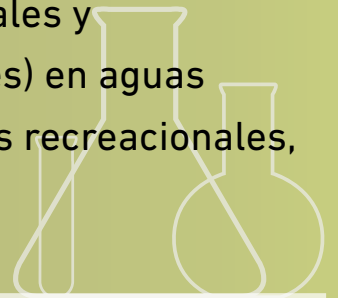


# 5055UY

Determinación simultánea de Coliformes Totales y *Escherichia coli* (o coliformes termotolerantes) en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales, y aguas residuales domésticas e industriales

Sustrato definido, Colilert®-18



---

**Elaborado** - S. Castro Scarone

---

**Modificado** - G. Pistone

---

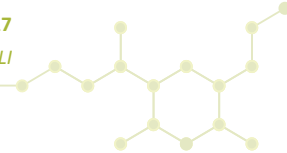
**Revisado** - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

---

**Aprobado** - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

---





## 1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales, y aguas residuales domésticas e industriales, obteniendo resultados en 18-22 horas, al incubar a  $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ .
- 1.2. Cuando se incuba a  $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ , se puede también determinar coliformes termotolerantes.
- 1.3. El límite de cuantificación, al igual que el límite de detección, es de 1 NMP/100 mL.

## 2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.6. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16)
- 2.7. Instructivo de uso autoclaves verticales (INE 13, INE 86 y INE 97)
- 2.8. Instructivo de uso balanza plato abierto (INE 16)
- 2.9. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.10. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.11. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.12. Instructivo de uso vórtex (INE44)
- 2.13. Instructivo de uso sellador Quanti-Tray (INE 43)
- 2.14. Instructivo de uso baño de agua para incubación de coliformes termotolerantes (INE 87), en el caso que se quiera determinar este parámetro.
- 2.15. Ruta de análisis (RMB 05)

## 3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El método consiste en agregar a 100 mL de la muestra de agua un reactivo específico, e incubar la muestra durante 18-22 horas.

**Cuando se incuba a 35 °C** Colilert-18 detecta simultáneamente los coliformes totales y *E. coli* presentes en el agua. La identificación se basa en que cuando los coliformes totales, que presentan la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, metabolizan el sustrato cromogénico ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) de Colilert-18, la muestra toma una coloración amarilla por la presencia de ortonitrofenol. Cuando *E. coli*, que presenta la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, metaboliza el sustrato MUG (4-metilenbeliferin- $\beta$ -D-glucurónido) la muestra fluoresce.

**Cuando se incuba a 44,5 °C** Colilert-18 detecta coliformes termotolerantes. El indicador ONPG produce coloración amarilla cuando es metabolizado por los coliformes termotolerantes a dicha temperatura.

- 3.2. Colilert-18 puede detectar estas bacterias a una concentración de 1 NMP/100 mL dentro de las 18 horas, hasta en presencia de 2 millones de bacterias heterotróficas por cada 100 mL.

## 4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El análisis debe ser realizado utilizando guantes descartables, lentes y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

## 5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Los resultados deben ser leídos entre las 18 y 22 horas de incubada la muestra. Los positivos para coliformes totales y para *E. coli* o coliformes termotolerantes observados antes de las 18 horas y los negativos observados después de las 22 horas también son válidos.
- 5.2. Si la muestra de agua tiene un cierto color de fondo, comparar la muestra inoculada de Colilert-18 con un blanco testigo de la misma muestra de agua.

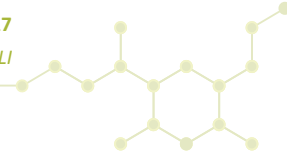
- 5.3. Colilert-18 puede usarse para *E. coli* (pero no para coliformes) en aguas marinas. En este caso las muestras deben diluirse al menos 10 veces.
- 5.4. Colilert-18 es una prueba primaria del agua. Las características de rendimiento de Colilert-18 no se aplican a muestras alteradas por enriquecimiento o concentración previos.
- 5.5. En caso de muestras con exceso de cloro, tal vez se observe un destello azul al añadir Colilert-18. Si se observa, considerar que la muestra no es válida y suspender la prueba.
- 5.6. Las bacterias no coliformes como *Aeromonas*, *Flavobacterias* y *Pseudomonas*, producen pequeñas cantidades de la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, pero generalmente no producen reacción positiva a menos que se encuentren presentes a una concentración mayor a  $10^6$  ufc/100 mL. A su vez algunas cepas de *Shigella sp.* y *Salmonella sp.* también producen una respuesta de fluorescencia; debido a que ambas son patógenas, no se considera un detrimento para evaluar la calidad sanitaria del agua.

## 6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar.
- 6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura  $\leq 6$  °C ( $> 0$  °C). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas.
- 6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual. Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.
- 6.5. Cuando la muestra posee metales pesados ( $> 1,0$  mg/L), el frasco de muestreo debe contener EDTA a pH 6,5 como agente quelante 0,3 mL de una solución de EDTA al 15 % (p/p) cada 120 mL de muestra deben agregarse al frasco de muestreo antes de la esterilización del mismo.

## 7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Bandeja de incubación (Quanti-Tray, IDEXX)
- 7.2. Sellador de bandejas (Quanti-Tray Sealer Model 2X IDEXX)
- 7.3. Probetas de 100 mL estériles
- 7.4. Estufa de incubación a  $35$  °C  $\pm 0,5$  °C (para Coliformes totales y *E. coli*)
- 7.5. Baño de incubación a  $44,5$  °C  $\pm 0,2$  °C (para Coliformes termotolerantes)
- 7.6. Lámpara UV 365 nm
- 7.7. Recipientes estériles de vidrio con capacidad mínima de al menos 150 mL
- 7.8. Anzas
- 7.9. Autoclave
- 7.10. Mecheros
- 7.11. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca
- 7.12. Pipetas automáticas de 1000  $\mu\text{L}$  y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas
- 7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.14. Heladera a 2-8 °C.
- 7.15. Cámara de flujo laminar (de preferencia)



- 7.16. Cinta de revelado de autoclave
- 7.17. Destilador de agua (Barnstead o similar)
- 7.18. Desionizador de agua (Milli-Q o similar)
- 7.19. Balanza de resolución 0,01 g

## 8. REACTIVOS

- 8.1. Reactivo Colilert-18 IDEXX
- 8.2. Agua desionizada (grado 2 según norma ISO 3696 en su versión vigente)

## 9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Trabajar entre dos mecheros encendidos para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.
- 9.2. El material de vidrio que se emplee debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y esterilizado.

## 10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

## 11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

### Operaciones previas

#### Preparación del agua desionizada estéril

- 11.1. Adicionar 1000 mL de agua desionizada en una botella.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días.

#### Preparación de tubos para diluciones

- 11.4. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra.
- 11.5. Colocar 9,0 mL ± 0,2 mL de agua desionizada en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio.
- 11.6. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.
- 11.7. Conservar en heladera (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

#### Análisis de la muestra

- 11.8. Añadir el contenido del reactivo Colilert-18 a una muestra de 100 mL de agua (o la dilución correspondiente) a temperatura ambiente, y en un recipiente estéril. En el caso de realizar diluciones, siempre llevar a 100 mL con agua desionizada estéril.
- 11.9. Tapar y agitar el recipiente hasta disolver.
- 11.10. Verter la mezcla de muestra + reactivo en una bandeja de incubación y sellar en el sellador Quanti-Tray de IDEXX.
- 11.11. Colocar la bandeja sellada en la incubadora a 35 °C ± 0,5 °C (ó a 44,5 °C ± 0,2 °C para los coliformes termotolerantes) durante 18 -22 horas.

## 12. ANÁLISIS DE DATOS

Si la muestra fue incubada a 35 °C:

- 12.1. Contar el número de pocillos amarillos chicos y grandes. A continuación con estos datos entrar en la tabla de doble entrada de Colilert-18 y obtener el valor que provenga de la intersección del número de pocillos chicos y grandes. Este valor corresponde al NMP (número más probable) de coliformes totales/100 mL. En caso de haber diluido la muestra realizar la corrección correspondiente.

12.2. Para determinar el NMP de *E. coli* /100 mL buscar fluorescencia usando una luz de 6 vatios, y 365 nm a una distancia de unos 10 cm de la muestra en un ambiente oscuro. Apuntar el haz de luz en dirección contraria a los ojos y hacia la muestra. Contar el número de pocillos fluorescentes grandes y chicos y obtener el valor de la tabla de doble entrada, igual que para coliformes totales. El valor corresponde al NMP de *E. coli* /100 mL. En caso de haber diluido la muestra, realizar la corrección correspondiente.

Si la muestra fue incubada a 44,5 °C:

12.3. Contar el número de pocillos amarillos chicos y grandes. A continuación con estos datos entrar en la tabla de doble entrada de Colilert-18 y obtener el valor que provenga de la intersección del número de pocillos chicos y grandes. Este valor corresponde al NMP (número más probable) de coliformes termotolerantes/100 mL. En caso de haber diluido la muestra realizar la corrección correspondiente

En resumen, los resultados obtenidos pueden ser:

no amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 35 °C o 44,5 °C	Negativo para coliformes totales, <i>E. coli</i> y coliformes termotolerantes
amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 35 °C	Positivo para coliformes totales
amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 44,5 °C	Positivo para coliformes termotolerantes
amarillo y fluorescente cuando se incubó a 35 °C	Positivo para <i>E. coli</i>

### 13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Como control de calidad se recomienda inocular 3 recipientes estériles cargados con 100 mL de agua estéril con:

- a) *E. coli*
- b) coliforme total (*Klebsiella pneumoniae*)
- c) no coliforme (*Pseudomona aeruginosa*)

A su vez:

Incubar 100 mL de agua desionizada estéril para comprobar esterilidad

Seguir el procedimiento antes mencionado para el análisis de muestras.

Los resultados obtenidos son:

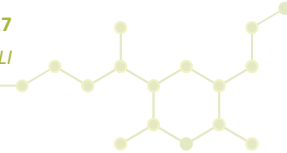
no amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 35 °C o 44,5 °C	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (no coliforme)
amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 35 °C	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (coliforme total)
amarillo y fluorescente cuando se incubó a 35 °C; o amarillo cuando se incubó a 44,5 °C	<i>E. coli</i>

13.2. Realizar el control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control de temperatura de la incubadora).

13.3. **Control de la precisión del método:** Establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC 07). Al comienzo de programas hacer las muestras por duplicado para obtener un nuevo criterio de precisión rápidamente. Una vez que está establecido el criterio de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al Sector por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido.

13.4. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

13.5. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista, aceptando como máximo una variación del 5 %.



## 14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 9223 Enzyme substrate coliform test pp. 9-93 a 9-95.
- 14.2. Manual de instrucciones 2011, Colilert®-18 Kit. IDEXX Laboratories, Inc.
- 14.3. IDEXX Colilert-18 and Quanti-Tray method for the detection of fecal coliform in wastewater. October 2011