

VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA COLILERT PARA LA DETERMINACIÓN Y CUATIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES y *Escherichia coli* EN UNA MATRIZ DE AGUA NATURAL

Arboleda-Baena, C.M¹, Arismendi-González, L.M¹, Sepúlveda-Sánchez, M¹, Rodríguez-López, M¹, Betancur-Urán, J¹.

¹ Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental, GAIA. microbiología.gaia@gmail.com

RESUMEN

La metodología Colilert permite la detección de los indicadores sanitarios de calidad del agua, Coliformes totales y *Escherichia coli*, debido a su selectividad y especificidad. El objetivo de este trabajo fue verificar la metodología Colilert en una matriz de agua natural. La repetibilidad de la metodología para Coliformes totales y *E. coli* obtuvo un coeficiente de variación (CV) menor al 6% y 7%, respectivamente. Para los dos indicadores la precisión intermedia tuvo un CV < 6% y los porcentajes de recuperación estuvieron entre 80-120%. Los resultados demostraron que el método es preciso, repetible y exacto según los criterios de aceptación consignados en la Guía Técnica Colombiana GTC 84:2003, el *Standard methods for the examination of water* y la Norma Internacional ISO/9308-2:2012. En consecuencia, el método es apropiado para la detección y cuantificación de Coliformes totales y *E. coli* y permite a los clientes acceder a resultados confiables y oportunos.

Palabras clave: Metodología Colilert, indicadores de calidad microbiana del agua, Número más probable.

Recibido: 21 de Septiembre de 2015.
Received: September 21st, 2015.

Aceptado 27 de Junio de 2016.
Accepted: June 27th, 2016.

VERIFICATION OF COLILERT METHODOLOGY FOR DETERMINING AND QUANTIFYING TOTAL COLIFORMS AND ESCHERICHIA COLI IN A NATURAL WATER MATRIX

ABSTRACT

Due to its selectivity and specificity, the Colilert methodology allows one to detect the sanitation indicators of water quality, total Coliforms and *Escherichia coli*. The aim of this study was to test the Colilert methodology applied to a natural water matrix. With a variation coefficient (CV) less than 6% and 7% for total Coliforms and *E. coli* respectively, this methodology has proven its repeatability. For both indicators, the middle accuracy was CV < 6% and percentages of recuperation were between 80–120%. The results proved that this method is precise, repeatable and accurate, according to the acceptance criteria entered in the Colombian Technique Guide GTC 84 from 2003; the Standard methods for the examination of water and the International Rule ISO/9308–2:2012. Thus, the method is suitable for detecting and quantifying total Coliforms and *E. coli*, while providing truthful and timely results for customers.

Keywords: Colilert methodology, microbial water quality indicators, most probable number.

Cómo citar este artículo: C. M. Arboleda-Baena; L. M. Arismendi-González; M. Sepúlveda-Sánchez; M. Rodríguez-López; J. Betancur-Urán, "Verificación de la metodología colilert para la determinación y cuatificación de coliformes totales y *escherichia coli* en una matriz de agua natural," *Revista Politécnica*, vol. 12, no. 22, pp. 105-112, 2016.

1. INTRODUCCIÓN

Según la OMS, Organización Mundial de la Salud, (2015) el agua dulce es un recurso limitado y su calidad está bajo presión constante debido al aumento de contaminación [1]. Sus diferentes usos: abastecimiento de agua potable, producción de alimentos, piscicultura, zootecnia, riego y el uso recreativo exigen un monitoreo constante de la calidad química y microbiológica de este recurso [1]. Se considera como agua contaminada aquella cuya composición se ha visto alterada de tal forma que no cumple con las condiciones óptimas para sus diferentes usos. Entre los contaminantes, es común encontrar agentes patógenos causales de enfermedades entéricas y no entéricas que alteran la calidad microbiológica del agua y causan, cada año, la muerte de millones de personas a nivel mundial [2]. Para el 2013, la OMS reportó que en los países en vía de desarrollo, un alto porcentaje de las enfermedades son transmitidas por el agua, siendo las diarreicas la segunda causa principal de muerte infantil. Adicionalmente, existen registros que determinan que por año mueren alrededor de 760.000 niños menores de cinco años debido al consumo de aguas contaminadas y a un saneamiento deficiente de las mismas [3]. Por otro lado, actividades como la pesca y la recreación exigen una calidad microbiológica del agua que garantice la salud de las personas y los ecosistemas acuáticos.

Los métodos para la detección de microorganismos patógenos de origen intestinal en el agua, en general son de alto costo e implican largos tiempos para su determinación, en comparación con los Coliformes totales y *Escherichia coli*. Estos microorganismos se constituyen en excelentes indicadores de contaminación, al hacer la correspondencia con la presencia de otros patógenos de vías intestinales. Determinar la presencia de estos indicadores en el agua permitirá sugerir la calidad microbiológica de la matriz agua natural.

Con el propósito de contar con una herramienta confiable y precisa, que permita identificar la calidad microbiológica del agua en fuentes naturales, en relación con la presencia de Coliformes totales y *E. coli*, el grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental GAIA, efectuó la estandarización y verificación de la metodología Colilert, en una matriz de agua natural. Los resultados obtenidos, serán el instrumento con el cual los usuarios podrán establecer puntos

críticos de vigilancia y control, además del origen de la contaminación que podría afectar las fuentes de agua.

La verificación es la comprobación de la aptitud de cada laboratorio, bajo sus condiciones particulares de operación, para implementar metodologías de ensayo que ya han sido validadas.

La metodología Colilert o Enzima-Sustrato definido Colilert, se fundamenta en la actividad enzimática de los Coliformes totales y *E. coli*. Esta se constituye en una prueba eficaz y rápida en la detección de los indicadores sanitarios de calidad del agua anteriormente mencionados, puesto que la expresión enzimática del grupo Coliformes reacciona muy selectivamente con el sustrato suministrado para dicha prueba, evitando así falsos resultados que podrían involucrar a otras bacterias fermentadoras de lactosa [4]. La forma de cuantificar las bacterias se realiza por el método del Número Más Probable (NMP), técnica que se basa en las leyes de probabilidades y se utiliza para obtener una estimación del número de bacterias en una muestra [5].

Adicionalmente, la metodología Colilert permite procesar simultáneamente un volumen importante de muestras, por el reducido espacio que se requiere y por la minimización de materiales y reactivos empleados en comparación con otras metodologías. Este método es muy sensible y se puede aplicar en un rango de 1 a 1800 NMP/100mL para detectar y cuantificar la concentración de Coliformes totales y *E. coli*. [4]

El objetivo principal de éste trabajo fue verificar la metodología Colilert para la determinación y cuantificación de Coliformes totales y *E. coli* en una matriz de agua natural, según los lineamientos establecidos en la Norma Internacional ISO/9308-2:2012 [6, 7, 8, 9].

2. METODOLOGÍA

2.1 Lugar de muestreo: Lago del Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe de Medellín, ubicado en el departamento de Antioquia, Colombia (Ver Figura 1).

2.2 Procedimiento en el laboratorio: Los análisis se realizaron en el grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental GAIA. En cámara de flujo laminar se midieron 100 mL de la muestra de agua natural en una probeta estéril y se llevaron

a un frasco estéril de 250 mL. Se añadió el contenido de un blíster Colilert. Se tapó y se agitó diez veces el recipiente hasta disolver. Se vertió el contenido del recipiente en una bolsa Quanti-Tray/2000, se eliminaron las burbujas y se selló en un IDEXX Quanti-Tray Sealer. Las bolsas se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 horas. Las lecturas se realizaron de acuerdo a lo establecido en la Norma Internacional ISO/9308-2:2012. Se realizaron lecturas preliminares entre las 18 y 22 horas de incubación y una lectura final entre las 24 y 28 horas.

El resultado se reportó de acuerdo a la Tabla IDEXX Quanti-Tray/2000:

- Sin coloración amarilla ni fluorescencia → Resultado negativo para Coliformes totales y *E. coli*.
- Amarillo igual o mayor al comparador IDEXX, Comparador Quanti-Tray/2000 N ° WQT2KC → Resultado positivo para Coliformes totales.
- Amarillo igual o mayor al comparador IDEXX y con fluorescencia azul → Resultado positivo para *E. coli*.

Durante todo el ensayo se garantizó la esterilidad siguiendo los lineamientos establecidos en la Norma Técnica Colombiana NTC 4543 de 1998 [10].

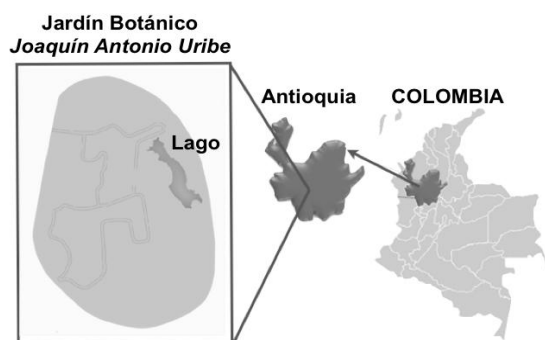


Fig 1. Lago del Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe, Medellín, Antioquia, Colombia.

2.3 Toma de muestra y siembra inicial (día 1)

Se colectaron 20 litros de agua natural en un recipiente plástico (botellón), se transportaron y almacenaron durante una hora bajo condiciones de refrigeración, entre 4 a 8°C , siguiendo lo establecido en la ISO 19458 [11].

En el laboratorio de microbiología del Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental-GAIA, se realizaron 6 diluciones en agua destilada

estéril a partir de la muestra de agua natural y se sembró con un blíster Colilert con el fin de conocer la concentración inicial de microorganismos en la muestra.

2.4 Selección de la dilución de trabajo y límites de detección (día 2)

Se efectuaron las lecturas de los resultados para determinar la presencia y la concentración de los indicadores Coliformes totales y *E. coli*.

Se tomaron las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Citrobacter freundii* 8090 como control positivo y *Pseudomonas aeruginosa* 10145 como control negativo. Se activaron 24 horas antes del ensayo en 20 mL de caldo nutritivo, a una temperatura de $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, para los dos primeros indicadores se hicieron 9 diluciones seriadas en frascos con 90 mL de agua destilada estéril y se tomaron 4 diluciones según la siguiente clasificación (**Tabla 1**):

- Concentración ALTA: 10^{-6} NMP/100mL
- Concentración MEDIA: 10^{-7} NMP/100mL
- Concentración BAJA: 10^{-8} NMP/100mL
- Límite de detección: 10^{-9} NMP/100mL

De cada una de la diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} se tomó 1 mL y se inoculó en 100 mL de agua destilada estéril y se realizó el *Procedimiento Colilert* (Ver **Fig. 2**).

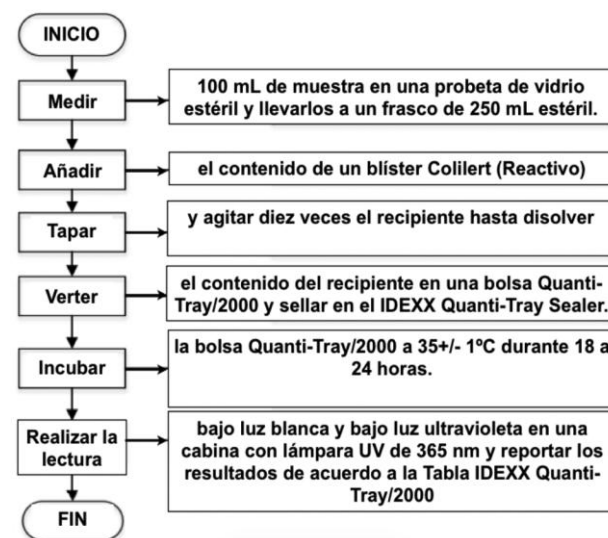


Fig 2. Procedimiento Colilert

El cálculo del límite de detección se realizó a partir de la fórmula 1 [4]:

$$P(+) = 1 - e^{-m} \quad (1)$$

En donde,

P(+): Probabilidad de detectar la presencia del analito

e: Es la base de logaritmo natural

m: en el número promedio de partículas por porción analítica.

2.5 Precisión: Repetibilidad y Precisión Intermedia (día 3)

Se seleccionó una dilución de la muestra de agua natural en la cual se obtuvieron recuentos de los indicadores. Luego, dos analistas sembraron esta muestra, siguiendo el procedimiento Colilert, de tal forma que se obtuvieran 15 repeticiones por analista y 30 datos por muestra.

Posterior a lectura de los resultados, se realizó una normalización (Log_{10}) de los datos y se obtuvo la media, la varianza y la desviación estándar. A partir de estos datos se calcularon los límites de confianza de la prueba, la repetibilidad y la precisión intermedia, a través de las fórmulas 2 y 3, respectivamente:

$$\%R \text{ y } r = (1 - \sigma^2) \times 100 \quad (2)$$

$$\%R \text{ y } r = 100 - C.V \quad (3)$$

Donde,

σ : Varianza

C.V: Coeficiente de variación.

2.6 Exactitud. Porcentaje de Recuperación (día 4 y 5)

Con el fin de observar la recuperación de los indicadores se analizó la muestra de agua natural a través del método Colilert y paralelamente, se analizó la misma muestra con adición de un inóculo de referencia conocido. El porcentaje de recuperación se calculó de acuerdo al valor promedio de la muestra inoculada sobre la suma del promedio de la cepa y el promedio de la muestra. Una baja recuperación comparada con la recuperación del estándar es una razón para reconsiderar la aplicación del método [12].

La fórmula utilizada para hallar el porcentaje de recuperación fue la siguiente:

$$\%R = \frac{\text{Promedio muestra inoculada}}{\text{Promedio cepa} + \text{Promedio muestra}} \times 100 \quad (4)$$

Donde,

%R = Porcentaje de recuperación

3. RESULTADOS

3.1 Recuento inicial de la muestra de agua natural: Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe

La muestra fue positiva para Coliformes totales y *E. coli* con una carga inicial de 52,015 NMP/Coliformes totales y 2,894.67 NMP/*E. coli* en 100mL. A partir de estos resultados se realizó una dilución a la muestra de agua natural hasta 10^{-2} para garantizar el recuento de los indicadores durante el ensayo de verificación.

3.2 Selección de la dilución de trabajo de las cepas

Los resultados de las diluciones Alta, Media, Baja y Límite de detección para *Escherichia coli* 25922 y *Citrobacter freundii* 8090, se presentan en la **Tabla 1**:

Tabla 1. Límite de detección para *Escherichia coli* 25922 y *Citrobacter freundii* 8090

DILUCIÓN	<i>E. coli</i> (NMP/100ml)	<i>C.freundii</i> (NMP/100ml)
10^{-6}	613.1	248.9
10^{-7}	26.5	17.5
10^{-8}	5.2	4.1
10^{-9}	1	<1

3.3 Límite de detección

Cuando el límite de detección se define en términos de la probabilidad de registrar un resultado positivo, debe calcularse con la ecuación 1.

A continuación se presentan los resultados para *Citrobacter freundii* 8090 y *Escherichia coli* 25922 en las **Tablas 2 y 3**.

Tabla 2. Límite de detección del método Colilert para *Escherichia coli* 25922.

DILUCIÓN	<i>E. coli</i> NMP/100ml	<i>E. coli</i> Log(NMP/100ml)
10^{-6}	613.1	1
10^{-7}	26.5	1
10^{-8}	5.2	0.995
10^{-9}	1	0.632

Una de las definiciones del límite de detección es "la concentración a la cual la probabilidad de detectar la presencia del analito es igual al 95%,

$p(+)= 0.95$ " [12]. Por lo tanto el límite de detección del método Colilert para *E. coli* y *C. freundii* se presenta en la dilución 10^{-8} , ya que en 10^{-9} la probabilidad de detección es menor al 95%.

Tabla 3. Límite de detección del método Colilert para *Citrobacter freundii* 8090

DILUCIÓN	<i>C.freundii</i> NMP/100ml	<i>C.freundii</i> Log(NMP/100ml)
10^{-6}	248.9	1
10^{-7}	17.5	1
10^{-8}	4.1	0.994483416
10^{-9}	<1	<0.632120311

3.4 Repetibilidad

Los resultados de la repetibilidad para el Analista 1 y 2, se presentan en la **Tabla 4** y **5**.

Tabla 4. Repetibilidad del ensayo realizado por el analista 1.

AGUA NATURAL	Coliformes totales Log(NMP/100ml)	<i>E. coli</i> Log(NMP/100ml)
Media	2,45	1,70
DS	0,13	0,09
C.V.	5,39	5,21

El Analista 1 obtuvo un 94.6% de repetibilidad para la determinación de Coliformes totales y un 94.8% para la determinación de *E. coli* con el método Colilert en una matriz de agua natural.

Tabla 5. Repetibilidad del ensayo realizado por el analista 2

AGUA NATURAL	Coliformes totales Log(NMP/100ml)	<i>E. coli</i> Log(NMP/100ml)
Media	2,41	1,67
DS	0,13	0,11
C.V.	5,52	6,49

El Analista 2 obtuvo un 94.5% de repetibilidad para la determinación de Coliformes totales y un 93.5% para la determinación de *E. coli* con el método Colilert en una matriz de agua natural.

3.5 Precisión Intermedia

Los resultados de la precisión intermedia del Analista 1 y 2, se presentan en la **Tabla 6**.

En el ensayo realizado por los analistas, se obtuvo un 94.58% de confianza para la determinación de Coliformes totales y un 94.08% de confianza para la determinación de *E. coli*.

Tabla 6. Precisión Intermedia del ensayo realizado por los analistas 1 y 2.

AGUA NATURAL	Coliformes Totales Log(NMP/100ml)	<i>E. coli</i> Log(NMP/100ml)
Media	2,43	1,69
DS	0,13	0,10
C.V.	5,42	5,92

Después de normalizar los datos con la función Log_{10} y realizar el análisis de varianza de un factor para el recuento (NMP/100mL) de Coliformes totales y *E. coli* en 15 repeticiones para cada uno de los analistas, se obtuvo un valor de F menor que el F crítico, lo cual significa que se acepta la igualdad de medias, es decir, no existen diferencias significativas entre los Analistas 1 y 2.

3.6 Porcentaje de recuperación

El porcentaje de recuperación para Coliformes totales y *Escherichia coli*, utilizando la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, para la concentración alta, media y baja se presentan en las **Tablas 7** y **8**.

Tabla 7. Resultados estadísticos del porcentaje de recuperación para Coliformes totales en una matriz de agua natural, utilizando *E. coli* ATCC 25922

Dilución	Coliformes totales			
	Media Log(NMP/100ml)	DS	CV (%)	% R
10-6	2,77	0,07	2,48	102,73
10-7	2,40	0,10	4,05	91,58
10-8	2,38	0,11	4,47	96,70

Tabla 8. Resultados estadísticos del porcentaje de recuperación para *E. coli* en una matriz de agua natural, utilizando *Escherichia coli* ATCC 25922

Dilución	<i>Escherichia coli</i>			
	Media Log(NMP/100ml)	DS	CV (%)	% R
10-6	2,57	0,14	5,63	103,83
10-7	1,89	0,08	4,19	105,44
10-8	1,65	0,10	6,30	99,48

El porcentaje de recuperación para Coliformes totales, utilizando la cepa *Citrobacter freundii* ATCC 8090, para la concentración alta, media y la baja se presentan en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados estadísticos del porcentaje de recuperación para Coliformes totales en una matriz de agua natural, utilizando *Citrobacter freundii* ATCC 8090.

Dilución	Coliformes totales			
	Media Log(NMP/100ml)	DS	CV (%)	% R
10 ⁻⁶	2,604	0,09	3,31	98,5
10 ⁻⁷	2,380	0,12	5,03	118,2
10 ⁻⁸	2,400	0,12	4,81	127,8

De acuerdo con los criterios de aceptación consignados en la Norma Internacional ISO/9308-2:2012, la GTC 84 del 2003 y el *Standard methods for the examination of water and wastewater* 9223, se expresan a continuación los resultados obtenidos en el proceso de verificación.

Límite de detección:

El límite de detección del método Colilert para *Citrobacter freundii* y *E. coli* se presenta en la dilución 10⁻⁸ con 4 NMP/mL para *C.freundii* y 5 NMP/mL para *E. coli*.

Repetibilidad:

El criterio de aceptación para Coliformes totales y *E. coli* es un coeficiente de variación menor al 20%. [4, 9].

En la verificación del grupo GAIA se obtuvo una repetibilidad para Coliformes totales con un CV < 6% y para *E. coli* un CV < 7%, valores ubicados dentro de los criterios de aceptación.

Precisión Intermedia:

El criterio de aceptación de la precisión Intermedia para Coliformes totales y *E. coli* es un Coeficiente de variación menor a 20% [4, 9].

La verificación realizada en el grupo GAIA reportó un CV < 6% tanto para Coliformes totales como para *E. coli*, estando dentro del criterio de aceptación.

Exactitud:

Los criterios de aceptación para estas variables especifican que el método debe tener un porcentaje de recuperación entre 80 y 120% para Coliformes totales y *E. coli* [13 -14].

En esta verificación, se obtuvo un porcentaje de recuperación para Coliformes totales de 98 > %< 128 y para *E. coli* del 99 > %< 106.

Se demostró la exactitud del método ya que los porcentajes de recuperación realizados a las

muestras de agua natural estuvieron entre 80 y 120% tanto para *E. coli* como para *Citrobacter freundii* [13 -14].

4. DISCUSIÓN

Verificar metodologías de análisis microbiológico, se ha convertido en una prioridad para las entidades y grupos de investigación que como el GAIA buscan ofrecer a la sociedad un servicio confiable y oportuno en la determinación de la calidad microbiológica del recurso hídrico. El proceso de verificación permite generar certeza sobre los resultados obtenidos, en cumplimiento de criterios de calidad y seguridad, que estén acordes con la Normatividad vigente en el país y que puedan ser reconocidos internacionalmente.

Al comparar los resultados de éste trabajo con otros que aplican la metodología Colilert (**Tabla 10**), se observa que se cumple con los criterios de aceptación.

Tabla 10. Comparación de los resultados con los criterios de aceptación y otras investigaciones.

Parámetro	Resultado obtenido	Criterios de aceptación [4,9,12-14]	Otros Trabajos
Límite de Detección	1 NMP/100ml	Probabilidad de detectar la presencia del analito igual al 95%, p(+)= 0.95"	Para los dos indicadores [15] 1 NMP/100ml <i>E.coli</i> [16] 1.8 NMP/100ml
Repetibilidad	Coliformes totales CV r < 6% <i>E. coli</i> CV r < 7%	Coliformes totales CV r < 20% <i>E. coli</i> CV r < 20%	Para los dos indicadores [15] CV r < 11,3% Coliformes totales [4] CV r < 0.02% <i>E.coli</i> [4] CV r < 0%
Precisión	Coliformes	Coliformes	Dos <i>E.coli</i> [16] CV r < 50%

Intermedia	totales CV R < 6%	totales CV R < 20%	indicadores [15] CV R <4,6%
	<i>E. coli</i> CV R < 6%	<i>E. coli</i> CV R < 20%	Coliformes totales [4] Cv R < 0.02%
			<i>E. coli</i> [4] CV R < 0.007%
			<i>E. coli</i> [16] CV R < 40%
		<i>E. coli</i> [17] CV R < 17.7%	
Exactitud	Coliformes totales 98>%<128	Coliformes totales y <i>E. coli</i> 80 - 120%	Dos indicadores [15] <105,2%
	<i>E. coli</i> 99>%<106		<i>E. coli</i> [17] 25>%<143.6

5. CONCLUSIÓN

La metodología Sustrato Definido-Colilert (NMP/100mL), es altamente reproducible para la determinación de Coliformes totales y *Escherichia coli* en una matriz de agua natural.

Durante el proceso se evaluaron los parámetros Límite de detección, Repetibilidad, Precisión intermedia y Exactitud del método, obteniendo resultados satisfactorios con respecto a los criterios de aceptación consignados en la Norma Internacional ISO/9308-2:2012, la GTC 84 del 2003 y el *Standard methods for the examination of water and wastewater*.

La metodología Colilert brinda confiabilidad y oportunidad en los resultados de tal manera que se puedan reconocer puntos críticos de contaminación en los cuerpos de agua y la calidad microbiológica de dicha fuente en relación con los indicadores Coliformes totales y *E. coli*, permitiendo la implementación de medidas de control en beneficio de la salud pública.

Los resultados obtenidos demostraron que el método es Preciso y Exacto, por tanto, es apropiado para su desarrollo en el laboratorio de

microbiología del Grupo GAIA y para la prestación del servicio.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia, a David González de la empresa Aqualab por su asesoría y acompañamiento y al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) por el soporte financiero al proyecto: COL13-1-12 "Validación y acreditación de la metodología Colilert para la determinación de Coliformes totales y *Escherichia coli* en una matriz de agua natural para el Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental, GAIA" en el marco de la convocatoria 561 del año 2012.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Organización Mundial de la Salud, OMS. Agua. Nota descriptiva N°391, Centro de Prensa, 2014 Disponible en : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/> [Consultada el 1 de Septiembre de 2015]
- [2]. Organización Mundial de la Salud, OMS. Guidelines for safe recreational water environments Volume 1: Coastal and fresh waters, Chapter 4 Faecal pollution and water quality, 2003.
- [3]. Organización Mundial de la Salud, OMS. Enfermedades diarreicas. Nota descriptiva N° 330, Centro de Prensa, 2013. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/> [Consultado el 5 de Septiembre de 2015]
- [4]. IDEXX. Validación del método Colilert®-18/Quanti-Tray® para el recuento de *E. coli* y de bacterias coliformes en muestras de agua, One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, EE. UU, 2008.
- [5]. García, G., Velásquez, L.F., Gómez, G., Pineda, F. y Saldarriaga, Y. Manual de laboratorio de microbiología general. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Instituto de Biología, Medellín, 2004.
- [6]. República de Colombia. Usos del agua y residuos líquidos. República de Colombia. Decreto 1594 de 1984. Bogotá. 1984.

- [7]. Norma técnica Colombiana. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*, NTC-ISO/IEC 17025, ICONTEC, Ed 2005.
- [8]. República de Colombia. Normas técnicas de calidad del agua potable, Decreto 475 de 1998, Bogotá, 1998.
- [9]. International Standards Organization, ISO. Calidad del Agua- Enumeración de *Escherichia coli* y bacterias Coliformes- Parte 2: Método del número más probable, NORMA ISO/9308-2, 2012.
- [10]. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC. Esterilización de productos para el cuidado de la salud. Requisitos para validación y rutina de control, Esterilización por calor húmedo industrial, Norma técnica Colombiana NTC 4543, Bogotá, D.C, 1998.
- [11]. International Standards Organization, ISO. Provides guidance on planning water sampling regimes, on sampling procedures for microbiological analysis and on transport, handling and storage of samples until analysis begins, ISO 19458:2006 focuses on sampling for microbiological investigations, ISO 19458, 2006.
- [12]. Guidance on Validation of Microbiological Methods. Calidad del agua, Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos, Adopción idéntica (IDT) por traducción de la ISO/TR 13843:2000 Water Quality, GTC 84, 2003.
- [13]. American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 9223, Enzyme Substrate Coliform Test, Vol 2, 22ND Edition, Washington DC, 2012.
- [14]. American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 9221 C, Estimation of Bacterial Density, Vol 2, 22ND Edition, Washington DC, 2012.
- [15]. Roa-Navarro, M.O., Orjuela L.C y Solano-Duque, M.E. Determinación de Coliformes totales y E. Coli de aguas mediante la técnica de sustrato definido, colilert por el método de Numero Más Probable. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, República de Colombia, Subdirección de hidrología, Grupo laboratorio de Calidad Ambiental, Código TP0423, Versión 02, 2007.
- [16]. Mathieu, N. Quality Assurance Project Plan, Fecal Coliform Method Comparison Study in Estuarine Waters of Washington State, Washington State Department of Ecology, 2012.
- [17]. Bohn, G y Brouillard, E. Alternative Bacteria Source Identification using Colilert®/Quanti-Tray 2000 Test Method in Irrigated Agricultural Watersheds, Washington State Department of Ecology, 2011.