PROMAIZ	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN AGUAS CLORADAS Y RESIDUALES	Código : MM-PM-015 Revisión : 000 Fecha : 08/12/2015 Página : 1 de 11
Elaborado por: C.Ramírez	Revisado por: A.Greig	Aprobado por: M.Garcia

REVISIONES DEL DOCUMENTO

Nro. Revisión	Fecha	Motivo de la Revisión	Páginas Revisadas/Modificadas
000	08/12/2015	Original	Todas

DOCUMENTO CONTROLADO
COPIA : ORIGINAL

Elaborado por: Carolina Ramírez	Revisado por: Anthony Greig	Aprobado por: Marta Garcia
Fecha elaboración: 07/12/2015	Fecha de revisión: 07/12/2015	Fecha de aprobación: 08/12/2015
Firma:	Firma:	Firma:

1. PRINCIPIO

El método se basa en la capacidad que tienen los microorganismos coliformes de fermentar la lactosa con producción de gas, al ser incubados a 35 ± 0.5 °C durante 48 horas.
Al tener tubos con fermentación se utiliza el método de aislar el grupo coliforme fecal, seleccionando los microorganismos por incubación del inóculo procedente de una caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas mayores a las normales 44.5°C ± 0.2°C, utilizando la técnica de tubos múltiples.

2. ALCANCE

El método es aplicable para aguas residuales y potables.

3. MATERIALES Y EQUIPOS

- Autoclave
- Asa de inoculación.
- Estufa de cultivo regulable 35 ± 0.5°C
- Estufa de esterilización
- Pipetas 10 mL, 1 mL y 0,1mL.
- Tubos de cultivo de 20mm x 150 mm y de 16 mm x 150 mm.
- Campanas Durham.
- Baño termostatado.
- Balanza semianalitica.
- Contenedores de pipetas.

4. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Agua destilada estéril
- Caldo lauril sulfato triptosa
- Medio EC

4.1 Preparación caldo lauril sulfato triptosa

- Disolver la cantidad adecuada del medio, según sea concentración simple o doble (Tabla N°1), en un litro de agua destilada y distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo, con campanas durham invertidos en su interior.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. El pH final del medio debe ser 6.8± 0.2.

Tabla N°1 Concentración y composición del medio basal

Compuestos	Concentración simple	Concentración doble
Triptosa	20.0 gr	40.0 gr
Lactosa	5.0 gr	10.0 gr
Fosfato dipotásico	2.75 gr	5.5 gr
Fosfato monopotásico	2.75 gr	5.5 gr
Cloruro de sodio	5.0 gr	10.0 gr
Lauril sulfato de sodio	0.1 gr	0.2 gr
Total	35.6 gr	71.2 gr

4.2 Preparación medio EC

- Disolver la cantidad adecuada del medio (Tabla N° 2) en un litro de agua destilada y distribuir en volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo, con campanas durham invertidos en su interior.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. El pH final del medio debe ser 6.9 ± 0.2.

Tabla N°2 Concentración y composición del medio basal

Compuestos	Concentración
Triptosa o tripticasa	20.0 gr
Lactosa	5.0 gr
Mezcla de sales biliares o sales biliares N°3	1.5 gr
Fosfato ácido de potasio K_2HPO_4	4.0 gr
Fosfato diácido de potasio, KH_2PO_4	1.5 gr
Cloruro de sodio	5.0 gr

5. PROCEDIMIENTO

- Antes de efectuar los cultivos, la botella con la muestra debe ser agitada vigorosamente.

5.1 DILUCIONES

a) Dilución 1:10 (10^{-1}) Tomar 1 mL de muestra y depositarla en un tubo de ensayo con 9 mL de agua de agua destilada estéril.

b) Dilución 1:100 (10^{-2}) De la dilución 1:10, tomar 1 mL y depositarlo en un tubo de ensayo, con 9 mL de agua destilada estéril.

- Las siguientes diluciones se efectúan de igual forma, de acuerdo a la cantidad de microorganismos esperados.

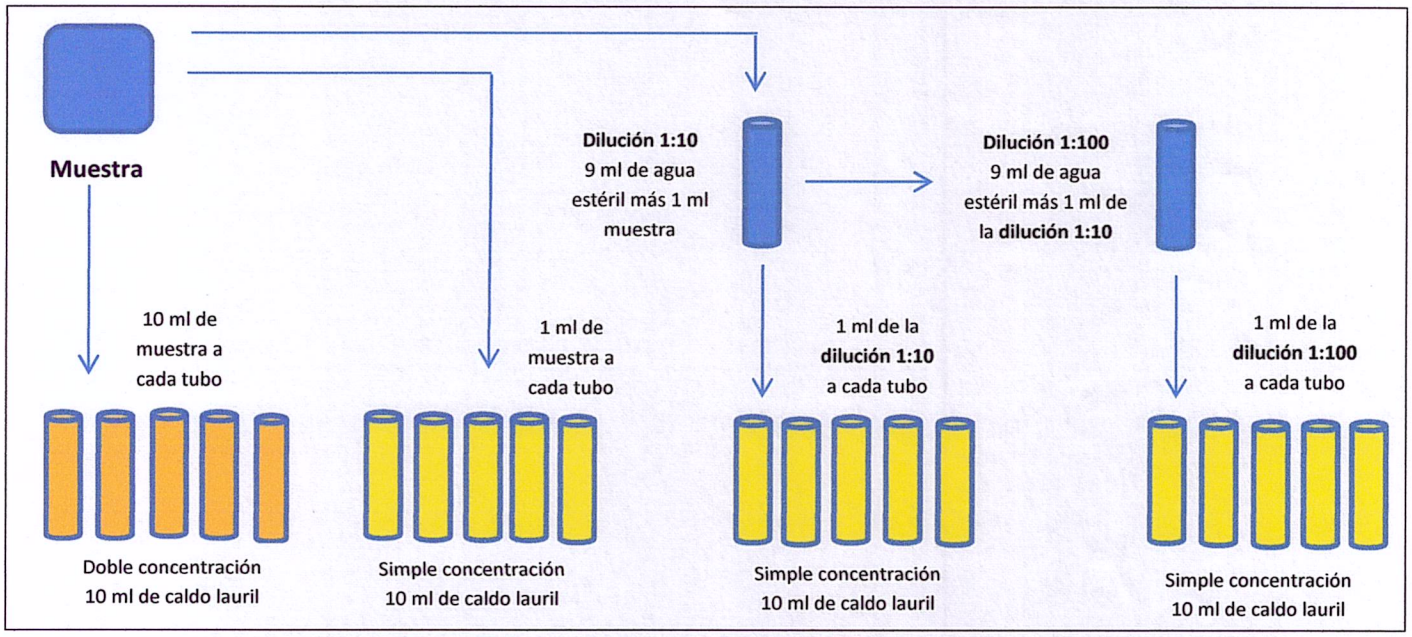
5.2 ENSAYO PRESUNTIVO

5.2.1 Las muestras se inoculan de acuerdo al siguiente Procedimiento Aguas Residuales (Diagrama N°1):

- Inocular 5 tubos de fermentación con caldo lauril triptosa concentración doble, con 10 mL de la muestra.
- Inocular 5 tubos de fermentación con caldo lauril triptosa concentración simple, con 1 mL de muestra.

- Inocular 5 tubos de fermentación con caldo lauril triptosa concentración simple, con 1 mL de la **dilución 1:10** (10^{-1}) de la muestra.
- Inocular 5 tubos de fermentación con caldo lauril triptosa concentración simple, con 1mL de la **dilución 1:100** (10^{-2}) de la muestra.
- Así sucesivamente se inocula de acuerdo a la cantidad de microorganismos esperados.

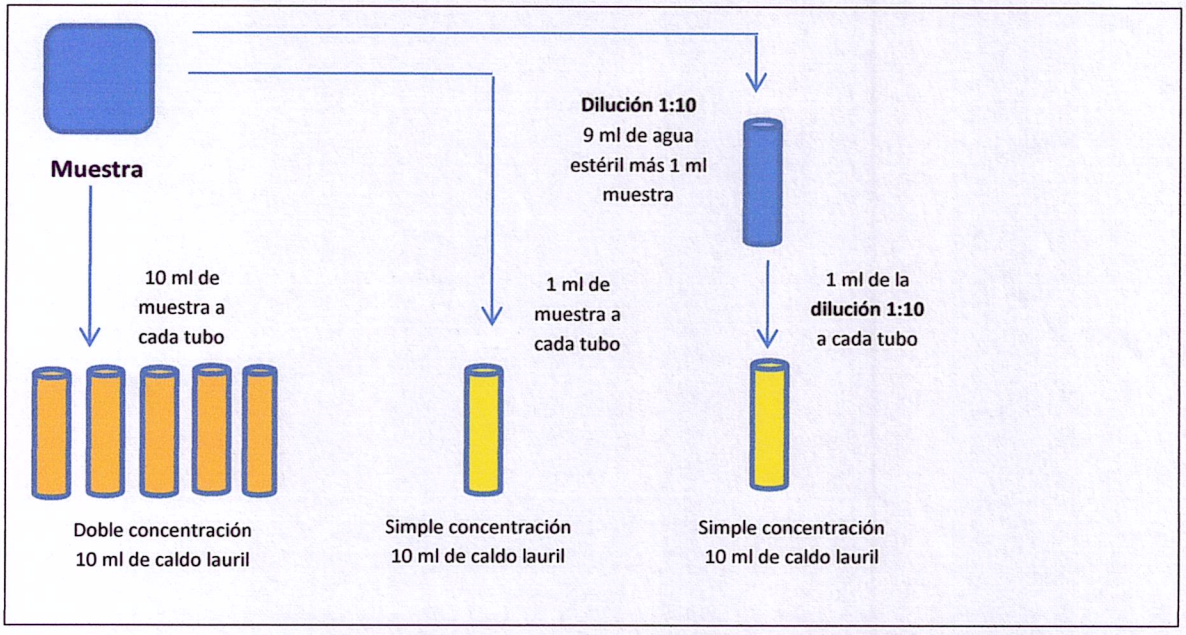
Diagrama N°1 Procedimiento aguas residuales



5.2.2 Las muestras se inoculan de acuerdo al siguiente procedimiento aguas cloradas (Diagrama N°2):

- Inocular 5 tubos de fermentación con caldo lauril triptosa concentración doble, con 10 mL de la muestra.
- Inocular 1 tubo de fermentación con caldo lauril triptosa concentración simple, con 1 mL de muestra.
- Inocular 1 tubo de fermentación con caldo lauril triptosa concentración simple, con 1 mL de la **dilución 1:10** (10^{-1}) de la muestra.

Diagrama N°2 Procedimiento aguas cloradas



5.3 INCUBACION

- Los tubos inoculados deben ser agitados suavemente para mezclar con el medio de cultivo.
- Incubar los tubos de fermentación a 35 ± 0.5 °C por 24 horas a 48 horas.
- Examinar los tubos a las 24 horas, registrar el número de tubos por dilución que presentes formación de gas y enturbiamiento como positivo. Incubar los tubos negativos hasta completar las 48 horas.
- La ausencia de formación de gas al finalizar las 48 horas de incubación, constituye un ensayo negativo para los organismos del grupo coliforme.

5.4 ENSAYO CONFIRMATIVO CALDO EC

- Todos los tubos positivos, que mostraron alguna formación de gas y enturbiamiento en caldo lauril triptosa, a las 24 horas y 48 horas de incubación a 35 °C ± 0.5 °C, deben ser sometidos a ensayos confirmativos.

5.4.1 PROCEDIMIENTO

- Homogenizar los tubos positivos del ensayo presuntivo por agitación o rotación suave.
- Transferir una asada completa del cultivo viable desde los tubos positivos del ensayo presuntivo, a un tubo de fermentación con caldo EC.
- Sumergir los tubos inoculados en el baño termostatado a 44.5°C ± 0.2 °C, de tal forma que el nivel de agua del baño sea superior al nivel del medio en el tubo, e incubar antes de que trascurran 30 min desde la inoculación.

- La producción de gas dentro de 24 horas ± 2 horas, es considerada con un ensayo positivo de coliformes fecales

6. EXPRESION DE RESULTADOS

Número más probable de bacterias coliformes según las siguientes combinaciones:

6.1 Tabla N°3 - Tabla para el cálculo de NMP

Número de tubos positivos			NMP en siembra de:	NMP en siembra de:	Número de tubos positivos			NMP en siembra de:	NMP en siembra de:	Número de tubos positivos			NMP en siembra de:	NMP en siembra de:
10 ml	1 ml	0.1 ml	5-10/1-1/1-0,1	5-10/5-1/5-0,1	10 ml	1ml	0,1 ml	5-10/1-1/1-0,1	5-10/5-1/5-0,1	10 ml	1ml	0,1 ml	5-10/1-1/1-0,1	5-10/5-1/5-0,1
0	0	0	...	...	0	3	4	...	13	1	1	2	...	8,1
0	0	1	2	1,8	0	3	5	...	15	1	1	3	...	10
0	0	2	...	3,6	0	4	0	...	7,5	1	1	4	...	12
0	0	3	...	5,4	0	4	1	...	9,4	1	1	5	...	14
0	0	4	...	7,2	0	4	2	...	11	1	2	0	...	6,1
0	0	5	...	9	0	4	3	...	13	1	2	1	...	8,2
0	1	0	2	1,8	0	4	4	...	15	1	2	2	...	10
0	1	1	4	3,6	0	4	5	...	17	1	2	3	...	12
0	1	2	...	5,5	0	5	0	...	9,4	1	2	4	...	15
0	1	3	...	7,3	0	5	1	...	11	1	2	5	...	17
0	1	4	...	9,1	0	5	2	...	13	1	3	0	...	8,3
0	1	5	...	11	0	5	3	...	15	1	3	1	...	10
0	2	0	...	3,7	0	5	4	...	17	1	3	2	...	13
0	2	1	...	5,5	0	5	5	...	19	1	3	3	...	15
0	2	2	...	7,4	1	0	0	2,2	2	1	3	4	...	17
0	2	3	...	9,2	1	0	1	4,4	4	1	3	5	...	19
0	2	4	...	11	1	0	2	...	6	1	4	0	...	11
0	2	5	...	13	1	0	3	...	8	1	4	1	...	13
0	3	0	...	5,6	1	0	4	...	10	1	4	2	...	15
0	3	1	...	7,4	1	0	5	...	12	1	4	3	...	17
0	3	2	...	9,3	1	1	0	4,4	4	1	4	4	...	19
0	3	3	...	11	1	1	1	6,7	6,1	1	4	5	...	22

6.1.2 Tabla N°3 (Continuación)

Número de tubos positivos			NMP en siembra de:	NMP en siembra de:	Número de tubos positivos			NMP en siembra de:	NMP en siembra de:	Número de tubos positivos			NMP en siembra de:	NMP en siembra de:
10 ml	1 ml	0.1 ml	5-10/1-1/1-0,1	5-10/5-1/5-0,1	10 ml	1ml	0,1 ml	5-10/1-1/1-0,1	5-10/5-1/5-0,1	10 ml	1ml	0,1 ml	5-10/1-1/1-0,1	5-10/5-1/5-0,1
1	5	0	...	13	2	3	0	...	12	3	1	0	...	11
1	5	1	...	15	2	3	1	...	14	3	1	1	...	14
1	5	2	...	17	2	3	2	...	17	3	1	2	...	17
1	5	3	...	19	2	3	3	...	20	3	1	3	...	20
1	5	4	...	22	2	3	4	...	22	3	1	4	...	23
1	5	5	...	24	2	3	5	...	25	3	1	5	...	27
2	0	0	5	4,5	2	4	0	...	15	3	2	0	...	14
2	0	1	7,5	6,8	2	4	1	...	17	3	2	1	...	17
2	0	2	...	9,1	2	4	2	...	20	3	2	2	...	20
2	0	3	...	12	2	4	3	...	13	3	2	3	...	24
2	0	4	...	14	2	4	4	...	15	3	2	4	...	27
2	0	5	...	16	2	4	5	...	18	3	2	5	...	31
2	1	0	7,6	6,8	2	5	0	...	17	3	3	0	...	17
2	1	1	10	9,2	2	5	1	...	20	3	3	1	...	21
2	1	2	...	12	2	5	2	...	23	3	3	2	...	24
2	1	3	...	14	2	5	3	...	26	3	3	3	...	28
2	1	4	...	17	2	5	4	...	29	3	3	4	...	31
2	1	5	...	19	2	5	5	...	32	3	3	5	...	35
2	2	0	...	9,3	3	0	0	8,8	7,8	3	4	0	...	21
2	2	1	...	12	3	0	1	12	11	3	4	1	...	24
2	2	2	...	14	3	0	2	...	13	3	4	2	...	28
2	2	3	...	17	3	0	3	...	16	3	4	3	...	32
2	2	4	...	19	3	0	4	...	20	3	4	4	...	36
2	2	5	...	22	3	0	5	...	23	3	4	5	...	40

6.1.3 Tabla N°3 (Continuación)

Número de tubos positivos			NMP en siembra de:	NMP en siembra de:	Número de tubos positivos			NMP en siembra de:	NMP en siembra de:	Número de tubos positivos			NMP en siembra de:	NMP en siembra de:
10 ml	1 ml	0.1 ml	5-10/5-1/5-0,1	5-10/5-1/5-0,1	10 ml	1ml	0,1 ml	5-10/1-1/1-0,1	5-10/5-1/5-0,1	10 ml	1ml	0,1 ml	5-10/1-1/1-0,1	5-10/5-1/5-0,1
3	5	0	...	25	4	3	2	...	39	5	1	4	...	110
3	5	1	...	29	4	3	3	...	45	5	1	5	...	130
3	5	2	...	32	4	3	4	...	52	5	2	0	...	49
3	5	3	...	37	4	3	5	...	59	5	2	1	...	70
3	5	4	...	41	4	4	0	...	34	5	2	2	...	95
3	5	5	...	45	4	4	1	...	40	5	2	3	...	120
4	0	0	15	13	4	4	2	...	47	5	2	4	...	150
4	0	1	20	17	4	4	3	...	54	5	2	5	...	180
4	0	2	...	21	4	4	4	...	62	5	3	0	...	79
4	0	3	...	25	4	4	5	...	69	5	3	1	...	110
4	0	4	...	30	4	5	0	...	41	5	3	2	...	140
4	0	5	...	36	4	5	1	...	48	5	3	3	...	180
4	1	0	21	17	4	5	2	...	56	5	3	4	...	210
4	1	1	27	21	4	5	3	...	64	5	3	5	...	250
4	1	2	...	26	4	5	4	...	72	5	4	0	...	130
4	1	3	...	31	4	5	5	...	81	5	4	1	...	170
4	1	4	...	36	5	0	0	38	23	5	4	2	...	22
4	1	5	...	42	5	0	1	96	31	5	4	3	...	280
4	2	0	...	22	5	0	2	...	43	5	4	4	...	350
4	2	1	...	26	5	0	3	...	58	5	4	5	...	430
4	2	2	...	32	5	0	4	...	76	5	5	0	...	240
4	2	3	...	38	5	0	5	...	95	5	5	1	...	350
4	2	4	...	44	5	1	0	240	33	5	5	2	...	540
4	2	5	...	50	5	1	1	...	46	5	5	3	...	920
4	3	0	...	27	5	1	2	...	64	5	5	4	...	1600
4	3	1	...	33	5	1	3	...	84					

- El número más probable de combinaciones que no aparecen en la tabla, o para otras combinaciones de tubos o diluciones, puede ser estimado por la siguiente formula:

$$\text{NMP x 100 mL} = \sqrt{\frac{\text{Número tubos positivos x 100}}{\text{(mL muestra tubos negativos) x (mL de muestra todos los tubos)}}}$$

7. REFERENCIAS

- Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th Edition
- Nch 2313 /22. OF 95. Aguas residuals- Métodos de analisis.Parte 22, Determinación de coliformes fecales en medio EC.