



TÍTULO: Determinación de Coliformes totales y E. Coli de aguas mediante la técnica de sustrato definido, colilert por el método de Numero Más Probable.

CÓDIGO: TP0423

VERSIÓN: 02

COPIA N°: _____

ELABORADO POR: _____
MARIA OLGA NAVARRO ROA
BACTERIOLOGA

REVISADO POR: _____
LUZ CONSUELO ORJUELA
QUIMICA FARMACÉUTICA

APROBADO POR: _____
MARTA ELENA DUQUE SOLANO
COORDINADORA PFQA

Este documento debe ser revisado por lo menos cada **dos** años.



1. Introducción

La Escherichia coli forma la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo, y se elimina por las heces al exterior, por lo tanto no es Infrecuente que se encuentre en el medio ambiente, donde son capaces de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento constituye un indicador de contaminación fecal reciente. Puede intervenir en procesos patológicos como la producción de cuadros intestinales, diarreas e infecciones extra intestinales diversas.

Los coliformes totales, se encuentran con mas frecuencia en el medio ambiente, pueden estar en el suelo y en las superficies del agua dulce, por lo que no son siempre intestinales, su identificación en estas fuentes sugieren fallas en la eficiencia del tratamiento y la integridad del sistema de distribución.

La prueba de Enzima – sustrato definido se fundamenta en la actividad enzimática de los Coliformes totales y los Coliformes fecales (E.coli).

Los Coliformes totales se diferencian según su capacidad para fermentar lactosa, así:

Fermentadores Rápidos: E. coli, klepsiella, enterobacter, poseen 2 enzimas, la beta-galactósido-permeasa, su actividad es permitir que la lactosa se difunda a través de la membrana celular. La otra es la beta-galactosidasa la cual descompone por hidrólisis el enlace beta -galactósido que une las moléculas de glucosa y galactosa para formar el disacárido de lactosa, liberando así la glucosa que de esta manera puede ser fermentada.

Los fermentadores lentos : Carecen de la enzima beta-galactósido-permeasa.

Los no fermentadores , no poseen ninguna de las enzimas.

En los medios sólidos con lactosa se comportan en general como no fermentadoras y solo puede detectarse demostrando la presencia de beta-galactosidasa por la reacción del ONPG (ortonitrofenil – galactopiranósido), compuesto capaz de atravesar la pared celular y que la beta-galactosidasa descompone en galactosa y ortonitrofenil, que al liberarse en medio alcalino toma un color amarillo pálido.

Este método esta recomendado para análisis microbiológico para las muestras de agua en general, ya sea potable, de consumo humano, no tratadas, residuales aguas de alberca y de playa.

El método es aplicable en un rango de 1 a 1800 NMP/100mL para detectar y cuantificar la concentración de Coliformes totales y E.coli para evaluar la calidad microbiológica de estas.



Según el Decreto número 475 de 1998 "Por el cual se expiden normas técnicas de calidad de agua potable".

ARTICULO 25. El agua para consumo humano debe cumplir con los siguientes valores admisibles desde el punto de vista microbiológico.

NUMERO MAS PROBABLE :

Coliformes totales. 0 microorganismos/100mL

E. coli. 0 microorganismos /100mL

2. Definiciones

E.coli : Escherichia coli.

mL : mililitros.

MUG : 4-metil-umbelífero-beta-D-glucoronido.

NMP : Número Más Probable.

nm : nanometro.

ONPG : Orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido.

UV : Ultravioleta.

Para poder diferenciar la E. **Coli** se tiene en cuenta que ésta posee la enzima beta-glucuronidasa, que es la encargada de romper el enlace del complejo beta-glucoronido-4-metil-umbelífero o mejor el MUG, presente en el sustrato liberando 4-metil-umbelíferona que produce la fluorescencia visible bajo luz UV.

3. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD.

Las medidas de seguridad en el área de microbiología para las actividades de Análisis y Lectura son:

- *Hacer las resiembras de patógenos con mucho cuidado, manipúlelas con todos los elemento de seguridad del caso.*
- *Realizar todos los procedimientos evitando al máximo la formación de aerosoles.*
- *Cubrir las zonas de trabajo con papel absorbente, siempre que exista riesgo de derrame de material peligroso.*
- *En caso de derrame de algún material, cubrir la zona con un desinfectante (hipoclorito de sodio al 2%) de 15 a 30 minutos antes de limpiar.*
- *Evitar abrir las cajas de petri, incluso las de mesófilos si no se tiene tapabocas, pueden provocar infección por inhalación.*
- *Evitar movimientos bruscos o innecesarios ya que puede ocasionar derrames infeccioso*



COLIFORMES TOTALES Y E. COLI POR EL METODO NMP

- Tener contacto con superficies no estériles cuando se esté sembrando o cuando se tengan guantes
- Mantener cerradas las puertas del área de microbiología mientras se está sembrando.
- Evitar el paso de personal ajeno por el área de microbiología mientras se siembra.
- Se deberá entrenar al personal que ingrese al laboratorio sobre los riesgos y operaciones que se realicen dentro de este

Los siguientes son los elementos de protección que cumple el personal que labora en el laboratorio de análisis microbiológico:

Bata de laboratorio hasta la rodilla manga larga.

Gorro

Tapabocas

Monogafas

Guantes de latex

Zapatos antideslizantes

Actividades de salud y seguridad en Lavado de material:

- No deseche los productos biológicos sin esterilizarlo en el desagüe.
- Coloque todo el material contaminado dentro de desinfectante (hipoclorito de sodio al 2%) por 1 hora para luego ser esterilizar a 121°C por 20 minutos a 15 psi en el autoclave no: 1.
- Realice antes y después de los análisis la limpieza del área de trabajo con desinfectante, con hipoclorito al 2%, deje secar.
- La limpieza y desinfección de incubadoras y nevera prográmela semanalmente.
- Controlar el buen funcionamiento de autoclaves y después del uso dejarlo limpio y seco para evitar el crecimiento de hongos.
- Se debe establecer un sistema de identificación y separación de material contaminado, una vez esterilizado, colocar el material sólido en bolsa roja bien sellada y llevarla al cuarto de maquinas para ser recogida como material biológico y el material liquido agregar hipoclorito y desechar en el desagüe.

4 . LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

Esta técnica es específica para Coliformes totales y E. coli, inhibe el crecimiento de bacterias Grampositivas y otras Gramnegativa casuales.

- Si la muestra no es procesada dentro de las 24 horas siguientes a su recolección y que se haya sometido a refrigeración más no congelación no se debe procesar.
- Se debe desinfectar el área de trabajo antes y después del procedimiento.
- Todo el material debe estar estéril.
- Debemos agitar muy bien la muestra como también las diluciones.



COLIFORMES TOTALES Y E. COLI POR EL METODO NMP

- Para leer los resultados obtenidos debemos tener en cuenta la intensidad del color que debe ser el mínimo color amarillo y debemos compararlo con el frasco indicador que es un patrón, para evitar falso positivos o falsos negativos.
- Si la muestra no es procesada dentro de las 24 horas siguientes a su recolección y que se haya sometido a refrigeración más no congelación no se debe procesar.
- Se debe desinfectar el área de trabajo antes y después del procedimiento.
- Todo el material debe estar estéril.
- Debemos agitar muy bien la muestra como también las diluciones.
- Para leer los resultados obtenidos debemos tener en cuenta la intensidad del color que debe ser el mínimo color amarillo y debemos compararlo con el frasco indicador que es un patrón, para evitar falso positivos o falsos negativos.

5. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL METODO

NOMBRE DEL METODO: NUMERO MAS PROBABLE			
CÓDIGO DEL PSO: TP0423			
FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN: 18/08/2006			
PARÁMETRO		UNIDADES	OBSERVACION
LIMITE DE DETECCION	1	NMP/100ml	Corresponde al límite de cuantificación.
PRECISION EN TÉRMINOS DE %CV	11,3	%	Nivel de Concentración bajo 180 NMP/100 mL
	14	%	Nivel de Concentración alto 1800 NMP/100mL
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO	4,6	%	Nivel de Concentración bajo 180 NMP/100 mL
	-6,9	%	Nivel de Concentración alto 1800 NMP/100mL
RANGO DE TRABAJO (Lectura Directa)	1 - 1800	NMP/100ml	Sin dilución de la muestra
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO	1 - 1800000	NMP/100ml	Con la mayor dilución posible o aceptable. 10^{-8}
RECUPERACION EXPRESADO COMO %	105,2	%	Nivel de Concentración bajo 100 NMP/100 mL
	102,3	%	Nivel de Concentración alto 1800 NMP/100mL



6. TOMA Y PRESERVACION DE LA MUESTRA

Colecte las muestra en botella de vidrio esterilizables con capacidad no menor de 100 mL, es el volumen mínimo para análisis microbiológicos con preservante (tiosulfato de sodio y/o EDTA) si lo requiere. Se toma la muestra directamente sin realizar purga del recipiente, teniendo la precaución de dejar una cámara de aire dentro de él y que el recipiente como su tapa no debe tocar ninguna superficie contaminada, se tapa y se coloca el material protector (papel) ajustado con la pita.

Consideraciones para la preservación de las muestras microbiológicas

Añadir un agente reductor a los recipientes en los que se vaya recolectar las muestras con residuos de cloro y otros desinfectantes. El tiosulfato de sodio, es un buen agente declarante, neutraliza todos los residuos e impide la acción bactericida durante el transporte de la muestra. El posterior estudio de ésta indicara por tanto la forma más exacta del verdadero contenido microbiano.

La cantidad de decolorante en las muestras de agua potable debe ser de 0.32 mL de tiosulfato de sodio a una concentración del 0.025N para un volumen de muestra 250 mL, esta cantidad de tiosulfato de sodio neutraliza 5 mg/L de cloro residual. En muestras residuales tratados con cloro la cantidad es de 0.20 mg/L de una solución de tiosulfato de sodio al 10 % para un volumen de muestra de 250 mL, esta cantidad podrá hasta 30 mg/L de cloro residual.

Para prevenir la inhibición del crecimiento microbiológico por posible presencia de alto contenido de metales como cobre, zinc o níquel, en una concentración mayor de 0.1 mg/L en la muestra, agregar a ésta un agente quelante como el EDTA al 15 %. Adicionar a un frasco de 100 mL, 0.25 mL de EDTA al 15%, para un volumen de 250 mL 0.62 mL de EDTA y para un volumen de 500 mL agregar 1.25 mL de EDTA.

Tapar los frascos, envolver en papel kraft y esterilizarlos a 121°C por 15 minutos y 15 psi

Después de recolectadas las muestras deben ser lavadas al laboratorio lo más rápido posible. Si no es posible el análisis en el lapso de 24 hora después del muestreo, se deben refrigerar a una temperatura entre 2°C-10°C. Se reduce al mínimo la posibilidad de cambio durante el almacenamiento y el transporte.

7. APARATOS, REACTIVOS Y MATERIALES

7.1 Aparatos

- Autoclave.
- Incubadora Brinder. Codigo: BD 53. Inventario : 9377.
- Camara UV
- Selladora de sobres Quanti-tray.
- Manejo: conecte, prende lo cual se realiza por medio del dispositivo que se encuentra en la parte de atrás en el borde inferior, prende una luz roja, se debe dejar un tiempo considerable hasta que aparezca la luz verde esto es está lista para usar asi:



COLIFORMES TOTALES Y E. COLI POR EL METODO NMP

Se toma la bolsa se hace coincidir los pozos la bolsa en los orificios de las plantilla de color rojo, se deja deslizar por la selladora hasta que los rodillos la tomen.

- Plantilla de color rojo.
- Incubadora. Marca: JENCONS. Inventario 4971.
- Incubadora Marca: Binder. Modelo Digital. Serial BD53- ul 03-46606
- Plancha Marca: Cimarec 2 Modelo: Termolyne.
- Autoclave Electrico. Marca All American. Modelo: 50X. Sarial: 0000-200. Calibrado en temperatura, presión y tiempo.
- - Balanza. Marca: METTLER TOLEDO. Modelo AG 204. Con aproximación 0.0001 g.

7.2 Materiales

- Probeta graduada de 100, 500 y 1000 mL.
- Vasos de 100, 250, 500 mL
- Balón de 1 litro de fondo plano
- Varilla de vidrio.
- Cajas de Petri 45 mm de diámetro en vidrio.
- Frascos para toma de muestra en vidrio autoclavables con tapa de rosca.
- Pipetas de 1, 5, y 10 mL.
- Micropipetas de 0.1 y 0.5. μ L
- Puntas azules y puntas amarillas
- Pipeta de 100 mL clase A
- Mechero de Alcohol
- Papel craft
- Vinipel.
- Frascos Schott de 250 mL, esterilizables.
- Asa de platino redondeada (bacteriológica)
- Gradillas.
- Pita
- Tubos de ensayo 18x125mm
- Espatula y Guantes de carnaza

7.3 Reactivos

Solicite los reactivos diligenciando el formato AF0041

- E.DTA al 15 %.(Acido etilendiamino tetracético)
Preparación : Pesar 15 gramos de EDTA 0.1 M, disolver en 100mL de agua destilada. Esterilizar a 121°C por 15 min a 15 psi.
- Tiosulfato de sodio al 0.025 N.

Preparación: Pesar 6.205 de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y disolver en 1000 mL agua destilada
Esterilizar a 121° C por 15 minutos a 15 psi.

- Alcohol industrial



COLIFORMES TOTALES Y E. COLI POR EL METODO NMP

- Agua ultrapura, obtenida en la pistola del purificador Labconco Water Pro PS y esterilizada a 121 °C por 20 minutos a 15 PSI.
- Medio de cultivo Colilert
Preparación.
Tome 1 vial de colilert y disuélvalo en 100 mL de agua destilada donde se ha realizado la dilución, mezcle muy bien.
- Agua de Peptona tamponada al 1%. Verificar fecha de vigente.
Preparación:
Disolver 1.0 g en 100 mL de agua destilada estéril. Mezclar y colocar en la plancha de calentamiento a temperatura media hasta disolver completamente, esterilice a 121°C por 15 minutos 15 psi. Cuando el tiempo de esterilización ha transcurrido, el suministro de vapor debe cortarse (apagar) y permitir que la presión disminuya lentamente. Sacarlos del autoclave cuando la presión este en cero.
Cuando este de nuevo frio coloque 100 mL, mídalos con pipeta de 100 mL clase A, y envasarlo en frascos para dilución Schott, colocar los mecheros y el área estéril, envuelva en grupo de 4 frascos en vinipel y coloque el rotulo y realice el control de calidad. Los demás frascos llévelos a la nevera a 4°C.

El rotulo de identificación debe llevar además la fecha de vencimiento lo cual es exigido por la reglamentación vigente de la FDA.

Nombre del medio:

Lote no.

Fecha de preparación:

Fecha de vencimiento.

Nombre quien lo preparó.

8. Procedimiento de limpieza del material de vidrio

Ver el procedimiento de lavado y limpieza del material utilizado en microbiología. Ver TP0426

8.1 Procedimiento para material usado.

El material utilizado bolsas, tubos, frasco, etc., se deben esterilizar en el autoclave No. 2 colocando una ampolla de Sterikon para verificar el funcionamiento del autoclave. Esta ampolla contiene nutrientes, indicador de pH y esporas de *Bacillus stearothermophilus* que son resistente a alta temperaturas, pero no resisten una temperatura de 121°C por 15 minutos después de este tiempo se inactivan.

Dicha ampolla se coloca dentro del autoclave sobre una caja de petri, esta tiene inicialmente un color violeta, después de la esterilización debe conservar su color, se lleva a incubar a 60°C por 48 horas, aún debe conservar su color si la esterilización es completa, de lo contrario vira a un color amarillo y se observa producción de gas lo que indica que la esterilización no es aceptable.



Transcurrido este tiempo apague el autoclave, espere a que la aguja del manómetro llegue a cero deje que el material se encuentre frío para que lo lleve al área de lavado donde le debe retirar los residuos de agar y material sólido para desechar los cuales se recogen en bolsa plástica de color rojo, se sella muy bien y llévela al cuarto de máquinas, se les avisa a la persona encargada de sacar la basura, que la llevará al lugar de los desechos biológicos.

Cuando el material es líquido lo debe dejar con un poco de desinfectante (hipoclorito al 2%) por unas horas ya lo podemos desechar por el desagüe del alcantarillado.

El material está listo para ser lavado con solución jabonosa de agua con Extrán neutro al 5% y un poco de hipoclorito, se frota con una esponja suave luego lo enjuagamos con abundante agua para quitar el jabón lo pasamos a un recipiente que contenga solución jabonosa caliente e hipoclorito lo deja de 1 a 2 horas luego enjuagarlo con abundante agua de grifo para luego enjuagarlo con agua destilada.

Secar en el horno a 60 °C por 2 horas. Llevarlo para que se realice el control de calidad esto es anotándolo en el FT0042

Las bolsas escúrralas muy bien colóquelas en la bolsa plástica roja directamente

8. 2 Esterilización del Material limpio.

- Cajas de Petri:

Envuelva en papel kraft por grupo de 4 cajas de petri y séllelas con cinta de enmascarar y coloque un trozo de cinta indicadora de esterilidad sobre el papel kraft. Así haga con las demás cajas.

- Tubos:

Tome unos 6 tubos colóquelo la tapa pero sin dejarla muy sellada y envuélvalos en papel Kraft séllelos con cinta de enmascarar y coloque un trozo de cinta indicadora de esterilidad, haga esto con todos los demás tubos.

Coloque en autoclave, esterilícelo a 121°C por 15 minutos a 15 psi. Deje enfriar y colóquelo en el estante designado para guardar este.

NOTA: La cinta indicadora contiene esporas de *Bacillus stearothermophilus* en sus canales diagonales los cuales tienen un indicador de color que al momento de la esterilización satisfactoria vira a negro.

8.3 Instrucciones para el manejo del el Autoclave

Llenar con agua del grifo el espacio de la base de la autoclave y la rejilla.

Colocar el recipiente (olla) dentro de la Autoclave, haciendo que este quede en el centro del autoclave, de modo que el compartimento adherido, quede a la derecha para que pueda coincidir con el tubo metálico el cual se introduce por este para que pueda salir el vapor de agua que se produce y cuando se baje la tapa quede el manómetro frente al analista.

Las tuercas deben hacerse coincidir con las muescas de el autoclave y el espacio entre el autoclave y la tapa se determina dejando el espacio igual de una tuerca y el espacio de la tuerca contraria y se debe ajustar una tuerca con la tuerca contraria al mismo tiempo, se dice que se debe hacer como cuando se coloca una llanta de un carro.



Levante la válvula de control para que salga el vapor de agua, cuando empiece a pitar baje la válvula (posición horizontal), espere a que el manómetro suba a 121°C y manténgalo ahí por 15 o 20 minutos teniendo en cuenta lo que se va a esterilizar.

Cuando pase este tiempo apague deje que baje a 0 la aguja del manómetro para que pueda sacar el material. Deje la autoclave limpio y **seco**. Saque el material y llévelo a donde corresponda. Observe la cinta de control de esterilización si en material limpio y si es material sucio observe la ampolleta y llévela a incubar.

9. Procedimiento para el mantenimiento de las cepas certificadas (Repique)

Las cepas que se utilizan para el control de calidad de los medios de cultivo y la verificación de la respuesta de los mismos son:

E.coli ATTC : 25922

Citrobacter freundii: ATCC 8090

Pseudomona aeruginosa: ATTC 27853

Staphylococcus aerogenes: ATTC 25923

9.1 Preparación del medio:

El mantenimiento de las mismas mediante repique quincenal se realiza en Medio de cultivo Agar Plate count

Disolver 22.5 g en Litro (1000 mL) de agua destilada estéril. Mezclar y colocar en la plancha de calentamiento a temperatura media hasta disolver completamente, esterilice a 121°C por 15 minutos 15 psi. Cuando el tiempo de esterilización ha transcurrido, el suministro de vapor debe cortarse (apagar) y permitir que la presión disminuya lentamente. Sacarlos del autoclave cuando la presión este en cero. Dejar enfriar a 45 – 50 °C y servir en las cajas de petri, dejar solidificar y llevar a la nevera a 4°C. Este medio puede conservarse por un tiempo máximo de 1 mes, realizar comprobación antes de uso si está próximo a vencer.

9.2 Repique:

Esterilice el área de siembra, desinfectando con hipoclorito de sodio al 2 % y realice todo el procedimiento colocando los mecheros encendidos.

Marcar 4 tubos con los nombres de las cepas y agregar 3 a 5 mL de agua de peptona tamponada.

Tome más o menos 5 colonias, observe que estas tengan las características propias de la cepa que se va a repicar (No tomar las colonias “contaminadas”) haga una solución de esta y el agua de peptona, mezcle y lleve a la incubadora por 2 a 3 horas a 36 °C.

Pasado este tiempo tomar una asada con el asa bacteriológica (redonda), hacer la siembra en superficie en toda la caja de petri, con medio de cultivo Plate Count que se ha preparado y se le a realizado el control de calidad.



Realizada la siembra de cada una de las cepas llevar a la incubadora por 24 horas a 36° C.

Dejar a temperatura ambiente y luego pásela a la nevera la nevera a 4°C. Las cepas están listas para ser utilizadas. Las cepas envejecidas se deben autoclavar a 121°C por 20 minutos 15 psi.

Colocar los residuos en bolsa plástica de color rojo, bien selladas, llevarla al cuarto de máquinas y comunicarle al encargado de recolectar la basura, para que la transporte al deposito de residuos biológicos.

10. CONTROL DE CALIDAD PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO Colilert

Los controles de calidad para microbiología se le deben hacer a cada lote de bolsas y cada lote de viales de colilert para verificar especificidad, esterilidad y vigencia.

10.1- Control de calidad al medio de cultivo Colilert

Tomar un tubo de ensayo marcarlo con el nombre de la cepa, agregar 3 a 5 mL de agua de peptona tamponada al 1%.

De la caja de petri donde se encuentre la cepa tomar con el asa bacteriológica (redonda) 5 colonias de las mismas características y hacer una suspensión en los 3- 5 mL de agua de peptona tamponada mezclar suavemente llevar a la incubadora 3 – 4 horas hasta que se observe crecimiento (crecimiento).

Tomar 4 bolsas y 4 viales de colilert para hacer el control.

10.1.1 En la primera bolsa realizamos el Control de esterilidad así: Agregar a un frasco de dilución 100 mL de agua estéril y disolver un vial de colilert mezclar bien, colocar esta dilución en una bolsa bien identificada, sellarla e incube a 36 °C por 24 horas. No deber tener crecimiento. Esto quiere decir que la bolsa y el colilert están estériles no tienen ninguna contaminación.

10.1.2 En la segunda bolsa realizamos el Control de Negativo, utilizando la cepa de Pseudomona aeruginosa que es lactosa negativa, es decir no fermenta lactosa por lo que no debe haber crecimiento.

Siembra: tomar del tubo donde esta la cepa, 0.1 mL llevarlo a 99.9 mL de agua estéril, se realiza en un frasco de dilución, debidamente marcado, esta concentración es de 10^{-3} de esta dilución tomar 0.1 mL llevarlo a 99.9 mL de agua estéril, la concentraciones 10^{-6} de esta dilución se toma 0.1 mL llevarlo a 99.9 mL de agua estéril y queda 10^{-9} . A esta dilución agregar un vial de colilert mezclar, sellar e incubar a 36 °C por 24 horas.

10.1.3 – En la tercera bolsa se realiza el control Positivo. Utilizando la cepa de E. coli, se demuestra el crecimiento de microorganismo lactosa positivo y la fluorescencia para E.coli, el procedimiento para la siembra ver 10.1.2



11. PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

Las muestras se deben procesar lo más rápido posible, llevar a temperatura ambiente antes de su análisis.

Se deben realizar las diluciones de acuerdo a su aspecto, olor y procedencia.

Encienda la selladora 15 minutos antes de su uso, cuando la luz roja de la parte superior derecha pasa a verde, indica que está lista para su uso.

Agitar la muestra muy bien y realice las diluciones así:

- Dilución 10^{-2} y pares: Tomar 1 mL de muestra, con una punta azul que se coloca en la micropipeta, esta tiene una capacidad de 0.5 mL por lo tanto se tiene que agregar 2 veces el mismo volumen para que sea 1mL. Colocar dentro del frasco para la dilución, debidamente marcado al cual contiene 99 mL de agua estéril agite muy bien. Si va a realizar diluciones seriadas par, se sigue este procedimiento sacando de la dilución anterior 1mL agregarlo a otro frasco de dilución y se obtiene una dilución 10^{-4} y así sucesivamente.

Si se necesita hacer diluciones seriadas impares, empezar con la dilución 10^{-3} , se toma 99.9 mL de agua estéril en un frasco de dilución, adicionar 0.1 mL de muestra y agitar muy bien, para realizar la siguiente dilución impar, se toma de ésta dilución 0.1 mL y se lleva al frasco de dilución que contiene 99.9 mL de agua estéril se mezcla, se tiene una concentración de 10^{-6} si se requiere mas diluciones impares hacer lo mismo.

Golpee suavemente el vial tres veces sobre la mesa para que el contenido quede en el fondo del recipiente. A los 100 mL de las dos diluciones preparadas se le adiciona a cada una el contenido de un vial de colilert, desprenda la parte superior del vial, teniendo en cuenta de agregar todo el contenido.

Mezcle de manera que se disuelva completamente, luego vierta toda la suspensión a una bolsa de Quanti-tray, tomándola con la mano izquierda con los pozos hacia la palma de la mano, dejando caer el liquido sobre el papel de aluminio, golpear suavemente el extremo inferior de la bolsa con el mesón para sacar las burbujas, se deja en reposo hasta que se observe la desaparición de las burbujas.

Colocar la bolsa sobre la plantilla de caucho haciendo que los pozos de la bolsa coincidan con los orificios de la plantilla, y la parte superior de la bolsa (boca) dirigida hacia el analista, deslice la plantilla hasta que la selladora la sujete con los rodillos e inicie el sellamiento. Recupere la bolsa sellada que se desplaza a la parte posterior de la misma.

Verifique que la bolsa esté bien sellada e incube durante 24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La posición de la bolsa en la incubadora no tiene importancia debido a que la temperatura en es uniforme.

Transcurrido el tiempo cuente los pozos de color amarillo, verificando que el color sea mas fuerte que el del frasco de control que se encuentra en el mesón, lleve la bolsa a la cámara UV para verificar la fluorescencia que confirma la presencia de E. coli: Si no hay fluorescencia en ningún pozo, es una prueba negativa. Si hay fluorescencia es positiva y estos pozos se cuentan.



Para emitir el resultado, usar la tabla proporcionada por el proveedor que esta localizada en la parte superior del mesón de microbiología.

Si la respuesta cromogénica es cuestionable (amarillo no es nítido o no corresponde exactamente al patrón) después de 24 horas incubar 4 horas adicionales. Si el cromógeno se intensifica, la muestra es positiva para coliformes totales si no, es negativa.

12. RESULTADOS

12.1 RESULTADO PARA LOS COLIFORMES TOTALES.

Pasado el tiempo de incubación examine los pozos de la bolsa para ver si hay cambio a color amarillo, este nos indica que hay crecimiento de Coliformes totales o sea son positivas y las que no cambian de color no hay crecimiento y son negativas.

Cuente los pozos positivos (amarillos) grandes y registre el resultado en el formato de captura de datos, enseguida cuente los pozos pequeños positivos (amarillos) y registre también en el formato. Para el reporte del resultado final consulte la tabla de NMP.- Quanti-tray /2000, que se encuentra en la parte superior del mesón, busque el número de los pozos grandes en la primer columna (números colocado verticalmente, al lado izquierdo de esta), y en la parte superior de la tabla ubique el numero de pozos pequeños. Reporte el dato del punto de encuentro entre la fila y la columna en el formato TF0410 bajo la columna NMP de Coliformes totales. En la columna de resultado multiplique este por el inverso de la dilución.

12.2 RESULTADO PARA E. COLI .

Coloque la bolsa bajo la cámara de luz UV de longitud de onda larga (366 nm), cuente los pozos que presentan fluorescencia los cuales indican que son positivos para E. coli.

Para dar el resultado de E. coli se debe contar los pozos grandes y pequeños que presenten fluorescencia y seguir el procedimiento de interpolación y reporte mencionado para los Coliformes totales.

13. REFERENCIA

- GARCIA J.A., Fumarola, Rodríguez Torres, Piedrota G."MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA MEDICA" Editorial Salvat..
- CLESCERI, L., A. GREENBERG, A. EATON. 1998;
- AWWA, APHA, WEF" Standard Methods for the Examination of water and Wastewater" 21 th edition;2005.
- MERCK.,Microbiology Manual 12 th Edition.