




Regional Distrito Capital  
Sistema de Gestión de la Calidad

PRÁCTICA DE LABORATORIO  
DETERMINACIÓN DE COLIFORMES, Y *E.coli* EN AGUAS RESIDUALES  
MEDIANTE TUBOS DE FERMENTACIÓN (NMP)

CÓDIGO:  
Versión 01

Centro de Gestión Industrial  
Junio 2020

 Sistema de Gestión de la Calidad	SUPERVISIÓN EN SISTEMAS DE AGUA Y SANEAMIENTO NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 2 de 10
--	---	--

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo general

Determinar el numero de coliformes y *E. coli* presente en muestras de agua residual, mediante la técnica de tubos de fermentación o número más probable (NMP)

### 1.2 Objetivos específicos

- Realizar las diluciones de las muestras de agua residual de acuerdo con la naturaleza de esta.
- Realizar la prueba presuntiva de coliformes mediante la siembra de las muestras en caldo lauril sulfato
- Realizar la prueba confirmativa mediante la siembra de tubos positivos de caldo lauril sulfato en caldo BRILLA.
- Determiar la presencia de *E. coli* mediante la siembra en agar EMB, MacConkey o Chromocult.
- Confirmar la presencia de bacilos negativos mediante la coloración de Gram
- Calcular el NMP de coliformes presentes en el agua residual de acuerdo con los resultados de las pruebas presuntivas y confirmativas para coliformes.


## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

La superpoblación a nivel mundial ha incrementado la demanda de agua apta para el consumo, fabricación y cultivo de alimentos, evidenciándose así la escasez de este liquido en condiciones de calidad y cantidad.

El uso del agua en actividades humanas genera a su vez la contaminación de esta, mediante la adición de sustancias químicas, materia orgánica y microorganismos que son vertidos en forma de aguas residuales de tipo doméstico e industrial, afectando los ecosistemas acuáticos, del los cuales la humanidad depende para obtener agua para el consumo.

La presencia de coliformes y *E.coli*, bacterias Gram negativas que fermentan la lactosa a  $35\pm 2$  °C, pueden indicar contaminación fecal, ya que estos microorganismos usualmente hacen parte de la carga intestinal normal de humanos y mamíferos, razón por la cual es frecuente encontrar este tipo de contaminación en aguas de tipo residual.

La caracterización y enumeración de coliformes en aguas residuales es fundamental para la implementación y mantenimiento de plantas de tratamiento de agua residual que eviten grandes descargas de estos microorganismos a los cuerpos de agua y afecte la salud

 Sistema de Gestión de la Calidad	SUPERVISIÓN EN SISTEMAS DE AGUA Y SANEAMIENTO NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 3 de 10
--	---	--

humana. El tratamiento de estas aguas puede minimizar el riesgo de salud pública que implica la presencia de microorganismos patógenos como los coliformes en los cuerpos de agua.

En esta práctica de laboratorio se procesarán muestras de agua residual para identificar la presencia y concentración de coliformes en estas muestras.

Esta práctica se realizará en cuatro días diferentes, en el día 5 se realizará la lectura de la prueba completa.

### 3. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

#### 3.1 Medios de cultivo

- Cuatro cajas de agar ChromoCult®, EMB o Mackonkey
- Treinta tubos con 10mL de caldo lauril sulfato estéril con campanas Durham
- Quince tubos con 10 mL de caldo bilis verde brillante (Brilla)
- 1 frasco con 90 ml de agua peptonada estéril
- 2 tubos con 9 ml de agua peptonada estéril

#### 3.2 Materiales

- 4 pipetas de 1 ml estériles
- 1 pipeta de 10 mililitros estéril
- 1 gradilla
- Asas redondas y rectas
- Pipeteador
- Mechero


#### 3.3 Equipos

- Incubadora
- Cabina de flujo laminar
- Contador de colonias

#### 3.4 Material del aprendizaje

- Muestra de agua residual con menos de 24 horas de almacenamiento.
- Bata, cofia, tapabocas, guantes, monogafas, marcador de vidrio, toallas de papel, toalla de tela, encendedor o fósforos, jabón de manos.

### 4. METODOLOGÍA

 Sistema de Gestión de la Calidad	SUPERVISIÓN EN SISTEMAS DE AGUA Y SANEAMIENTO NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 4 de 10
--	---	--

## DIA 1

### 4.1 Alistamiento del área de trabajo


- Limpie el mesón con una solución jabonosa y una toalla absorbente, enseguida desinfecte con una solución de alcohol al 70%.
- Deje todos los materiales estériles y medios que va a requerir en el área de trabajo previamente desinfectada.
- Tan pronto vaya a empezar a trabajar prenda el mechero o diríjase a la cabina de flujo laminar.

### 4.2 Preparación de las diluciones seriadas

- Marque el frasco con los 90 mL de agua peptonada como dilución  $10^{-1}$
- Para realizar la dilución  $10^{-1}$ , agite el frasco donde se encuentra la muestra y tome 10 mL de la muestra, lleve los 10 mL a 90 mL de agua peptonada, sosteniendo la pipeta en un ángulo de 45 grados sobre la parte interior del cuello del frasco .
- Agite el frasco vigorosamente, deje en reposo de 2 a 5 minutos.
- Para la dilución  $10^{-2}$  transfiera 1 mililitro de la dilución  $10^{-1}$  a un tubo con 9 mL de agua peptonada y agite de manera vigorosa el tubo.
- Repetir estos pasos hasta obtener el número de diluciones deseadas, cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.
- Guardar una contramuestra para eventuales verificaciones, en condiciones de refrigeración,

### 4.2 Prueba Presuntiva para Coliformes

- Agrupe los tubos de caldo lauril sulfato estéril en 3 hileras de 5
- Rotule cada grupo de 5 tubos con el numero de la dilución correspondiente a sembrar ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) y con la identificación de la muestra a sembrar.
- Agite el frasco de la dilución  $10^{-1}$  , y con una pipeta estéril tome 1 ml de la dilución y siémbrelo en uno de los tubos correspondientes, agite el tubo suavemente y verifique que no queden burbujas dentro de la campana Durham. Este paso lo debe repetir para los otros 4 tubos de la dilución  $10^{-1}$  . En lo posible utilice la misma pipeta para hacer la siembra de los cinco tubos
- Repita el paso anterior para el resto de diluciones a sembrar ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ )
- Lleve los tubos a incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  por 24 horas.
- Después de 24 h, gite los tubos suavemente y verifique la presencia de crecimiento, gas o acidificación (color amarillento).
- Los tubos con ausencia de gas o acidificación se considerarán negativos.

 Sistema de Gestión de la Calidad	SUPERVISIÓN EN SISTEMAS DE AGUA Y SANEAMIENTO NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 5 de 10
---	---	--

- Reincube los tubos negativos por 24 horas más.
- Registre los resultados en su cuaderno de laboratorio.

## DIA 2


Revise los resultados de la prueba presuntiva

### 4.3 Prueba confirmativa

- Lleve los tubos que dieron positivo a coliformes para la prueba presuntiva para su meson de trabajo, estos deberán ser sembrados en la prueba confirmativa
- Aliste una gradilla un tubo de caldo brilla estéril por cada uno de los tubos de Lauril sulfato positivos. En caso de que todos los tubos den positivos en dos o más diluciones consecutivas durante las primeras 24 horas; como método alternativo se sembraran únicamente los tubos de la dilución más alta
- Rotule los caldos brilla de acuerdo con la identificación de los tubos positivos a sembrar.
- Agite suavemente los tubos positivos antes de ser sembrados.
- Esterilice un asa redonda de aproximadamente 3mm de diámetro y deje enfriar cerca al mechero
- Tome una asada del tubo positivo y llévela a un tubo estéril de caldo brilla.
- Esterilice el asa y repita los mismos pasos para cada tubo positivo de la prueba presuntiva
- Lleve a incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  por 48 horas, la formación de gas en el tubo Durham, durante este periodo de tiempo a partir de las 6 horas se considerará como un resultado positivo.
- Calcule el NMP de acuerdo con los tubos positivos de la prueba confirmativa.

### 4.4 Prueba confirmativa para Coliformes termotolerantes

- A partir de los tubos positivos, siembre otra serie de tubos con caldo Brilla para determinar la presencia de coliformes termotolerantes, para realizar la siembra siga los pasos de la prueba anterior.
- Lleve los tubos a incubar a  $44^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas
- Verificar la producción de gas para identificar los tubos positivos.
- Calcule el NMP para coliformes termotolerantes de acuerdo con los tubos positivos de la prueba confirmativa.
-

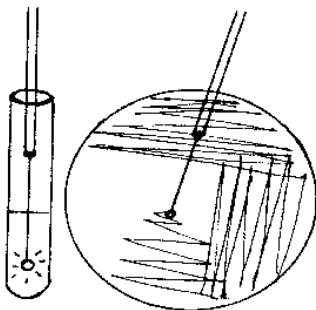
 Sistema de Gestión de la Calidad	SUPERVISIÓN EN SISTEMAS DE AGUA Y SANEAMIENTO NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 6 de 10
--	---	--

### DIA 3

Revise los resultados de la prueba confirmativa.

#### 4.5 Prueba Completa

- Lleve a su mesón, previamente desinfectado, los tubos positivos y el agar estéril de EMB, MacConkey o Chromocult.
- Rotule la base de las cajas de agar teniendo en cuenta la identificación de los tubos a sembrar
- Siembre cada tubo positivo siguiendo la técnica de alistamiento por estria:
- Esterilice el asa redonda y déjela enfriar
- Tome una asada de 0.5 cm de profundidad del tubo positivo, sin tomar espuma o membranas disueltas en el tubo.
- Coloque el asa en la superficie del agar y realice estrías(zigzag) en el primer cuadrante de la caja, esterilice nuevamente el asa y deje enfriar, a partir de la ultima estría realice nuevas estrías en el cuadrante 2, vuelva a repetir este procedimiento hasta sembrar los cuatro cuadrantes.




- Incube la caja en posición invertida a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  por 48 horas

### DIA 4

#### 4.6 Lectura y reporte de los resultados para Colimormes y *E.coli*.

- Revise los resultados de los agares sembrados previamente.
- **Si sembró en agar ChromoCult**, identifique las colonias de presuntos coliformes como colonias de rosa a rojo debido a la producción de la enzima B- D- galactosidasa. Las colonias que presentan producción de B- D- galactosidasa y B-D- glucoronidasa se evidenciarán mediante una coloración azul y pertenecen a *E.coli*
- **Si sembró en agar MacConkey**, identifique las colonias rojas como presuntos coliformes, fermentadores de lactosa.

 Sistema de Gestión de la Calidad	SUPERVISIÓN EN SISTEMAS DE AGUA Y SANEAMIENTO NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 7 de 10
--	---	--

- Si sembró en agar **EMB**, identifique las colonias negras azuladas como presuntos coliformes y las colonias con brillo verde metálico como posibles *E. coli*

#### 4.7 Continuación prueba complementaria

Tome las colonias positivas para coliformes crecidas en las cajas de agar y siémbrelas en caldo lauril sulfato para ello,

Tome un asa recta, esterilícela y déjela enfriar

Pinche una colonia típica de coliformes y llévela a un caldo de lauril sulfato

Realice este procedimiento para cada una de las cajas donde se encontraron colonias positivas para coliformes

Lleve a incubar los tubos a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  por 48 horas

Los tubos que donde se produzca gas serán positivos para coliformes.

#### 4.8 Comprobación de bacilos Gram negativos por Tinción de Gram

Realice un frotis bacteriano siguiendo estos pasos:

- Limpie un portaobjetos
- Coloque una gota de agua sobre el portaobjetos
- Con un asa recta estéril, pinche una colonia identificada como coliformes y mézclela con a la gota de agua colocada previamente en el portaobjetos. Realice la homogenización de la muestra haciendo círculos pequeños en la gota
- Deje secar el frotis al medio ambiente
- Cuando el frotis esté seco, fíjelo pasando 3 veces el portaobjetos por la llama del mechero.

Realice la tinción de Gram siguiendo estos pasos:

Coloque una gota de cristal violeta sobre el frotis y deje actuar por 1 minuto

Deje correr agua lentamente sobre el frotis para retirar el colorante.

Adicione una gota de lugol y déjela actuar por 1 minuto

Lave con agua

Adicione una gota de alcohol acetona y déjelo actuar por 15 segundos

Lave con agua

Adicione una gota de Fucsina o Zafranina


Lave con agua

Deje secar

Enfoque en el microscopio en 100 x

Determine la presencia de bacilos Gram negativos

### 5. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE NMP

 Sistema de Gestión de la Calidad	SUPERVISIÓN EN SISTEMAS DE AGUA Y SANEAMIENTO NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 8 de 10
--	---	--

La densidad de los coliformes se calcula en términos de NMP y la lectura de la prueba realizada en esta práctica de laboratorio se hará teniendo en cuenta la siguiente tabla que es para series de cinco tubos.

**Tabla 1.** Índice de NMP y límites de aceptación del 95% para distintas combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan cinco tubos por dilución (10ml, 1,0 ml0,1ml) Tomada de la NTC 4939

Combinación de positivos	Índice NMP/ 100 ml	Límites de confianza del 95 % (aproximados)	
		Superior	Inferior
0-0-0	<2	-	-
0-0-1	2	1,0	10
0-1-0	2	1,0	10
0-2-0	4	1,0	13
1-0-0	2	1,0	11
1-0-1	4	1,0	15
1-1-0	4	1,0	15
1-1-1	6	2,0	18
1-2-0	6	2,0	18
2-0-0	4	1,0	17
2-0-1	7	2,0	20
2-1-0	7	2,0	21
2-1-1	9	3,0	24
2-2-0	9	3,0	25
2-3-0	12	5,0	29
3-0-0	8	3,0	24
3-0-1	11	4,0	29
3-1-0	11	4,0	29
3-1-1	14	6,0	35
3-2-0	14	6,0	35
3-2-1	17	7,0	40
4-0-0	13	5,0	38
4-0-1	17	7,0	45
4-1-0	17	7,0	46
4-1-1	21	9,0	55
4-1-2	26	12	63
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80

Continúa . . .




 Sistema de Gestión de la Calidad	SUPERVISIÓN EN SISTEMAS DE AGUA Y SANEAMIENTO NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 9 de 10
---	---	--

Tabla 1. Continuación tabla 1,NMP para serie de cinco tubos. Tomada de la NTC-4939

Combinación de positivos	Índice NMP/ 100 ml	Límites de confianza del 95 % (aproximados)	
		Superior	Inferior
5-0-0-	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	580
5-4-3	280	120	690
5-4-4	350	160	820
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	>1600	-	-

Como las diluciones utilizadas en la práctica son diferentes a las relacionadas en la tabla, se debe utilizar la siguiente formula para calcular el NMP

$$\frac{NMP}{100mL} = \frac{NMP(10)}{Volumen\ mayor\ probado}$$


La tabla se aplica así:

Si por ejemplo de la dilución  $10^{-1}$ : 5 tubos dieron positivos; de la dilución  $10^{-2}$  2 tubos dieron positivo y de la dilución  $10^{-3}$  0 tubos dieron positivo se debe buscar el siguiente código en la tabla: 5-2-0 , según la tabla este resultado tiene un NMP de 50. Este valor se utilizara para remplazar el NMP de la formula así:

$$\frac{NMP}{100mL} = \frac{50(10)}{0.1\ mL} = 5000 = 5.0 \times 10^3$$

Donde NMP se toma de la tabla

Registre los datos en el cuaderno de laboratorio.

 Sistema de Gestión de la Calidad	SUPERVISIÓN EN SISTEMAS DE AGUA Y SANEAMIENTO NORMAS TÉCNICAS Regional Distrito Capital Centro de Gestión Industrial	Fecha: Mayo 2020 Versión: 01 Página 10 de 10
--	---	---

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Madigan, M. (2015). Brock. Biología de los microorganismos. (14a. ed.) Pearson Educación. Tomado de <http://www.ebooks7-24.com.bdigital.sena.edu.co/?il=5285>
- NTC 4939(2001).Calidad del agua. Enumeración de coliformes y Escherichia coli. Técnica con tubos de fermentación y técnica de sustrato enzimático. <https://e-collection-icontec-org.bdigital.sena.edu.co/pdfview/viewer.aspx?locale=es-US&Q=3A8C88511E5E9370224FB62C502D1C42&Req=>
- NTC- ISO 6134 (2015). Calidad del agua. Guía general sobre la enumeración de microorganismos por cultivo. <https://e-collection-icontec-org.bdigital.sena.edu.co/pdfview/viewer.aspx?locale=es-US&Q=68E7F49E3A7F20FB306CF6AF0FA67E3A&Req=>
- 
- 
-