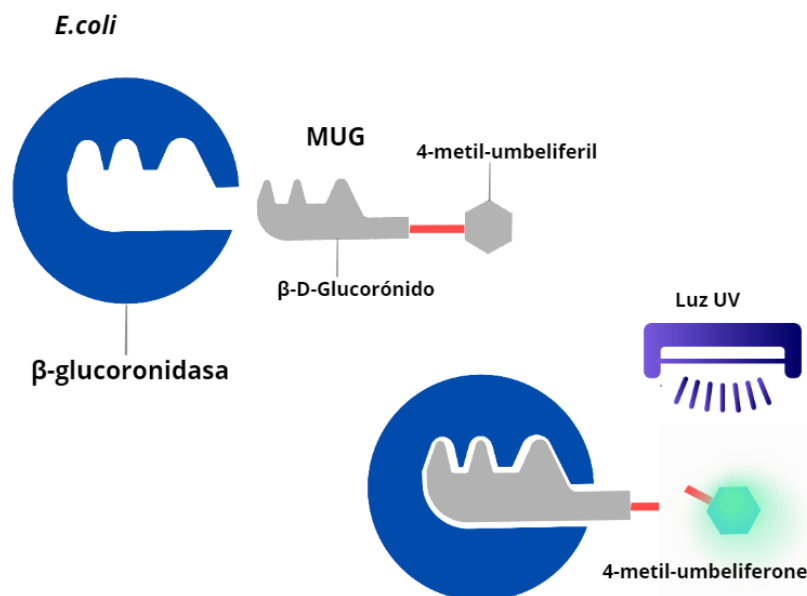
Como la mayoría de los coliformes no poseen estas enzimas, no pueden crecer ni interferir. Los escasos coliformes que tienen estas enzimas están suprimidos de manera selectiva por los altos niveles de sales, detergentes u otros agentes presentes en la matriz formulada de Colilert.

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



FUENTE: *propia*.

**Figura 2.** Fundamento de la técnica sustrato definido para la detección de *E.coli*.



FUENTE: propia.

### 3.3 Interferencias

Bacterias no coliformes, tales como *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp. y *Pseudomonas* sp., pueden producir pequeñas cantidades de  $\beta$ -D-galactosidasa, pero son inhibidas y generalmente no producen respuesta positiva a los tiempos de incubación cuando se encuentran en concentraciones menores a  $10^6$  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  $\beta$ -D-galactosidasa, dichos resultados serán considerados como negativos.

Las matrices de agua que contienen altas concentraciones de materia orgánica (ácido húmico) pueden presentar coloración amarilla, 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-24 o Colilert-18 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 los ítems de ensayo con exceso de cloro, se puede observar un destello azul al agregar medios Colilert-24 o Colilert-18. Si esto ocurre, considere que los ítems de ensayo no son válidos y suspenda la prueba. 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  $\beta$ -D-galactosidasa débil, lo que causa resultados falsos positivos.

#### 4. TOMA DE ÍTEM DE ENSAYO 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  $\mu$ L tiosulfato de sodio al 3% por cada 120mL de agua y llenado siguiendo el procedimiento de PROTOCOLO DE MUESTREO D-7.3-01, dejando un espacio libre adecuado (2,5 cm) para garantizar una buena homogenización antes del análisis.

**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 fríos, pero no congelados (<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 8 horas entre la recolección y el análisis de laboratorio. Cuando lleguen al laboratorio, refrigérelas y procese dentro de las 2 horas siguientes.

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

## 5. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

- Autoclave.
- Incubadora.
- Cámara de UV.
- Cabina de flujo laminar horizontal.
- Mechero.
- Probeta de 100 mL.
- Micropipetas volumétricas de 1000 µL y 10 mL.
- Frascos de vidrio con capacidad de 100-250 mL adicionados con tiosulfato de sodio al 3% para ítem de ensayo s de agua tratada.
- Tubos estériles.

## 6. REACTIVOS

- Colilert 18 o 24 IDEXX.
- Agua destilada estéril, no tamponada, libre de oxidantes.
- *Escherchia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Comparador P/A IDEXX

## 7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

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

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

**Tabla 1 .** Equivalentes de Tiosulfato de Sodio

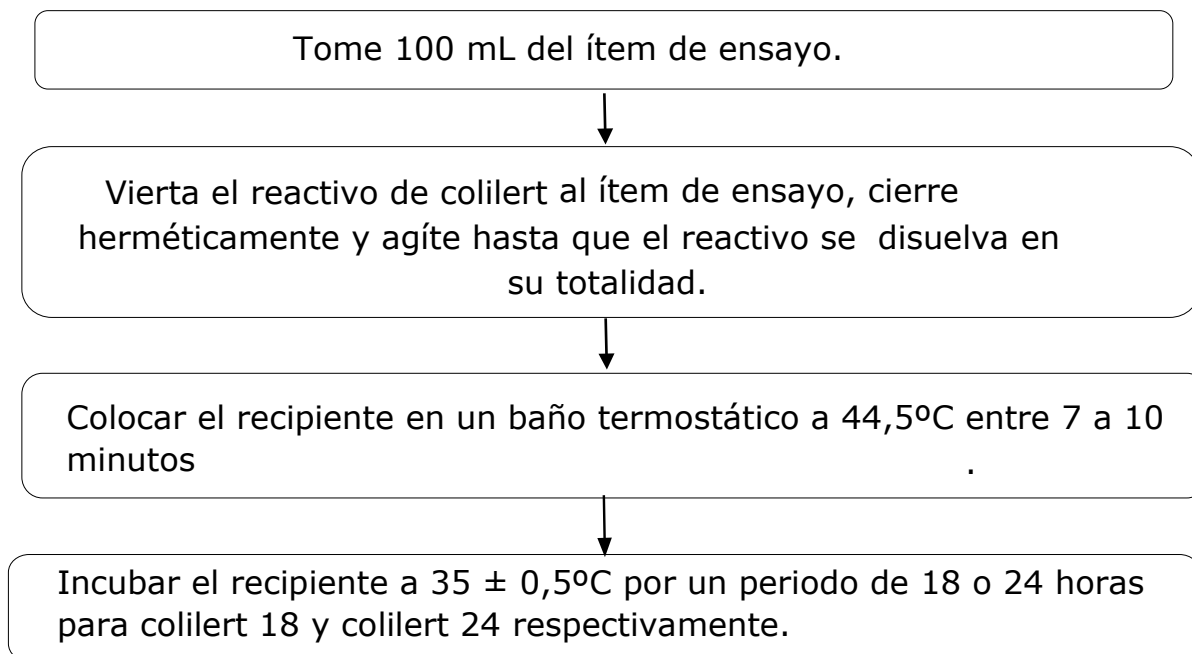
Concentración de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Peso requerido del componente
3% anhidro	3 g/100 mL
3% pentahidratado	4,6 g/100 mL
10% anhidro	10 g/100 mL
10% pentahidratado	15,21 g/100mL

FUENTE: *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 24<sup>ta</sup> Edición, 2023

## 8. PROCEDIMIENTO

- Agitar vigorosamente el ítem de ensayo por 7 segundos o 25 veces por inversión para promover la distribución uniforme de las bacterias.
- Tomar 100 mL del ítem de ensayo a analizar con una probeta y transferir el contenido a un recipiente estéril transparente, no fluorescente. En caso de que el ítem de ensayo requiera dilución realícela con agua esteril no tamponada conservando un volumen final de 100 mL
- Añadir un blíster de colilert a los 100 mL de ítem de ensayo.
- Tapar y agitar el recipiente hasta disolver en su totalidad.
- Colocar el recipiente en un baño termostático a 44,5°C entre 7 a 10 minutos para que el ítem de ensayo/reactivo alcance una temperatura de 33-38°C.
- Incubar el frasco a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 18 o 24 horas, para Colilert 18 o Colilert 24 respectivamente.
- Observar el cambio de coloración y la presencia de fluorescencia azulada usando la cámara UV transcurrido el periodo de incubación.
- Interpretar los resultados de acuerdo al ítem 10 (CÁLCULOS Y RESULTADOS)

## 9. ALGORITMO



## 10. CÁLCULOS Y RESULTADOS

Se realiza lectura e interpretación de resultados después de la incubación de acuerdo a la tabla 2.










Si la respuesta del color no es uniforme después del periodo mínimo de incubación, mezclar por inmersión antes de leer y usar el comparador para garantizar que los resultados de las pruebas se lean con precisión.

El comparador utilizado debe tener el mismo volumen y estar contenido en el mismo tipo de recipiente que el ítem de ensayo, si el color amarillo y la fluorescencia azulada es igual o mayor que la del comprador se interpreta el resultado como Presencia de coliformes totales y *E. coli*. Si no, el resultado se interpreta como ausencia para coliformes totales y *E. coli*.

Así mismo, 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 presencia 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 ausencia para coliformes totales y *E. coli*.

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

FUENTE: *Propia*

REACTIVO	 Colilert-18 Tiempo incubación: 18-22 h	 Colilert-24 Tiempo incubación: 24-28 h
<b>RESULTADO COLIFORMES TOTALES</b> T. de incubación: 35 ± 0,5°C	 Presencia: amarillo	 Presencia: amarillo
<b>RESULTADO COLIFORMES TERMOTOLERANTES</b> T. de incubación: 44,5 ± 0,2°C	 Presencia: amarillo	NO APLICA
<b>RESULTADO <i>E. coli</i></b> T. de incubación: 35 ± 0,5°C	 Presencia: amarillo y fluorescencia con luz UV	 Presencia: amarillo y fluorescencia con luz UV
<b>RESULTADO <i>E. coli</i></b> T. de incubación: 35 ± 0,5°C	 Ausencia: sin fluorescencia	 Ausencia: sin fluorescencia

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 positivos no.

## 11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

### 11.1 Control de calidad

**Control Positivo coliformes totales y *E.coli*:** Llenar dos recipientes con 100mL de agua estéril, no tamponada, libre de oxidantes e inocular uno de los frascos con una colonia de *Escherchia coli* ATCC 25922 y el otro con una coliforme total diferente a *E.coli*: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, seguir el procedimiento mencionado anteriormente incubando los controles a  $35\pm 0,5$  °C, transcurrido el periodo de incubación, leer y registrar los resultados en el formato CAPTURA DE DATOS COLIFORMES T. Y E. COLI - ENZIMA SUSTRATO (P/A) R-7.4-32. Se prueba el comportamiento del método de manera mensual o por cada lote de medio adquirido.

**Control Negativo:** . Llenar un recipiente con 100 mL de agua esteril, no tamponada, libre de oxidantes e inocular una colonia de una bacteria no coliforme: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y seguir el procedimiento mencionado anteriormente incubando el control a  $35\pm 0,5$ °C, transcurrido el periodo de incubación, leer y registrar los resultados en el formato CAPTURA DE DATOS COLIFORMES T. Y E. COLI - ENZIMA SUSTRATO (P/A) R-7.4-32. Se prueba el comportamiento del método de manera mensual o por cada lote de medio adquirido.

**Control de agua estéril:** Para descartar cualquier contaminación externa o autofluorescencia se realiza un control que garantice una correcta esterilidad en el proceso de preparación y montaje del método, para ello se adiciona un blíster de colilert a 100 mL de agua destilada estéril y se incuba a  $35\pm 0,5$  de 18-24 horas para coliler-18 o colilert-24 respectivamente, transcurrido el tiempo de incubación leer y registrar los resultados en el formato CAPTURA DE DATOS COLIFORMES T. Y E. COLI - ENZIMA SUSTRATO (P/A) R-7.4-32. Si el control presenta tinte fluorescente o tinte de resultado positivo se descarta y se utiliza un nuevo lote de sustrato.

**Análisis de Duplicados:** Se deben ejecutar análisis duplicados a un ítem de ensayo por corrida analítica.

## 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. Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater, 24<sup>TH</sup> EDITION.2023. Washington D.C.Enzyme Substrate Coliform Test (SM 9223 B).
- NTC 4939 CALIDAD DE AGUA, ENUMERACION DE COLIFORMES Y ESCHERICHIA COLI. TECNICA CON TUBOS DE FERMENTACION Y TECNICA DE SUSTRATO ENZIMATICO.

### 14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
21/09/2018	300-03-10-23-1604	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-85: MÉTODO ANALÍTICO PRUEBA ENZIMA SUSTRATO PARA COLIFORMES TOTALES Y ESCHERICHIA COLI, SM 9223 B, 4a. VARIABLE PRESENCIA – AUSENCIA.
19/11/2019	300-03-10-23-1429	02	Se modifica el título del método, eliminando la especificación “4a” que indica presencia-ausencia. 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 de enzima sustrato variable presencia-ausencia es aplicable a todo tipo de agua. Se recomienda su uso en agua tratada o potable que requiera cumplir con la ausencia del grupo coliforme total y E. coli como normatividad, pues el método al ser cualitativo no permite general valores numéricos de concentración de los microorganismos de interés”. También se incluye la sección 12 - MANTENIMIENTO relacionado con el método. Se cambia la codificación del documento pasando de D5.4-85 a D-7.2-46 de acuerdo a la nueva versión de la Norma – ISO/IEC 17025:2017.
31/10/2024	300-03-10-23-2200	03	Se realiza modificación y actualización de los ítems del procedimiento con base al método de referencia SM 9223 B. Empleando terminología técnica, tables e imágenes para mejorar la comprensión del procedimiento.

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