

# 5053UY

**Determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales**

Técnica de filtración por membrana

Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





## 1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales, superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales, filtrando un volumen determinado de la muestra, y obteniendo resultados en 24 horas. Es aplicable también a aguas salobres o salinas. El límite de cuantificación es de 20 ufc/ 100 mL; el límite de detección es de 3 ufc/100 mL.

## 2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.
- 2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).
- 2.6. Procedimiento: “Control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista”. (5072 UY).
- 2.7. Procedimiento: “Técnica de incubación tardía para la determinación de coliformes totales y termotolerantes por membrana filtrante” (5065UY).
- 2.8. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02).
- 2.9. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 13, INE 86 y INE 97).
- 2.10. Instructivo de uso balanza (INE 16C).
- 2.11. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17).
- 2.12. Instructivo de uso desionizador (INE 121).
- 2.13. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98).
- 2.14. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44).
- 2.15. Instructivo de uso baño de agua para incubación de coliformes termotolerantes (INE 87).
- 2.16. Rutas de análisis (RMB 01).
- 2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

## 3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El grupo de bacterias coliformes termotolerantes para la técnica de filtración por membrana se define como todos los bacilos gram negativos, aeróbicos y algunos anaeróbicos facultativos, no formadores de endosporas, que cuando se incuban en medio M-FC por 24 h  $\pm$  2 h a 44,5 °C  $\pm$  0,2 °C desarrollan colonias color azul.
- 3.2. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa y su incubación en un medio de cultivo selectivo a 44,5 °C por 24 h. Este medio selectivo y la temperatura de incubación disminuyen el desarrollo de bacterias no coliformes que afectarían negativamente el crecimiento de los coliformes termotolerantes.

## 4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Realizar la preparación del medio de cultivo utilizando guantes descartables, túnica y máscara para material particulado.
- 4.2. El análisis y el recuento deben ser realizados en forma aséptica, entre mecheros o en cámara de flujo laminar, utilizando túnica, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades. Se recomienda el uso de lentes de seguridad.
- 4.3. Después del uso, los materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

## 5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Aguas con gran turbidez pueden hacer que el filtro quede colmatado con sólidos e inhibir el crecimiento bacteriano.
- 5.2. Aguas con alta densidad de bacterias no coliformes; si se detecta interferencia por bacterias heterótrofas, se debe repetir el muestreo.
- 5.3. Aguas con niveles altos de metales tóxicos o compuestos orgánicos tóxicos como fenoles, pueden verse concentrados en el filtro e inhibir el crecimiento de las bacterias coliformes.

## 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, y 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 durante el muestreo.
- 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. Si por razones no es esto viable, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura  $\leq 10^{\circ}\text{C}$  ( $> 0^{\circ}\text{C}$ ). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas. Cuando sea necesario realizar la modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, referirse al procedimiento normalizado de operación 5065UY.
- 6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  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.

## 7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de filtración: embudo y portafiltro poroso que se puedan trabar entre sí y se puedan esterilizar; bomba de vacío; kitasato de 1 litro o mayor; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío. En lo posible, la presión de vacío sobre el filtro debe ser de 34 - 51 KPa.
- 7.2. Balanzas de resolución 0,01 g
- 7.3. Baño de agua o incubadora a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$
- 7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10x a 15x y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de  $60-80^{\circ}\text{C}$  con la placa (de preferencia).
- 7.5. Autoclave
- 7.6. Mecheros
- 7.7. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 47 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado para los filtros (7.8).
- 7.8. Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles de  $0,45 \mu\text{m} \pm 0,02 \mu\text{m}$  de diámetro de poro, libre de glicerina y sin áreas hidrofóbicas, de 47 mm de diámetro.
- 7.9. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.
- 7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca.
- 7.11. Pipetas automáticas de 1000  $\mu\text{L}$  y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas.
- 7.12. Material de vidrio estéril para preparación del medio de cultivo.
- 7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.14. Heladera a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
- 7.15. Asas bacteriológicas
- 7.16. Cámara de flujo laminar (de preferencia)

- 7.17. Plancha calefactora o baño maría
- 7.18. Cinta de revelado de autoclave
- 7.19. Desionizador de agua
- 7.20. pHímetro (analizador de iones)
- 7.21. Agitador vórtex
- 7.22. Papel de embalaje
- 7.23. Bolsas herméticas (si se utiliza baño de agua para incubar las placas de Petri)

## 8. REACTIVOS

- 8.1. Peptona (Difco, u Oxoid)
- 8.2. Medio de cultivo M-FC Agar (Difco, u Oxoid)
- 8.3. Ácido Rosólico (Nº CAS 603-45-2)
- 8.4. Hidróxido de sodio 0.2N
- 8.5. Agua desionizada (según ES 01)
- 8.6. Cultivos puros de colección (ATCC) – Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico
- 8.7. Alcohol etílico.

## 9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en la realización del medio de cultivo, así como en el procedimiento analítico debe estar lavado, enjuagado con agua destilada o desionizada y esterilizado.
- 9.2. Las placas de Petri deben ser estériles.
- 9.3. Los punteros de las pipetas automáticas y los embudos de filtración deben ser esterilizados previo a su utilización.
- 9.4. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad, también es posible utilizar cámara de flujo laminar.

## 10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

## 11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

### Operaciones previas

#### Preparación del agua peptonada al 0,1 %

- 11.1. Adicionar 1 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente y colocar 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. Rotular indicando fecha de esterilización.

#### Preparación del medio de cultivo

- 11.4. El medio de cultivo debe prepararse utilizando agua desionizada y material de vidrio estéril. Calentar hasta casi ebullición para disolver el agar, agregar ácido rosólico al 1% preparada en NaOH 0.2N en una proporción de 10mL en 1000mL de medio preparado, llevar nuevamente hasta casi ebullición y luego dejar enfriar entre 45 – 50°C aprox. antes de repartir en placas. No autoclavar. El pH final del medio de cultivo debe ser  $7,4 \pm 0,2$ . El agregado de ácido rosólico es para suprimir el crecimiento de flora acompañante, por lo que es recomendado principalmente para el análisis de efluentes. Confirmar este proceso según instrucciones del fabricante.
- 11.5. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período de 90 días en Erlenmeyer, o frasco con tapón cerrado.

**Preparación de las placas de Petri**

- 11.6. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatarlo a 45°C. Colocar aproximadamente 3 mL de medio por cada placa de 47mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.
- 11.7. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo.
- 11.8. Almacenar en heladera de material estéril entre 2-8 °C hasta su utilización, como máximo 14 días.

**Preparación de tubos para diluciones**

- 11.9. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar.
- 11.10. Colocar 9mL  $\pm$  0,2mL 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 o papel de embalaje.
- 11.11. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Rotular indicando fecha de esterilización.
- 11.12. Conservar en heladera de material estéril (2-8°C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

**Análisis de la muestra**

- 11.13. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1mL de muestra o de la dilución previa, a los 9mL de agua desionizada. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra, es conveniente filtrar tres volúmenes diferentes.
- 11.14. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadrículada hacia arriba, sobre el portafiltras poroso del embudo, utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.
- 11.15. Filtrar un volumen aproximado a 10mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.
- 11.16. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vórtex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.
- 11.17. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10mL de agua peptonada estéril. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo en la placa de Petri sobre el medio, con la parte cuadrículada hacia arriba, evitando la formación de burbujas de aire, pasar suavemente la pinza por el borde del filtro para sacar el aire si es necesario. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla en la mesada para luego ser incubada.
- 11.18. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambéandolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.
- 11.19. Si el volumen a filtrar es poco, por ejemplo 1mL, colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.
- 11.20. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.
- 11.21. Incubar las placas de Petri en posición invertida totalmente sumergidas en el baño de agua a 44,5 °C  $\pm$  0,2 °C durante 24 h  $\pm$  2 h, Se puede utilizar bolsas herméticas, dejar la menor cámara de aire posible para que alcance rápidamente la temperatura.

**Recuento**

- 11.22. Las colonias típicas de coliformes termotolerantes son de distintas tonalidades de azul. Las colonias grises o crema son consideradas como no coliformes, aunque existen colonias de *E. coli* atípicas que se presentan de color crema por lo que se recomienda realizar la verificación a posteriori.
- 11.23. El recuento de colonias se realiza, de ser posible, en las placas que contengan entre 20 y 60 colonias de coliformes típicas y no más de 200 colonias de cualquier tipo. Si fuera necesario se puede realizar utilizando equipo de recuento (7.4).

## 12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$C. \text{ termotolerantes (ufc/100 mL)} = \frac{\text{colonias de coliformes contadas} \times 100}{\text{mL de muestra filtrados}}$$

donde:

ufc corresponde a Unidades Formadoras de Colonias

12.2. Si el número de colonias típicas de coliformes termotolerantes fuera entre 20 y 60 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto. Informar como recuento estimado.

12.3. Si el número de colonias típicas es mayor a 60, el recuento se realiza siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación.

- Dividir la placa en 4 cuadrantes, contar en uno, multiplicar por cuatro.

- Contar 10 cuadrados del filtro al azar, promediar, multiplicar por el número total de cuadrados del filtro.

En ambos casos informar como recuento estimado.

12.4. Si el recuento es cero, considerar 1 ufc en el mayor volumen filtrado, calcular la densidad de coliformes termotolerantes, y expresar los resultados como < valor obtenido. Si el resultado es menor a 20 ufc/100 mL, expresar como < LC (límite de cuantificación).

12.5. Si el número de colonias a contar es menor a 20 se considera el recuento de la placa más cercana al rango aceptable. Por ejemplo, si se examinan 50, 25 y 10 mL, y el conteo es 15, 6 y < 1 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(15 \times 100)}{50} = \text{estimado } 30 \text{ coliformes /100 mL}$$

12.6 Si el número de colonias a contar es mayor a 60, se considera el recuento de las placas más cercanas al rango aceptable. Por ejemplo, si se examinan 10,1 y 0,1 mL, y el conteo es muy alto y no se puede contar (NSPC), 150 y 92 colonias respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{92 \times 100}{0,1} = \text{estimado } 92.000 \text{ coliformes /100mL}$$

12.7 Si se filtra por ejemplo 1.0, 0.3, 0.1 y 0.03mL con recuentos NSPC, NSPC, 58 y 21 respectivamente, se toman en cuenta los 2 valores dentro de rango y el resultado es el siguiente:

$$\frac{(58+21) \times 100}{(0,1+0,03)} = 61.000 \text{ coliformes /100mL}$$

## 13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Calidad del proceso analítico:**

- Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis, filtrando al inicio y al final del procesamiento de muestras, 100 mL de agua estéril e incubando la placa con el filtro bajo las mismas condiciones que las muestras. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.

- Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control y registro de temperatura de la incubadora con termómetro calibrado).

- Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.
- Verificación mensual del 5 % de las muestras realizadas en el Sector, aislando de cada muestra ambiental 10 colonias típicas (y en lo posible también colonias no típicas) siguiendo el Procedimiento Normalizado de Operación para la Verificación de coliformes termotolerantes 5072UY. Cuando corresponda, ajustar el conteo basado en el porcentaje de verificación y expresar el resultado como coliformes termotolerantes verificados. Si no es posible hacer las verificaciones en el momento, aislar las colonias en agar de soja triptica (TSA) y guardarlas en la heladera a 2-8 °C hasta que se puedan procesar.

13.2. **Control de la precisión:** Para el control de la precisión del método se debe establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC 07).

Al comienzo de nuevos programas de monitoreo hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo valor de precisión rápidamente; también es un criterio válido calcularlo de forma anual con la totalidad de muestras analizadas en el sector para cada matriz ambiental. Una vez que está establecido el valor de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al sector cada día, 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. Construir el gráfico de control de precisión correspondiente.

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

13.4. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista a través de la duplicación de los conteos de una misma placa, aceptando como máximo una variación del 5 %.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9020B Intralaboratory Quality Control Guidelines, 9050B Water pp. 1093, 9060 Samples pp.1094, Method 9222D Thermotolerant (Fecal) Coliform Membrane Filter Procedure pp. 1153-1156.



