



NORMA MEXICANA

NMX-AA-042-SCFI-2015

ANÁLISIS DE AGUA - ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES, ORGANISMOS COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES) Y *Escherichia coli* - MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE EN TUBOS MÚLTIPLES (CANCELA A LA NMX-AA-42-1987).

WATER ANALYSIS - ENUMERATION OF TOTAL COLIFORM ORGANISMS, THERMOTOLERANT FECAL COLIFORM ORGANISMS AND *Escherichia coli*- MULTIPLE TUBE (MOST PROBABLE NUMBER) METHOD



P R E F A C I O

En la elaboración de la presente norma mexicana, participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- CÉSAR CLEMENTE ALVARADO GARCÍA
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA.
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S. A. DE C. V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A.C.
- HACH COMPANY
- IDECA, S.A. DE C.V.
- INDEX-LAB
- INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE TAMAULIPAS, A.C.
Centro de Investigación y Tecnología en Saneamiento Ambiental
(CITSA)
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.



NMX-AA-042-SCFI-2015

- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE SERVICIOS CLÍNICOS Y ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS S.A. DE C.V.
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PERKIN ELMER DE MÉXICO, S.A.
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, I.P.D.
Laboratorio Central de Calidad de Aguas
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA,
UNIDAD IZTAPALAPA
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Ciencia y Tecnología Ambiental,
Depto. Biotecnología

UNIDAD AZCAPOTZALCO
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Depto. de Ciencias Básicas,
Área de Química
- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.



NMX-AA-042-SCFI-2015

UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos

- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química
Instituto de Biología
Instituto de Ingeniería

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número del capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	1
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	1
2	REFERENCIAS	2
3	DEFINICIONES	2
4	PRINCIPIO	3
5	RECOLECCIÓN, ALMACENAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS	3
6	DILUYENTE, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	3
7	EQUIPO Y MATERIALES	5
8	MUESTREO	5
9	PROCEDIMIENTO	7
10	EXPRESIÓN DE RESULTADOS	10
11	INFORMACIÓN REQUERIDA DE LA PRUEBA	10
12	TABLAS DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)	11
13	MANEJO DE RESIDUOS	17
	APÉNDICE NORMATIVO A	18
14	VIGENCIA	22
15	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	23
16	BIBLIOGRAFÍA	23
	APÉNDICE INFORMATIVO B	24



NORMA MEXICANA

NMX-AA-042-SCFI-2015

ANÁLISIS DE AGUA - ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES, ORGANISMOS COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES) Y *Escherichia coli* – MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE EN TUBOS MÚLTIPLES (CANCELA A LA NMX-AA-42-1987).

WATER ANALYSIS - ENUMERATION OF TOTAL COLIFORM ORGANISMS, THERMOTOLERANT FECAL COLIFORM ORGANISMS AND *Escherichia coli* - MULTIPLE TUBE (MOST PROBABLE NUMBER) METHOD

0 INTRODUCCIÓN

La presencia y el grado de contaminación fecal es un factor importante en la evaluación de la calidad de un cuerpo de agua. Examinar muestras de agua para detectar presencia de organismos del grupo de las bacterias coliformes¹ (los cuales normalmente habitan el intestino humano y de otros animales de sangre caliente), provee un indicador de contaminación. Ya que la habilidad de algunos organismos miembros del grupo de las bacterias coliformes de sobrevivir en el agua es limitada, su cantidad puede también ser utilizada para estimar el grado de contaminación fecal reciente.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

La presente norma mexicana especifica el método enumeración en agua de organismos coliformes, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* (*E. coli*) mediante cultivo en un medio líquido contenido en tubos múltiples y cálculo de su número más probable en la muestra, en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Es de aplicación nacional.

¹ Véase apéndice informativo B para mayor información microbiológica relevante para el examen de organismos del grupo de bacterias coliformes.

La Dirección General de Normas de la Secretaría de Economía aprobó la presente norma mexicana, cuya declaratoria de vigencia fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el:

Este método puede ser aplicado a todos los tipos de agua, incluyendo aquellos que contienen cantidades apreciables de materia suspendida.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de la presente norma mexicana, se deben consultar las siguientes normas mexicanas vigentes:

- NMX-AA-089/1-SCFI-2010 Protección al ambiente - calidad del agua - vocabulario - parte 1. Declaratoria de vigencia publicada en el diario Oficial de la Federación el 3 de marzo de 2011.

- NMX-AA-089/2-SCFI-2010 Protección al ambiente - Calidad del agua - Vocabulario - Parte 2.(Cancela a la NMX-AA-089/2-1992). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 agosto de 2013

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de la presente norma mexicana, aplican los términos y definiciones contenidos en: NMX-AA-089/1-SCFI y NMX-AA-089/2-SCFI (véase 2 Referencias); y se establecen las siguientes definiciones:

3.1 Organismos coliformes totales

Organismos aerobios o anaerobios facultativos capaces de crecer a 35 °C en un medio líquido de lactosa, con producción de ácido y gas en un período de 48 h.

3.2 Organismos coliformes fecales (termotolerantes)

Organismos coliformes como los que se describen en 3.1 los cuales tienen las mismas propiedades fermentativas en un periodo de 24 h a 44,5 °C ± 0,2 °C.

3.3 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Organismos coliformes fecales (termotolerantes) como los descritos en 3.2, los cuales además producen indol a partir de triptófano en un lapso de 24 h a 44,5 °C ± 0,2 °C.

4 PRINCIPIO

Inoculación de alícuotas de muestra, diluida o no diluida, en una serie de tubos en medio líquido selectivo conteniendo lactosa.

Examen de los tubos después de 24 h y de 48 h incubados a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Subcultivo de cada tubo que muestre turbidez y producción de gas en un medio confirmativo más selectivo y, cuando se busca *E. coli* se subcultiva en un medio donde pueda ser demostrada la formación de indol.

Incubación de estos medios confirmativos por un periodo de 24 h a 48 h ± 3 h ya sea a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ para la enumeración de organismos coliformes y de $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ por 22 h a 26 h para organismos coliformes termotolerantes y *E. coli*.

Mediante tablas estadísticas, cálculo del número más probable (NMP) de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *E. coli* expresadas como contenidas en 100 mL de la muestra a partir del número de tubos positivos en los resultados confirmativos.

5 RECOLECCIÓN, ALMACENAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS

5.1 Recolectar en frascos o bolsas estériles mínimo 100 mL de muestra. La toma de muestra es en recipientes estériles con tiosulfato de sodio sólido (10 mg/envase de 100 mL) o con 0,1 mL de disolución estéril al 10 %.

5.2 Para su traslado las muestras deben de mantenerse a una temperatura de $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

5.3 Conservar dentro del laboratorio en refrigeración a $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Atemperar la muestra antes del análisis sin exceder en todo el proceso las 24 h después de la recolección de la última muestra. Se puede analizar la muestra hasta 48 h después de su recolección conservándola a $2\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6 DILUYENTE, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Materiales básicos

Usar ingredientes de calidad uniforme y sustancias químicas de grado analítico para la preparación de los medios de cultivo y reactivos, seguir las instrucciones del apéndice normativo A. Usar medios completamente deshidratados y seguir estrictamente las instrucciones del fabricante.

El agua para la preparación de medios de cultivo y disoluciones, debe ser destilada o desionizada libre de sustancias que puedan inhibir el crecimiento, con conductividad $\leq 5 \mu\text{S}/\text{cm}$.

6.2 Diluyente

Para preparar las diluciones de la muestra, usar el diluyente recomendado en el apéndice normativo A.

6.3 Medios de cultivo para prueba presuntiva:

Usar uno de los siguientes medios de cultivo:

6.3.1 Caldo Lactosa

6.3.2 Caldo MacConkey

6.3.3 Caldo lauril triptosa (lactosa) o caldo lauril sulfato de sodio.

6.4 Medios de cultivo para prueba confirmativa:

6.4.1 Caldo para producción de gas

6.4.1.1 Caldo lactosa bilis verde brillante para coliformes totales y coliformes fecales

6.4.1.2 Caldo EC para coliformes fecales termotolerantes

6.4.2 Medio para producción de indol

6.4.2.1 Agua de triptona o agua peptonada

6.4.2.2 Caldo lauril triptosa manitol con triptófano: medio para producción de gas y formación de indol.

6.4.3 Medio para tubo único: formación de gas y producción de indol

6.5 Reactivos

6.5.1 Reactivo de Kovac o equivalente para la prueba de indol.

6.5.2 Reactivo de oxidasa para la prueba de oxidasa

Las instrucciones para su preparación están dadas en el apéndice normativo A.

7 EQUIPO Y MATERIALES

- 7.1** Horno para esterilización por calor seco con temperatura de 170 °C a 175 °C durante 2 h ó 180 °C durante 1 h.
- 7.2** Autoclave que alcance y mantenga una temperatura de al menos 121 °C o una presión manométrica de 103 kPa, durante 15 min.
- 7.3** Incubadora o baño de agua con termostato controlado de 35 °C ± 0,5 °C.
- 7.4** Incubadora o baño de agua con termostato controlado de 44,5 °C ± 0,2 °C.
- 7.5** Medidor de pH
- 7.6** Frascos de vidrio o bolsas estériles para muestreo
- 7.7** Pipetas graduadas estériles
- 7.8** Cajas Petri
- 7.9** Tubos de fermentación (campanas Durham)
- 7.10** Tubos de vidrio con tapón
- 7.11** Asas bacteriológicas
- 7.12** Material común de laboratorio

8 MUESTREO

La recolección de las muestras de agua para el análisis microbiológico, depende del tipo de agua que se desee muestrear.

Las muestras se deben recolectar en recipientes estériles con un volumen mínimo de muestra de 100 mL. Para muestras que contengan cloro libre, colocar en su interior, previo a la esterilización, 0,1 mL de disolución de tiosulfato de sodio al 10 %; si son bolsas estériles comerciales, estas deben contener el tiosulfato de sodio.

Durante el muestreo se debe utilizar guantes y cubrebocas.

8.1 Muestreo en cuerpos receptores

Siempre que sea posible, llenar el frasco o bolsa hasta 2/3 partes de su capacidad, una cantidad menor sería insuficiente, si fuera mayor, disminuiría el espacio de aire disponible necesario para homogeneizar la muestra.

Es importante que todas las muestras se identifiquen con los datos completos en su etiqueta.

El frasco o bolsa donde se colecta la muestra no se debe destapar sino hasta el momento en el que se efectúe el muestreo, evitar que el cuello del frasco se ponga en contacto con los dedos o cualquier otro material contaminante.

8.2 El muestreo de agua superficial es el siguiente:

8.2.1 Introducir el frasco o bolsa estéril aproximadamente 30 cm bajo la superficie del agua.

8.2.2 Destapar el frasco o bolsa dentro del agua. La boca del envase o bolsa debe quedar en sentido contrario al flujo de la corriente. Si no existe corriente, como en los embalses, mover el frasco o bolsa de forma horizontal en sentido contrario a la boca del envase o bolsa para crear una corriente.

8.2.3 Una vez que la muestra ocupe el volumen correspondiente tapar el frasco o bolsa sin sacar del agua. Cerrar correctamente maniobrando en el exterior. La toma de muestra será en un solo paso.

8.3 Para tomar muestras profundas en lagos o embalses; usar aparatos especiales que permitan destapar y tapar mecánicamente el frasco debajo de la superficie.

8.4 Muestreo en pozos

8.4.1 Si el pozo está provisto de bomba de mano, bombear durante 5 minutos para que el agua fluya libremente antes de tomar la muestra.

8.4.2 Si el pozo está dotado de bomba mecánica, tomar la muestra en una llave previamente sanitizada de la descarga dejando que fluya el agua libremente durante 5 minutos antes de tomar la muestra.

8.4.3 Si no se cuenta con equipo de bombeo, tomar la muestra directamente del pozo por medio de un frasco estéril o con algún otro dispositivo adecuado previamente sanitizado.

8.5 Muestreo en grifos

8.5.1. Para la toma de muestra de un grifo, sanitizar y abrir completamente dejando que el agua fluya de 2 a 3 minutos o el tiempo suficiente para permitir la purga de la línea. Controlar el flujo de la llave para que se pueda llenar el frasco o bolsa sin salpicaduras.

8.6 Una vez recolectada la muestra, transportar al laboratorio (véase 5.2)

9 PROCEDIMIENTO

Se deben considerar todas las actividades previas de Aseguramiento de Calidad en microbiología para la preparación de medios y materiales, sus controles correspondientes y la documentación requerida para demostrar las actividades.

Incluir de forma paralela controles positivos y negativos con cepas control, cada laboratorio establecerá la continuidad de acuerdo a su sistema de control de calidad.

Para coliformes totales el testigo positivo será *Escherichia coli* y testigo negativo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* u otro organismo que sea gram positivo que no fermente la lactosa.

Para coliformes fecales y *E. coli* testigo positivo *Escherichia coli* y testigo negativo *Enterobacter aerogenes*.

9.1 Prueba Presuntiva. Preparación de la muestra e inoculación del medio Antes del examen, mezclar la muestra agitándola vigorosamente para lograr una distribución uniforme de los microorganismos dependiendo de la naturaleza del agua y el contenido bacteriano esperado, hacer las diluciones necesarias en esta etapa.

Para preparar la muestra, realizar diluciones e inocular alícuotas en el medio presuntivo. Para alícuotas superiores o iguales a 10 mL, usar tubos conteniendo medio de cultivo de doble concentración.

En caso de que la densidad bacteriana se considere alta, realizar diluciones empleando el diluyente (véase A.1.3) e inocular alícuotas en el medio presuntivo.

Utilizar series que constan de por lo menos 3 diluciones: 10 mL, 1,0 mL y 0,1 mL de muestra o bien los volúmenes de muestra establecidos en las Tablas del capítulo 12 conforme a la expresión de resultados que se requieran; cada serie debe contar con 3 o 5 tubos, a menos que se apliquen las tablas 12.3, 12.4 y 12.5

9.2 Incubación de los tubos

Incubar los tubos inoculados de 24 h a 48 h \pm 3 h a 35 °C \pm 0,5 °C.

9.3 Revisión de los tubos en cultivo presuntivo

Examinar los tubos de cultivo a las 24 h de incubación y registrar como reacción positiva aquellos que muestren turbidez y formación de gas en el interior del tubo invertido (tubo de Durham). Continuar la incubación por 24 h \pm 3 h en aquellos tubos que no presenten estos cambios y examinar nuevamente.

9.4 Pruebas confirmativas

La formación de gas y turbidez son resultados presuntivos de coliformes y es necesario realizar pruebas confirmativas, resembrar cada uno de los tubos con reacción positiva a tubos con caldos para prueba confirmativas según sea la determinación para coliformes totales, coliformes fecales termotolerantes y/o *E. coli*.

9.4.1 Organismos coliformes totales

Para confirmar la presencia de organismos coliformes, incubar los tubos con caldo lactosa bilis verde brillante resembrados a 35 °C \pm 0,5 °C y examinar la producción de gas en un periodo de 24 h a 48 h \pm 3 h.

9.4.2 Organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *E. coli*.

Para confirmar la presencia de organismos coliformes fecales (termotolerantes), incubar los tubos con caldo EC o con caldo lactosa bilis verde brillante resembrados (véase 9.4.1) a una temperatura de 44,5 °C \pm 0,2 °C por 24 h \pm 2 h y examinar la producción de gas.

Para confirmar la presencia de *E. coli*, incubar los tubos de agua triptona o agua peptonada resembrados, a $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ por $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Después del periodo de incubación adicionar de 0,2 mL a 0,3 mL de reactivo de Kovac o su equivalente, a todos los tubos resembrados; el desarrollo de una coloración roja en la parte superior del tubo después de una agitación suave, denota la producción de indol, característica de la presencia de *E. coli*, para enumerar el NMP/100 mL de *E. coli* se toma en cuenta la serie de tubos utilizada para expresión de resultados (véase capítulos 10 y 12).

NOTA 1: El uso de caldo lauril triptosa manitol con triptofano permite observar gas y producción de indol.

NOTA 2: La detección de *E. coli* es considerada como evidencia satisfactoria de contaminación fecal.

9.4.3 Prueba de oxidasa (prueba confirmativa opcional para coliformes totales)

Algunas bacterias que se encuentran en el agua pueden conformar la definición de organismos coliformes en muchos aspectos, pero son capaces de producir gas a partir de lactosa solo a temperaturas abajo de 37 °C . Por consecuencia dan resultados negativos en las pruebas confirmativas de rutina para organismos coliformes, y su presencia en agua no es usualmente considerada como significativa. Las especies del género *Aeromonas spp*, que están presentes en el agua de manera natural, interfieren con la determinación sólo a temperatura de 37 °C o menor, se requiere la prueba confirmativa de la oxidasa sólo cuando se están determinando coliformes totales.

Llevar a cabo la prueba de la oxidasa con subcultivos puros de organismos fermentadores de lactosa desarrollados en medio de agar nutritivo, de la siguiente manera:

- Coloque dos o tres gotas de reactivo de oxidasa preparado recientemente en un papel filtro colocado sobre una caja Petri;
- Con una varilla de vidrio, palillo de madera o asa metálica de platino (no de nicromo) de punta redondeada, dispersar una pequeña porción de la colonia sobre el papel filtro con reactivo de oxidasa.
- Considere la aparición de un color azul-morado profundo en un lapso de 10 s como una reacción positiva y como reacción negativa se toma como la ausencia de aparición de color.

NOTA 3 Cada vez que se utilice el reactivo de oxidasa, comprobar su efectividad realizando pruebas control con cultivos de organismos que dan reacción positiva (*Pseudomonasaeruginosa*) y una reacción negativa (*E. coli*).

10 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Con el número de tubos de las pruebas confirmativas que hayan dado reacciones positivas, calcule el número más probable de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *E. coli* en 100 mL de muestra, refiriéndose a las tablas estadísticas del NMP (véase capítulo 12).

En caso de que en la prueba presuntiva no muestre turbidez y producción de gas reportar el valor mínimo expresado en tablas correspondiente al número de tubos empleados.

Cuando se utilicen diluciones diferentes a las establecidas en las tablas, se aplicará la siguiente fórmula:

$$NMP/100 \text{ mL} = \frac{10}{V} \times F (NMP/100 \text{ mL})$$

Dónde:

F= Valor de tablas NMP /mL, este se obtendrá de la combinación de tubos positivos y negativos donde se tengan todos los tubos positivos en una misma dilución y las 2 diluciones posteriores a esa combinación.

V= volumen mayor de muestra

10= factor de dilución

Cuando la combinación de resultados obtenidos no se encuentre en tablas se aplicará la siguiente fórmula:

$$NMP/100mL = \frac{N \circ . \text{ de Tubos Positivos} \times 100}{\sqrt{mL \text{ de muestra en tubos negativos} \times mL \text{ de muestra en todos los tubos}}}$$

11 INFORMACIÓN REQUERIDA DE LA PRUEBA

Se debe contar con la siguiente información:

- Todos los detalles necesarios para la identificación de la muestra;
- Los resultados expresados de acuerdo al capítulo 9;
- Cualquier otra información relevante al método.

Manejo de remanentes derivados del análisis, es responsabilidad del laboratorio, tener la documentación requerida así como registros de lo referente al tratamiento para su disposición final.

12 TABLAS DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

Tablas del NMP para la estimación de la densidad bacteriana de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *E. coli*.

TABLA 12.1.- Valores de NMP por cada 100 mL de muestra y 95 % de límite de confianza (para diversas combinaciones de resultados positivos cuando se utilizan tres alícuotas de muestra de 10 mL, tres de 1 mL y tres de 0,1 mL).

Número de tubos que dieron reacción positiva			NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95 %	
3 de 10 mL	3 de 1 mL	3 de 0,1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	<3	----	-----
0	0	1	3	< 1	9
0	1	0	3	< 1	13
1	0	0	4	< 1	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44

Tabla 12.1(concluye)

2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	≥2400	-----	-----

TABLA 12.2.- Valores de NMP por cada 100 mL de muestra y 95 % de límite de confianza (cuando se utilizan cinco alícuotas de muestra de 10 mL, cinco de 1 mL y cinco de 0,1 mL).

Número de tubos que dieron reacción positiva			NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95 %	
5 de 10 mL	5 de 1 mL	5 de 0,1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	< 2	< 1	7
0	1	0	2	< 1	7
0	2	0	4	< 1	11
1	0	0	2	< 1	7
1	0	1	4	< 1	11
1	1	0	4	< 1	11
1	1	1	6	< 1	15
1	2	0	6	< 1	15
2	0	0	5	< 1	13
2	0	1	7	1	17
2	1	0	7	1	17



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

NMX-AA-042-SCFI-2015
13/24

Tabla 12.2(continúa)

Número de tubos que dieron reacción positiva			NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95 %	
5 de 10 mL	5 de 1 mL	5 de 0,1 mL		Inferior	Superior
2	1	1	9	2	21
2	2	0	9	2	21
2	3	0	12	3	28
3	0	0	8	1	19
3	0	1	11	2	25
3	1	0	11	2	25
3	1	1	14	4	34
3	2	0	14	4	34
3	2	1	17	5	46
3	3	0	17	5	46
4	0	0	13	3	31
4	0	1	17	5	46
4	1	0	17	5	46
4	1	1	21	7	63
4	1	2	26	9	78
4	2	0	22	7	67
4	2	1	26	9	78
4	3	0	27	9	80
4	3	1	33	11	93
4	4	0	34	12	93
5	0	0	23	7	70
5	0	1	31	11	89
5	0	2	43	15	110
5	1	0	33	11	93
5	1	1	46	16	120
5	1	2	63	21	150
5	2	0	49	17	130
5	2	1	70	23	170
5	2	2	94	28	220
5	3	0	79	25	190

Tabla 12.2(concluye)

Número de tubos que dieron reacción positiva			NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95 %	
5 de 10 mL	5 de 1 mL	5 de 0,1 mL		Inferior	Superior
5	3	1	110	31	250
5	3	2	140	37	340
5	3	3	180	44	500
5	4	0	130	35	300
5	4	1	170	43	490
5	4	2	220	57	700
5	4	3	280	90	850
5	4	4	350	120	1 000
5	5	0	240	68	750
5	5	1	350	120	1 000
5	5	2	540	180	1 400
5	5	3	920	300	3200
5	5	4	1600	640	5800
5	5	5	≥ 1800	-	-

TABLA 12.3.- Valores de NMP por cada 100 mL de muestra y 95 % de límite de confianza (cuando se utiliza una alícuota de ensayo de 50 mL y cinco de 10 mL).

Número de tubos que dieron reacción positiva		NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95 %	
1 de 50 mL	5 de 10 mL		Inferior	Superior
0	0	< 1		
0	1	1	< 1	4
0	2	2	< 1	6
0	3	4	< 1	11
0	4	5	1	13
0	5	7	2	17
1	0	2	< 1	6
1	1	3	< 1	9
1	2	6	1	15
1	3	9	2	21

Tabla 12.3(concluye)

1	4	16	4	40
1	5	> 18		

TABLA 12.4.-Valores de NMP por cada 100 mL de muestra y 95 % de límite de confianza (cuando se utilizan cinco alícuotas de muestra de 100 mL, una de 10 mL y una de 1 mL).

Número de tubos que dieron reacción positiva			NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95 %	
5 de 100 mL	1 de 10 mL	1 de 1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	< 1	< 1	1
0	1	0	< 1	< 1	1
1	0	0	< 1	< 1	1
1	1	0	< 1	< 1	2
2 ^a			< 1	< 1	2
2	0	0	< 1	< 1	2
2	1	0	< 1	< 1	2
3 ^a			< 1	< 1	3
3	0	0	< 1	< 1	3
3	0	1	1	< 1	3
3	1	0	1	< 1	4
4 ^a			2	< 1	5
4	0	0	2	< 1	5
4	0	1	2	< 1	6
4	0	0	2	< 1	6
5	0	0	4	2	36
5	0	1	10	3	54
5	1	0	20	10	380

^a Estos resultados se expresan para el caso en el que se utiliza un sólo nivel con 5 tubos.

TABLA 12.5.- Valores de NMP por cada 100 mL de muestra y 95 % de límite de confianza (cuando se utiliza una alícuota de muestra de 50 mL, cinco de 10 mL y cinco de 1 mL).

Número de tubos que dieron reacción positiva			NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95 %	
1 de 50 mL	5 de 10 mL	5 de 1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	< 1		
0	0	1	1	< 1	4
0	0	2	2	< 1	6
0	1	0	1	< 1	4
0	1	1	2	< 1	6
0	1	2	3	< 1	8
0	2	0	2	< 1	6
0	2	1	3	< 1	8
0	2	2	4	< 1	11
0	3	0	3	< 1	8
0	3	1	5	< 1	13
0	4	0	5	< 1	13
1	0	0	1	< 1	4
1	0	1	3	< 1	8
1	0	2	4	< 1	11
1	0	3	6	< 1	15
1	1	0	3	< 1	8
1	1	1	5	< 1	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	< 1	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19

TABLA 12.5(concluye)

Número de tubos que dieron reacción positiva			NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95 %	
1 de 50 mL	5 de 10 mL	5 de 1 mL		Inferior	Superior
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	69
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	101
1	4	5	43	15	117
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	101
1	5	2	54	18	138
1	5	3	92	27	217
1	5	4	161	3	450
1	5	5	> 180	-	-

13 MANEJO DE RESIDUOS

Cada laboratorio debe contemplar el control, manejo y disposición final de los residuos generados durante el método.

APÉNDICE NORMATIVO A

MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y DILUYENTES

A.1 Medios de cultivo

A.1.1 Medios Presuntivos

A.1.1.1 Caldo Lactosa

En caso de utilizar medio de marca comercial, para la preparación de medio simple la concentración es directa y para la preparación de doble concentración es duplicando la cantidad de medio a diluir en el mismo volumen de agua.

Medio de doble concentración

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Extracto de carne	6 g
Agua destilada	1 000 mL

Disolver los ingredientes en agua y calentar. Ajuste el pH si es necesario para que después de la esterilización se encuentre entre 6,7 a 7,1.

Medio de concentración simple

Preparar el medio de concentración simple diluyendo el medio de doble concentración con un volumen igual de agua destilada o preparar por separado utilizando la mitad de las concentraciones de los ingredientes.

Distribuir el medio de concentración simple en volúmenes 10 mL y el medio de doble concentración en volúmenes de 10 mL, 50 mL ó 100 mL según se requiera. Cada tubo o botella utilizada debe contener un tubo Durham invertido. Esterilizar en autoclave de 120 °C a 122 °C o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min.

A.1.1.2 Caldo lauril sulfato

Medio de doble concentración

Triptosa	40 g
Lactosa	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Fosfato hidrógeno dipotásico	5,5 g
Fosfato dihidrógeno de potasio	5,5 g
Lauril sulfato de sodio, alta pureza	0,2 g
Agua destilada	1 000 mL

Agregar la triptosa, el cloruro de sodio, lactosa y fosfatos al agua y calentar para disolver. Añadir el lauril sulfato de sodio y mezclar suavemente para prevenir la formación de espuma. Ajustar el pH de 6,6 a 7,0. Preparar medio de concentración simple siguiendo las instrucciones del proveedor o fabricante.

Distribuir el medio de concentración simple en volúmenes 10 mL y el medio de doble concentración en volúmenes de 10 mL, 50 mL ó 100 mL según se requiera. Cada tubo o botella utilizada debe contener un tubo Durham invertido. Esterilizar en autoclave de 120 °C a 122 °C o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min

A.1.1.3 Caldo Mc Conkey

Medio doble concentración:

Sales biliares	10 g
Peptona	40 g
Lactosa	20 g
Cloruro de sodio(NaCl)	10 g
Purpura de bromocresol Fraccion(1 % v/v en disolución etanólica)	2 mL
Agua destilada llevar a	1 000 mL

Disolver, calentando la peptona, el cloruro de sodio y las sales biliares en agua y almacenarlos a 4 °C durante toda la noche. Filtrar mientras esta aun frio añadir la lactosa y disolver. Ajustar a pH 7,4 y añadir el púrpura de bromocresol.

Preparar el medio de simple concentración disolviendo el de doble concentración con un volumen igual de agua o prepararlo usando la mitad de concentración de los ingredientes.

Distribuir el medio de concentración simple en volúmenes 10 mL y el medio de doble concentración en volúmenes de 10 mL, 50 mL ó 100 mL según se requiera. Cada tubo o botella utilizada debe contener un tubo Durham invertido. Esterilizar

en autoclave de 120 °C a 122 °C o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min

A.1.2 Medios Confirmativos

A.1.2.1 Caldo lactosa bilis verde brillante(para detección de producción de gas)

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Bilis deshidratada	20 g
Verde brillante (disolución acuosa 1 % en masa)	13 mL
Agua destilada	1000 mL

Disolver la peptona en 500 mL de agua destilada. Agregar los 20 g de bilis deshidratada en 200 mL de agua destilada. Esta disolución debe tener un pH entre 7,0 a 7,5. Adicionar agua a un volumen aproximado de 975 mL con agua destilada. Agregar la lactosa y ajustar el pH de 7,0 a 7,4. Agregar la disolución verde-brillante y completar a 1000 mL con agua destilada.

Distribuir en tubos con suficiente medio para cubrir el tubo Durham invertido y esterilizar de 120 °C a 122 °C o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min.

A.1.2.2 Medio EC (para producción de gas)

Triposa o Tripticasa	20 g
Lactosa	5 g
Mezcla de sales biliares o sales biliares No. 3	1,5 g
Fosfato monobásico de potasio	4 g
Fosfato dibásico de potasio	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1000 mL

Distribuir en tubos con suficiente medio para cubrir el tubo Durham invertido y esterilizar de 120 °C a 122 °C o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min.

El pH deberá estar entre 6,7 a 7,1 después de la esterilización.

A.1.2.3 Agua de Triptona (para reacción con Indol)

Triptona	20 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1 000 mL

Distribuir en tubos y esterilizar de 120 °C a 122 °C o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min.

A.1.2.4 Prueba de Oxidasa

Reactivo para la prueba de Oxidasa:

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina	0,1 g
Agua destilada	10 mL

Disolver los ingredientes. Este reactivo no es estable y debe prepararse para usarse en pequeñas cantidades cada vez que sea necesario.

En caso de utilizar un reactivo comercial seguir las instrucciones del fabricante.

A.1.2.5 Reactivo de Kovacs para indol.

1,4 dimetilaminobenzaldehido ($C_6H_4[N(CH_3)_2]CHO$)	5,0 g
Alcohol amílico ($CH_3(CH_2)_4OH$) libre de bases orgánicas.	75 mL.
Ácido clorhídrico concentrado (HCl).	85 mL

Preparación:

Disolver el aldehído en el alcohol amílico, añadir el ácido clorhídrico concentrado con precaución. Proteger de la luz y almacenar a $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Se puede ocupar un reactivo equivalente.

A.1.3 Diluyente

Preparación

a) Disolución de fosfato

Disolver 34 g del fosfato monobásico de potasio en 500 mL de agua destilada. Ajustar el pH entre 6,7 - 7,7 con una disolución de hidróxido de sodio (1 mol/L) y completar a 1 000 mL con agua destilada.

b) Disolución de Cloruro de Magnesio

Disolver 38 g de cloruro de magnesio anhidro u 81 g de cloruro de magnesio hexahidratado en 1000 mL de agua destilada.

c) Disolución amortiguadora de fosfatos

Adicionar 1,25 mL de disolución de fosfato y 5,0 mL de disolución de cloruro de magnesio y disolver en 1000 mL de agua destilada. Distribuir en volúmenes convenientes de acuerdo a las diluciones a realizar y esterilizar en autoclave de 120 °C a 122 °C o una presión manométrica de 103 kPa durante 15 min. El pH final debe estar entre 6,9 y 7,1.

A.1.4 Caldo lauril triptosa con triptofano

Ingredientes

Triptosa	20,0 g
Manitol	5,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Fosfato dibásico de potasio (KHPO ₄)	2,75 g
Fosfato monobásico de Potasio (KH ₂ PO ₄)	2,75 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g
L-Triptofano	0,2 g
Agua	1 000 mL

Añadir la triptosa, el cloruro de sodio, el manitol, los fosfatos y el triptófano al agua, calentar para disolver. Añadir el lauril sulfato de sodio y mezclar suavemente para evitar la formación de espuma. Ajustar pH a $6,8 \pm 0,2$ distribuir en tubos que contengan campanas de fermentación invertida y esterilizar durante 10 minutos (en caso de utilizar medios de cultivo comerciales, seguir las instrucciones del fabricante).

14 VIGENCIA

La presente norma mexicana entrará en vigor 120 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia, en el Diario Oficial de la Federación.

15 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no coincide con la Norma Internacional ISO 9308-2: 2012. Waterquality – Enumeration of Escherichiacoli and coliform bacteria - Part 2: Most probable number method, no es posible concordar con el consejo internacional por las siguientes razones:

La variable de respuesta entre ambos métodos es diferente, ya que la norma ISO 9308-2 se basa en determinación de coliformes totales por medio de sustrato cromogénico y la presente norma se basa en la fermentación de lactosa.

16 BIBLIOGRAFÍA

- NOM-008-SCFI-2002 Sistema General de Unidades de Medida. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de noviembre de 2002.
- ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use - Specification and test methods.
- ISO 5667-1:1980 Water quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes. (Norma retirada).
- ISO 5667-3:1985 Water quality — Sampling — Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples. (Norma retirada).
- ISO 6887:1983 Microbiology - General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. (Norma retirada).
- ISO 8199:2005 Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.
- STANDARD METHODS 9221 Water quality. Multiple – tube technique for member of the coliform group.

APÉNDICE INFORMATIVO B

INFORMACIÓN MICROBIOLÓGICA ADICIONAL RELEVANTE PARA LA DETECCIÓN DEL GRUPO DE ORGANISMOS COLIFORMES EN AGUA

Para propósito de análisis de rutina, el grupo de organismos coliformes puede ser descrito generalmente en términos microbiológicos, no taxonómicos, de la siguiente manera:

Los organismos coliformes son Gram-negativos, no esporulados, oxidasa-negativos, bacterias bacilares en forma de bastón, las cuales son capaces de crecimiento aeróbico y anaeróbico facultativo en presencia de sales biliares (o bien otros agentes de superficie activos con similares propiedades inhibitorias del crecimiento).

Son también capaces de fermentar la lactosa (y el manitol) con producción de ácido, gas y aldehído en un lapso de 48 h, cuando son incubadas de $35 \pm 0,5$ °C.

Los organismos coliformes termotolerantes son organismos coliformes que presentan las mismas propiedades fermentativas y bioquímicas cuando se incuban a temperatura de $44,5 \pm 0,2$ °C.

Escherichia coli son organismos coliformes termotolerantes que son capaces de producir indol a partir de triptófano.

E. coli puede ser considerada como *E. coli* cuando da un resultado positivo en la prueba del rojo de metilo y puede descarboxilar el ácido L-glutámico, pero no es capaz de producir acetil metil carbinol, utilizar citrato como única fuente de carbono o crecer en medio de cianuro de potasio (KCN).

México D.F., a

**EL DIRECTOR GENERAL DE NORMAS
ALBERTO ULISES ESTEBAN MARINA**