

**Topic:** Colilert<sup>®</sup>, Colisure<sup>®</sup>, Quanti-Tray<sup>®</sup>, Quanti-Tray<sup>®</sup>/2000 Approval in Guatemala for Drinking and Source Waters

**Title:** Agua. Prueba de sustrato enzimático para determinación de coliformes totales y *Escherichia coli*

**Source:** COGUANOR NGO 29 018 h21, NORMA GUATEMALTECA OBLIGATORIA

**Date:** 2007

**Highlights:**

- Colilert, Colisure and Quanti-Tray/Quanti-Tray/2000 are approved in Guatemala as Enzymatic Substrate methods for the detection and enumeration of total coliforms and *E. coli* in both drinking and source water
- Approval document follows

**NORMA  
GUATEMALTECA  
OBLIGATORIA**

**COGUANOR  
NGO 29 018 h21**

---

**Agua. Prueba de sustrato enzimático para determinación de coliformes totales y *Escherichia coli***



Comisión Guatemalteca de Normas  
Ministerio de Economía

8ª. Avenida 10-43, zona 1, 3<sup>er</sup> nivel  
PBX / Fax: (502) 238 3330 al 238  
3337 Ext. 3901

[Info-coguanor@mail.mineco.gob.gt](mailto:Info-coguanor@mail.mineco.gob.gt)  
<http://www.mineco.gob.gt>

Referencia  
ICS: 07.100.20

**CONTENIDO**

1. OBJETO .....	4
2. ALCANCE .....	4
3. DEFINICIONES .....	4
4. PRINCIPIO .....	5
5. EQUIPO Y MATERIALES.....	5
6. MEDIO CON SUSTRATO .....	5
7. PROCEDIMIENTO.....	6
8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	6
9. REPORTE .....	7
10. CONTROL DE CALIDAD .....	7
11. CORRESPONDENCIA.....	8
BIBLIOGRAFÍA .....	9

## Agua. Prueba de sustrato enzimático para coliformes totales y *Escherichia coli*

### 1. OBJETO

Esta norma tiene por objeto establecer el procedimiento de sustrato enzimático para la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en agua.

### 2. ALCANCE

La presente norma se recomienda para el análisis de muestras de agua potable y de fuentes naturales. No es aplicable en formulaciones para el análisis de aguas marinas, las cuales no se incluyen.

No utilice la prueba de sustrato enzimático para verificar cultivos presuntivos de coliformes o colonias presentes en los filtros de membrana, debido a que el sustrato puede sobrecargarse con una gran cantidad de bacterias no coliformes que son productoras débiles de  $\beta$ -D- galactosidasa, produciendo resultados falsos positivos.

### 3. DEFINICIONES

**3.1 Grupo coliforme (coliformes totales).** Las bacterias coliformes totales pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracterizan por ser de forma bacilar, Gram negativo, aeróbicas y anaeróbicas facultativas, no forman esporas y fermentan el azúcar lactosa con producción de ácido y gas a 35<sup>0</sup>C dentro de 48 h. A este grupo pertenecen bacterias de los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*, entre otros.

**3.2 *Escherichia coli*:** La bacteria *Escherichia coli* es una bacteria perteneciente al grupo coliforme que fermenta la lactosa a 44.5<sup>0</sup>C  $\pm$  0.2<sup>0</sup>C con producción de ácido y gas en 48 h. Es el indicador de contaminación fecal mas preciso debido a que su único hábitat es el intestino de animales de sangre caliente, por lo que se ha utilizado como indicador biológico de contaminación fecal.

**3.3 Enzimas:** Son proteínas de alto peso molecular que se distinguen del resto de proteínas por sus propiedades catalíticas. Son entonces, proteínas que tienen la propiedad de acelerar la velocidad de reacciones químicas, llevándolas hacia el equilibrio y sin ser consumidas en el proceso. Esta acción catalítica es, por lo general, altamente específica al material o sustrato sobre el que actúa, tanto biológicamente como en condiciones de laboratorio.

**3.4 Sustrato enzimático:** Es una sustancia química que es susceptible de cambiar sus propiedades, como resultado de la acción de una enzima específica para ella.

## 4. PRINCIPIO

**4.1 Generalidades.** La enumeración de microorganismos del grupo coliforme en agua es una herramienta útil en la determinación de la potabilidad del agua. El método descrito en esta norma utiliza sustratos fácilmente hidrolizados por las enzimas del grupo coliforme y por *Escherichia coli*. Los coliformes totales comprenden el grupo que posee la enzima  $\beta$ -D galactosidasa, que separa el sustrato cromogénico, produciendo la liberación del cromógeno. *Escherichia coli* se define como miembro del grupo de coliformes totales y además, posee la enzima  $\beta$ -glucuronidasa que escinde un sustrato fluorogénico, produciendo la liberación del fluorógeno. La prueba se puede utilizar ya sea en un formato de tubos múltiples, pozos múltiples, o de presencia-ausencia (muestra simple de 100 mL).

### 4.2

Los laboratorios que pretenden implementar este procedimiento deberán conducir en un inicio, una prueba cuantitativa paralelamente con uno de los métodos convencionales para coliformes, para evaluar la efectividad de la prueba en el tipo específico de agua analizada y para comparar las dos técnicas. Esta comparación debe incluir variaciones estacionales. Esto es particularmente importante cuando se analizan muestras de fuentes de agua.

Las muestras de agua que contienen humus, u otro material pueden estar coloreadas. Si existe un color de fondo, compare tubos inoculados con un tubo control conteniendo solamente la muestra de agua. En algunas aguas, el alto contenido de sales de calcio puede causar precipitación pero esto no debe afectar la reacción.

**4.2 Bacterias coliformes totales:** Sustratos cromogénicos, tales como orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) o rojo clorofenol- $\beta$ -D-galactopiranosido (CPRG), se utilizan para detectar la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, la cual es producida por bacterias coliformes totales. La enzima  $\beta$ -D-galactosidasa hidroliza el sustrato y produce un cambio de color, el cual indica una prueba positiva para coliformes totales a las 24 h (ONPG) ó 28 h (CPRG) de incubación, sin procedimientos adicionales. Las bacterias no coliformes, tales como especies de *Aeromonas* y *Pseudomonas*, pueden producir pequeñas cantidades de la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, pero están suprimidas y generalmente no producirán una respuesta positiva dentro del tiempo de incubación, a menos que estén presentes más de  $10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC)/mL ó  $10^6$  UFC/100 mL.

**4.3 Escherichia coli:** Un sustrato fluorogénico, tal como el 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucuronido (MUG), es utilizado para detectar la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, la cual es producida por *E. coli*. La enzima  $\beta$ -glucuronidasa hidroliza el sustrato y genera un producto fluorescente cuando se ve bajo luz ultravioleta de onda larga (366 nm). La presencia de fluorescencia indica un resultado positivo para *E. coli*. Algunas cepas de *Shigella* spp. también pueden producir una respuesta fluorescente positiva. Debido a que las especies de *Shigella* spp. son reconocidas como patógenos para seres humanos, esto no se considera un inconveniente para analizar la calidad sanitaria de agua.

## 5. EQUIPO Y MATERIALES

- Incubadora a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- Lámpara UV 366 nm
- Tubos o bandejas y sellador de bandeja, si se utiliza método cuantitativo.
- Botellas, si se utiliza el método cualitativo.

## 6. MEDIO CON SUSTRATO

**6.1** Las formulaciones están disponibles comercialmente en tubos desechables para la técnica de tubos múltiples, en placas desechables para la técnica multiceldas, o en recipientes para 100 mL de muestra para la prueba presencia-ausencia. También están disponibles porciones apropiadas prepesadas del reactivo para mezclar y dispensar en tubos múltiples para pruebas con porciones de 10 mL u otros recipientes para 100 mL de muestra. Es válida la aplicación de cualquier juego de reactivos comercial que utilice el principio de sustrato enzimático y sea aprobado por una institución reconocida internacionalmente en este campo.

**6.2** La necesidad del buen aseguramiento de calidad y uniformidad requiere de la utilización de un medio con sustrato comercial, evitar la exposición directa y prolongada a la luz solar, almacenar el medio de acuerdo a las instrucciones y utilizarlo antes de la fecha de expiración. Descarte los medios en que se observe cambio de color.

## 7. PROCEDIMIENTO

**7.1 Procedimiento de Tubos Múltiples:** Seleccione la cantidad apropiada de tubos por muestra conteniendo el medio ya preparado y rotúlelos. Siga las instrucciones del fabricante para la preparación de las diluciones seriadas según la formulación. Agregue asépticamente 10 mL de muestra a cada tubo, cierre perfectamente, y agite vigorosamente para disolverlo. La mezcla permanece incolora con pruebas a base de ONPG y se torna amarilla con el sustrato CPRG. Algunas partículas pueden quedar insolubles durante toda la prueba; esto no altera su desempeño. Incube a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por el período de tiempo especificado por el fabricante del sustrato.

El procedimiento también puede ser llevado a cabo añadiendo las cantidades apropiadas del medio con sustrato a la muestra, agite vigorosamente, y dispénelo en 5 ó 10 tubos estériles. Incube según lo establecido en el procedimiento de tubos múltiples.

**7.2 Procedimiento de pozos múltiples:** El procedimiento de pozos múltiples se realiza con bandejas desechables esterilizadas. Agregue la muestra al recipiente de 100 mL, agregue el sustrato, agite vigorosamente, y dispense dentro de la bandeja. El sellador de bandeja dispensará la muestra dentro de las celdas y sellará la bandeja. Incube a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por el período de tiempo especificado por el fabricante de sustrato. El valor de número más probable (NMP) es obtenido a partir de una tabla de referencia proporcionada por el fabricante.

**7.3 Procedimiento de presencia-ausencia (P/A):** Asépticamente agregue el medio enzimático prepesado a 100 mL de muestra en una botella de borosilicato,

**C o n t i n ú a**

estéril, transparente y no fluorescente o un recipiente equivalente. Si cuenta con el recipiente estéril con el medio con sustrato provisto por el fabricante, agregue 100 mL de muestra. Cierre el recipiente de manera aséptica y mezcle vigorosamente hasta disolver. Incube según lo especificado en las instrucciones del fabricante.

## 8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**8.1 Coliformes totales.** Examine los tubos o placas después del período mínimo de incubación, para determinar el cambio de color apropiado (Tabla 1). ONPG es hidrolizado por la enzima de la bacteria y produce un color amarillo. CPRG es hidrolizado por la enzima de la bacteria y produce un color magenta o rojo. Si la respuesta del color no es uniforme en el tubo, mezcle por inversión antes de interpretar. Lea las instrucciones del fabricante. Algunos fabricantes sugieren comparar las muestras contra comparadores de color proporcionadas por el mismo. Las muestras son negativas para coliformes totales si no se observa ningún color para pruebas con ONPG o si el tubo es amarillo si se utiliza CPRG. Si una respuesta cromogénica es dudosa después de 18 h a 24 h para ONPG, incube hasta un máximo de 4 h adicionales. Si la respuesta es negativa después de 28 h para CPRG, incube hasta un máximo de 20 h adicionales. Si el cromógeno se intensifica, la muestra es positiva para coliformes totales; de lo contrario, la muestra es negativa.

**8.2 *Escherichia coli*.** Examine la fluorescencia de los tubos o recipientes que resultaron positivos para coliformes totales utilizando una lámpara ultravioleta de onda larga (366 nm, preferiblemente con bombilla de 6 vatios). Compare cada tubo contra el comparador de referencia disponible de la casa comercial del sustrato. Si la presencia de fluorescencia es dudosa, incube 4 h adicionales para pruebas con ONPG y hasta 20 h adicionales con pruebas CPRG; la intensificación de fluorescencia es un resultado positivo.

## 9. REPORTE

**9.1** Si se realiza un procedimiento de NMP, calcule el valor de NMP para coliformes totales y *E. coli* a partir del número de tubos positivos como se describe en la Norma COGUANOR NGO 29 001 1ª revisión Agua potable. Especificaciones. Si se utiliza el procedimiento de presencia-ausencia, reporte los resultados como coliformes totales y *E. coli* presentes o ausentes en 100 mL de muestra.

**Tabla 1. Cambios de color para varios medios**

Sustrato	Coliformes Totales POSITIVO	<i>E. coli</i> POSITIVO	RESULTADO NEGATIVO
ONPG-MUG	Amarillo	Fluorescencia azul	Incoloro/no fluorescencia
CPRG-MUG	Rojo o Magenta	Fluorescencia azul	Amarillo/no fluorescencia

## 10. CONTROL DE CALIDAD

Pruebe cada nuevo lote de medio inoculando tres bacterias como controles: *Escherichia coli*, otra bacteria coliforme por ejemplo, *Enterobacter cloacae*, y una no coliforme.

Incluya también un control de agua estéril. Si el control de agua estéril exhibe alguna fluorescencia o resultado positivo para coliformes totales, aún de reacción débil, descarte el sustrato y utilice un nuevo lote. Evite utilizar un inóculo abundante. Si se utiliza *Pseudomonas* como representante del grupo no coliforme, seleccione una especie no fluorescente. Incube estos controles a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  como se indicó anteriormente. Lea y registre los resultados. Otras guías de control de calidad están incluidas en manuales de organizaciones reconocidas internacionalmente (por ejemplo, Sección 9020 del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 edición).

## 11. CORRESPONDENCIA

Para la elaboración de la presente norma se tomo de referencia el siguiente documento:

- Enzyme Substrate Coliform Test, 9223. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. [American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation]. Clesceri, L.S., A.E., Greenberg, A.D., Eaton (ed), Baltimore, 1998. United Book Press, Inc. 20<sup>th</sup> ed.



**BIBLIOGRAFÍA**

- Clark, J. A. & A.H. Shaarawi. 1993. Evaluation of commercial presence-absence test kits for detection of total coliforms. *Escherichia coli*, and other indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:380.
- Covert, T.C., E.W. Rice, S.A. Johnson, D. Berman, C.H. Johnson & P.M. Mason. 1992. Comparing defined substrate coliform tests for the detection of *Escherichia coli* in water. *J. Amer. Water Works Assoc.* 84(5):98.
- Covert. T.C., L.C. Shadix, E.W. Rice., J.R. Haines & R.W. Freyberg. 1989. Evaluation of the Autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2443.
- Edberg S. C., F. Ludwig & D.B. Smith. 1991. The Colilert® System for Total Coliforms and *Escherichia coli*. American Water Works Association Research Foundation, Denver, Colo.
- Edberg, S., M.J. Allen, D.B. Smith & N.J. Kriz. 1990. Enumeration of total coliformes and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:366.
- Edberg, S.C. & M.M. Edberg. 1988. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. *Yale J. Biol. Med.* 61:389.
- Edberg, S.C., M.J. Allen & D.B. Smith. 1991. Defined substrate technology method for rapid and simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from water: Collaborative study. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 74:426.
- Edberg, S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & The National Collaborative Study. 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1595.
- Edberg, S.C., M.J. Allen. D.B. Smith & The National Collaborative Study. 1989. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with presence-absence techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1003.
- Edberg. S.C. & D.B. Smith. 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a public water supply. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:380.
- McCarty, S.C., J.H. Standridge & M.C. Stasiak. 1992. Evaluating a commercially available defined-substrate test for recovery of chlorine-treated *Escherichia coli*. *J. Amer. Water Works Assoc.* 84(5).91.
- McFeters, G.A., S.C. Broadway, B.H. Pyle. M. Pickett & Y. Egozy. 1995. Comparative performance of Colisure™ and accepted methods in the detection of chlorine-injured total coliforms and *E. coli*. *Water Sci. Technol.* 31:259.
- Palmer, C.J., Y Tsal, A.L. Lang & L.R. Sangermano. 1993. Evaluation of Colilert-marine water for detection of total coliformes and *Escherichia coli* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:786.
- Rice, E.W., M.J. Allen & S.C. Edberg. 1990. Efficacy of B-glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1203.

Rice, E.W., M.J. Allen, D.J. Brenner & S.C. Edberg. 1991. Assay for B-glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its application for drinking water analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:592.

Shadix, L.C. & E.W. Rice. 1991. Evaluation of B-glucuronidase assay for the detection of *Escherichia coli* from environmental waters. *Can. J. Microbiol.* 37:908.

U.S. Environmental Protection Agency. 1994. National Primary and Secondary Drinking Water Regulation: Analytical Methods for regulated drinking water contaminants; Final Rule. 40 CFR parts 141 & 143; *Federal Register* 59:62456.

-----ULTIMA LINEA-----