

Nota: Esta Norma cancela la NOM-AA-42-1981

Nota: Esta Norma fue modificada de Norma Oficial Mexicana a Norma Mexicana, de acuerdo al Decreto publicado en el Diario Oficial de la Federación de fecha 6 de Noviembre de 1992.

## **NORMA MEXICANA NMX-AA-42-1987**

### **CALIDAD DEL AGUA-DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES) Y ESCHERICHIA COLI PRESUNTIVA**

#### **PREFACIO**

En la elaboración de la presente norma participaron las siguientes instituciones:

- SECRETARIA DE DESARROLLO URBANO Y ECOLOGIA.  
Instituto SEDUE.
- SECRETARIA DE SALUD.
- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS.
- SECRETARIA DE MARINA.  
Dirección General de Oceanografía Naval.
- DEPARTAMENTO DEL DISTRITO FEDERAL.  
Dirección General de Reordenación Urbana y Protección Ecológica.  
Laboratorio Central de Control.
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.  
Facultad de Química.
- PETROLEOS MEXICANOS.
- CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DEL HIERRO Y EL ACERO.
- ASOCIACION MEXICANA CONTRA LA CONTAMINACION DEL AGUA Y EL AMBIENTE.
- CELANESE MEXICANA, S.A.
- MERCK MEXICO, S.A.

### **CALIDAD DEL AGUA-DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES), Y Escherichia coli PRESUNTIVA**

#### **0.- INTRODUCCION**

La presencia y extensión de contaminación fecal es un factor importante en la determinación de la calidad de un cuerpo de agua. Las heces contienen una variedad de microorganismos y formas de resistencia de los mismos, involucrando organismos patógenos, los cuales son un riesgo para la salud pública al estar en contacto con el ser humano. El examen de muestras de agua para determinar la presencia de microorganismos del grupo coliforme que habitan normalmente en el intestino humano y de otros animales de sangre caliente, da una indicación sensible de dicho tipo de contaminación.

Dada la limitada capacidad de algunos miembros del grupo de organismos coliformes para sobrevivir en agua; sus números también pueden emplearse para estimar el grado de contaminación fecal.

#### **1.- OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION**

Esta Norma Mexicana establece un método para la detección y enumeración en agua de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y Escherichia coli presuntiva (E. coli) mediante el cultivo en un medio líquido en tubos múltiples y el cálculo de sus números más probables (NMP) en la muestra.

Este método es aplicable para todo tipo de agua, incluyendo aquellos que contienen una cantidad apreciable de materia en suspensión.

La selección de las pruebas usadas en la detección y confirmación del grupo de organismos coliformes, incluyendo *E. coli*, puede verse como parte de una secuencia continua. El grado de confirmación con una muestra en particular depende parcialmente de la naturaleza del agua y parcialmente de las razones para realizar el examen. En la práctica, la detección de *E. coli* presuntiva, como se define en el punto 3.3 de esta norma, da usualmente una indicación satisfactoria de contaminación fecal.

## 2.- REFERENCIAS

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Mexicanas vigentes:

NMX-2-1 Sistema Internacional de Unidades (Si)

NMX-BB-14 Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en laboratorios.

## 3.- DEFINICIONES

Para propósitos de esta Norma Mexicana, se aplican las siguientes definiciones:

3.1 Organismos coliformes.- Organismos capaces de crecimiento aeróbico ya sea a  $308 \pm 1\text{K}$  ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ) ó  $310 \pm 1\text{K}$  ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) en un medio de cultivo líquido lactosado con producción de ácido y gas dentro de un período de 48 h.

3.2 Organismos coliformes fecales (termotolerantes).- Organismos coliformes como se describe en 3.1 que tienen las mismas propiedades fermentativas a  $317 \pm 0.5\text{K}$  ( $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ).

3.3 *Escherichia coli* presuntiva (*E. coli*).- Organismos coliformes termotolerantes como se describe en 3.2 que también producen indol a partir de triptofano a  $317\text{K}$  ( $44^\circ\text{C}$ ).

## 4.- PRINCIPIO

El método se basa en la inoculación de alícuotas de la muestra, diluida o sin diluir, en una serie de tubos de un medio de cultivo líquido conteniendo lactosa.

Los tubos se examinan a las 24 y 48 horas de incubación ya sea a  $308$  ó  $310\text{K}$  ( $35$  ó  $37^\circ\text{C}$ ). Cada uno de los que muestran turbidez con producción de gas se resiembra en un medio confirmativo más selectivo y, cuando se busca *E. coli* presuntiva, en un medio en el que se pueda demostrar la producción de indol.

Se lleva a cabo la incubación de estos medios confirmativos hasta por 48 horas ya sea a  $308$  ó  $310\text{K}$  ( $35$  ó  $37^\circ\text{C}$ ) para la detección de organismos coliformes y a  $317\text{K}$  ( $44^\circ\text{C}$ ) para organismos coliformes termotolerantes y *E. coli*.

Mediante tablas estadísticas, se lleva a cabo el cálculo del número más probable (NMP) de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *E. coli* que pueda estar presente en  $100\text{ cm}^3$  de muestra, a partir de los números de los tubos que dan resultados confirmativos positivos.

## 5.- APARATOS Y EQUIPO

Aparte de los equipos que se suministran estériles, el material de vidrio y el resto del equipo deben esterilizarse.

5.1 Incubadora capaz de mantener una temperatura de  $308 \pm 1\text{K}$  ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ) ó  $310 \pm 1\text{K}$  ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y  $317 \pm 0.5\text{K}$  ( $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ).

5.2 Estufa capaz de mantener una temperatura de 453 a 473K (180 a 200°C).

5.3 Autoclave u olla de presión con manómetro.

5.4 Potenciómetro.

5.5 Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g.

5.6 Pipetas serológicas.

5.7 Pipeteros de aluminio o acero inoxidable; se pueden sustituir por papel aluminio o papel Kraft.

5.8 Tubos de ensaye de cristal refractario de 15 mm x 150 mm, con tapón de baquelita, aluminio o algodón.

5.9 Frascos muestreadores, de vidrio resistente o cristal refractario de  $125\text{ cm}^3$ , con tapón de cristal esmerilado.

5.10 Tubos de fermentación (Durham).

5.11 Asas de inoculación.

5.12 Material común de laboratorio.

## 6.- REACTIVOS

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa. Cuando se especifique el uso de agua se debe entender agua destilada in vitro o agua desionizada libre de sustancias que pueden inhibir el crecimiento bacteriano en las condiciones de la prueba.

Para la preparación de los reactivos, las condiciones de esterilización deben ser 394K ( $121^\circ\text{C}$ ) y 0.0988066 MPa ( $1\text{ kg/cm}^2$ ) de presión manométrica durante 15 minutos. Los tubos de fermentación (Durham) no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

En caso de utilizar medios deshidratados, seguir las recomendaciones del fabricante para su preparación.

6.1 Utilizar uno de los siguientes medios de cultivo:

6.1.1 Caldo lauril triptosa (CLT).

Medio de doble concentración:

Triptosa	40.0 g	
Lactosa	10.0 g	
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0 g	
Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	5.5 g	
Fosfato dibásico de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	5.5 g	
Lauril sulfato de sodio	0.2 g	
Agua para llevar a	1000 $\text{cm}^3$	

Añadir la triptosa y el cloruro de sodio al agua, calentar para disolver y añadir el lauril sulfato de sodio. Disolver el resto de los componentes por separado y agregarlos a los anteriores mezclando suavemente para evitar la formación de espuma. Ajustar a pH 6.8. Preparar medio de simple concentración diluyendo el medio de doble concentración con un volumen igual de agua.

Distribuir el medio de simple concentración en volúmenes de 5 cm<sup>3</sup> y el medio de doble concentración en volúmenes de 10 y 50 cm<sup>3</sup>. Cada tubo o matraz deben contener un tubo de fermentación invertido (Durham). Colocar en autoclave a 388K (115°C) durante 10 min.

#### 6.1.2 Caldo McConkey.

Medio de doble concentración:

Sales biliares	10.0 g
Peptona	40.0 g
Lactosa	20.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0 g
Púrpura de bromocresol (1% v/v en solución etanólica)	2 cm <sup>3</sup>
Agua para llevar a	1000 cm <sup>3</sup>

Disolver, calentando, la peptona, el cloruro de sodio y las sales biliares en agua y almacenarlo a 277K (4°C) durante toda la noche. Filtrar mientras está aún frío, añadir la lactosa y disolver. Ajustar a pH 7.4 y añadir el purpura 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 la concentración de los ingredientes.

Distribuir el medio de simple concentración en volúmenes de 5 cm<sup>3</sup> y el de doble concentración en volúmenes de 10 y 50 cm<sup>3</sup> en tubos o matraces conteniendo un tubo de fermentación invertido ((Durham). Colocar en autoclave a 388K (115°C) durante 10 min.

#### 6.1.3 Caldo lactosa.

Medio de doble concentración:

Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
Extracto de carne	6.0 g
Agua para llevar a	1000 cm <sup>3</sup>

Disolver los componentes en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH de modo que al terminar la esterilización sea de 6.7. Preparar el medio de simple concentración diluyendo el medio de doble concentración con un volumen igual de agua.

Distribuir el medio de simple concentración en volúmenes de 5 cm<sup>3</sup> y el de doble concentración en volúmenes de 10 y 50 cm<sup>3</sup>. Cada tubo o matraz debe contener un tubo de fermentación invertido (Durham). Esterilizar en autoclave a 394 ± 1K (121 ± 1°C) durante 15 min.

Estos tres medios son de uso común en numerosos países. La selectividad del McConkey y del CLT dependen respectivamente de la presencia de sales biliares y del agente de superficie activo, el laurilsulfato. El caldo lactosa no es un medio selectivo.

6.2 Utilizar uno o más de los siguientes medios confirmativos:

## 6.2.1 Medios para la producción de gas:

## 6.2.1.1 Caldo bilis lactosa verde brillante:

Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
Lilis de buey (deshidratada)	20.0 g
Verde brillante (0.1% m/m en solución acuosa)	13 cm <sup>3</sup>
Agua para llevar a	1000 cm <sup>3</sup>

Disolver la peptona en 500 cm<sup>3</sup> de agua. Añadir los 20 g de bilis de buey deshidratada disueltos en 200 cm<sup>3</sup> de agua; la solución debe tener un pH entre 7.0 y 7.5. Disolver con agua hasta un volumen aproximado de 975 cm<sup>3</sup>.

Añadir la lactosa y ajustar el pH a 7.4. Añadir la solución de verde brillante y aforar a 1000 cm<sup>3</sup> con agua.

Distribuir volúmenes de 5 cm<sup>3</sup> en tubos de ensaye conteniendo tubos de fermentación invertidos (Durham) y colocar en autoclave a 388K (115°C) durante 10 min.

NOTA 1.- Este medio no da resultados reproducibles en todos los casos y se recomienda comprobar sus propiedades inhibitorias antes de usarlo.

## 6.2.1.2 Medio EC:

Triptosa o tripticasa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4.0 g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agua para llevar a	1000 cm <sup>3</sup>

Disolver los componentes por separado y agregarlos agitando suavemente. El pH debe ser de 6.9 después de la esterilización. Antes de esterilizar, distribuir en tubos de fermentación con suficiente medio para que el tubo invertido quede cubierto cuando menos parcialmente después de la esterilización.

Como medio confirmativo para coliformes totales, el más generalizado es el caldo bilis lactosa verde brillante (BLVE). Para confirmar la presencia de coliformes fecales se utiliza tanto el BLVE como el caldo EC.

## 6.2.2 Medio para la producción de indol:

## 6.2.2.1 Agua de triptona:

Triptona	20.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agua para llevar a	1000 cm <sup>3</sup>

Disolver los componentes en agua y ajustar a pH. 7.5 distribuir en volúmenes de 5 cm<sup>3</sup> y colocar en autoclave a 388K (115°C) durante 10 min.

NOTA 2.- La adición de 0.1% (m/m) de L ó DL-triptofano puede mejorar el funcionamiento del medio.

## 6.3 Reactivo de Kovacs para indol:

1,4 dimetilaminobenzaldehído (C<sub>6</sub> H<sub>4</sub> [N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] CHO) 5.0 g

Alcohol amílico ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}$ ) libre de bases orgánicas 75  $\text{cm}^3$   
Acido Clorhídrico concentrado (HCl) 25  $\text{cm}^3$

Disolver el aldehído en el alcohol. Añadir el ácido concentrado con cuidado. Proteger de la luz y almacenar a 277K (40°C).

NOTA 3.- El reactivo debe tener una coloración entre amarillo claro y café claro; algunas muestras de alcohol amílico son insatisfactorias y dan una coloración oscura con el aldehído.

#### 6.4 Reactivo de oxidasa para la prueba de oxidasa:

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina 0.1 g  
Agua 10  $\text{cm}^3$

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

#### 6.5 Diluyentes:

##### 6.5.1 Diluyente de peptona (0.1%)

Peptona 1.0 g  
Agua para llevar a 1000  $\text{cm}^3$

Disolver la peptona en aproximadamente 950  $\text{cm}^3$  de agua. Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1 mol/L o ácido clorhídrico 1 mol/L de modo que después de la esterilización sea de  $7.0 \pm 0.1$ . Aforar a 1000  $\text{cm}^3$  con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a  $394 \pm 1\text{K}$  ( $121 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 15 min.

##### 6.5.2 Solución salina de peptona:

Peptona 1.0 g  
Cloruro de sodio (NaCl) 8.5 g  
Agua para llevar a 1000  $\text{cm}^3$

Disolver los componentes hirviéndolos en aproximadamente 950  $\text{cm}^3$  de agua. Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1 mol/L o ácido clorhídrico 1 mol/L de modo que después de la esterilización sea de  $7.0 \pm 0.1$ . Llevar a 1000  $\text{cm}^3$  con agua, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a  $394 \pm 1\text{K}$  ( $121 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 15 min.

##### 6.5.3 Solución de ringer:

Cloruro de sodio (NaCl) 2.25 g  
Cloruro de potasio (KCl) 0.105 g  
Cloruro de calcio anhidro ( $\text{CaCl}_2$ ) 0.12 g  
Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_2$ ) 0.05 g  
Agua para llevar a 1000  $\text{cm}^3$

Disolver los componentes y dividirlos en volúmenes convenientes.  
Esterilizar en autoclave a 394K (121°C) durante 15 min.

##### 6.5.4 Solución amortiguadora de fosfato:

Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_2$ ) 42.5 mg  
Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 190.0 mg  
Agua para llevar a 1000  $\text{cm}^3$

#### 6.5.4.1 Solución de fosfato.

Disolver 34 g de fosfato en 500 cm<sup>3</sup> de agua. Ajustar a pH  $7.2 \pm 0.5$  con solución de hidróxido de sodio 1 mol/L y aforar a 1000 cm<sup>3</sup> con agua.

#### 6.5.4.2 Solución de cloruro de magnesio.

Disolver 38 g de cloruro de magnesio en 1000 cm<sup>3</sup> de agua.

Para usarla, añadir 1.25 cm<sup>3</sup> de solución de fosfato (6.5.4.1) y 5.0 cm<sup>3</sup> de solución de cloruro de magnesio (6.5.4.2) a 1000 cm<sup>3</sup> de agua. Distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a  $394 \pm 1K$  ( $121 \pm 1^{\circ}C$ ) durante 15 min.

## 7.- MUESTREO

El procedimiento para la recolección de las muestras de agua para el análisis bacteriológico, depende del tipo de agua que se desee muestrear.

Las muestras para el análisis bacteriológico, se deben tomar en frascos muestreadores que se hayan lavado con extremo cuidado y esterilizado. En su interior colocar, previo a la esterilización, 0.1 cm<sup>3</sup> de solución de tiosulfato de sodio al 1% con el propósito de inhibir la acción del cloro que pueda contener la muestra, cubriendo además el tapón del frasco hasta el cuello con papel aluminio.

### 7.1 Muestreo en cuerpos receptores.

7.1.1 Siempre que sea posible, llenar el frasco a 2/3 partes de su capacidad; una cantidad menor será insuficiente, si fuera mayor, disminuiría el espacio de aire disponible, necesario para homogeneizar la muestra. Las muestras deben ser representativas del agua en estudio y asimismo no deben contaminarse en forma alguna.

7.1.2 El frasco donde se colecta la muestra no se debe destapar sino hasta el momento en el que se efectúe el muestreo.

Al muestrear, se debe evitar que el cuello del frasco se ponga en contacto con los dedos o cualquier otro material contaminante.

7.1.3 El examen de la muestra colectada debe realizarse lo más pronto posible, para evitar proliferación o muerte de las bacterias.

Cuando el examen se practica dos horas después de tomar la muestra, los resultados empiezan a ser inciertos.

7.1.4 El volumen de muestra suficiente para efectuar el análisis bacteriológico, de preferencia debe ser de aproximadamente 100 cm<sup>3</sup>. Es importante que todas las muestras estén acompañadas de datos completos y exactos de identificación y descripción.

7.1.5 El mecanismo de muestreo superficial es el siguiente:

7.1.5.1 Quitar el papel aluminio del cuello del frasco; introducir el frasco aproximadamente 30 cm<sup>3</sup> bajo la superficie del agua.

7.1.5.2 Destapar el frasco dentro del agua. La boca del envase debe quedar en sentido contrario al flujo de la corriente. Si no existe corriente, como en los embalses, crearla empujando el frasco horizontalmente, en dirección opuesta al movimiento de la mano.

7.1.5.3 Una vez que la muestra ocupe el volumen correspondiente del frasco (2/3 partes); tapar sin sacarlo del agua teniendo cuidado de que el papel aluminio vuelva a cubrir el cuello de la botella.

7.1.5.4 Si no es posible la recolección de muestras en las condiciones antes enunciadas, fijar un lastre al frasco, al que se hace descender en el agua.

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

## 7.2 Muéstreo en pozos y grifos.

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

7.2.2 Si el pozo está dotado de bomba mecánica, tomar la muestra en una llave previamente flameada de la descarga, dejando que fluya el agua libremente 5 min antes de tomar la muestra.

7.2.3 Al efectuar este muestreo, se debe evitar que el agua escurra fuera del frasco; además, se deben flamear los bordes del frasco y tapón durante el tiempo que dura el muestreo. Esto se hace con objeto de mantener al máximo las condiciones de asepsia.

7.2.4 Si no se cuenta con equipo de bombeo, tomar la muestra directamente del pozo por medio de un frasco estéril con lastre. En este caso se debe evitar la contaminación de la muestra por las natas superficiales.

7.2.5 Si se trata de tomar una muestra de un grifo del sistema de servicio, flamear el grifo y abrirlo completamente, dejando que el agua fluya por 2 ó 3 min. o el tiempo suficiente para permitir la purga de la línea.

7.2.6 En el momento del muestreo, restringir el flujo de la llave para que se pueda llenar el frasco sin salpicaduras.

7.2.7 Las condiciones de asepsia deben ser las mismas que las enunciadas en el punto 7.2.3.

## 8.- PRESERVACION Y ALMACENAMIENTO

El análisis bacteriológico de la muestra debe practicarse inmediatamente después de su recolección. Es por ello que se recomienda que de no efectuarse así el análisis, se inicie dentro de las dos horas próximas a la recolección de la muestra y en ningún caso, este lapso debe exceder de 24 horas para agua potable y de 6 horas para otros tipos de agua para que sea válido el resultado del análisis. Durante el período que transcurre del muestreo al análisis, se debe conservar la muestra a 277K (4°C), con objeto de inhibir la actividad bacteriana para no obtener resultados falsos o dudosos.

## 9.- PROCEDIMIENTO

### 9.1 Pruebas presuntivas.

#### 9.1.1 Preparación de la muestra e inoculación del medio.

Antes del examen, mezclar perfectamente la muestra agitándola vigorosamente para lograr una distribución uniforme de los microorganismos y, dependiendo de la naturaleza del agua y el contenido bacteriano esperado, hacer todas las diluciones necesarias en esta etapa.



Utilizar series que constan de por lo menos tres diluciones:  $10.0 \text{ cm}^3$ ,  $1.0 \text{ cm}^3$ ,  $0.1 \text{ cm}^3$  y  $0.01 \text{ cm}^3$ . Por cada dilución debe haber 3 ó 5 tubos.

Para diluciones a 10 veces, poner 90 ó  $9 \text{ cm}^3$  del diluyente en matraces o tubos de dilución esterilizados. Alternativamente, usar volúmenes de diluyente preesterilizado en botellas con tapón de rosca. Hacer una ó más diluciones a 10 veces transfiriendo un volumen de la muestra de agua a 9 volúmenes de diluyente. Repetir estos pasos cuantas veces sea necesario.

Preparar suficiente cantidad de cada dilución para todas las pruebas que se vayan a llevar a cabo con la muestra. Para diluciones diferentes a 10 veces ajustar el volumen de diluyente a la porción de prueba. Inocular los tubos conteniendo medios de aislamiento de doble concentración con porciones de prueba de un volumen mínimo de  $5 \text{ cm}^3$ .

#### 9.1.2 Incubación de los tubos.

Incubar los tubos inoculados ya sea a  $308 \pm 1\text{K}$  ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ) o  $310 \pm 1\text{K}$  ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 48 horas.

#### 9.1.3 Examen de los tubos.

Examinar los cultivos de los tubos después de un período de incubación de 18 a 24 horas y considerar como resultados positivos aquellos que muestren turbidez debido al crecimiento bacteriano y formación de gas en los tubos internos invertidos (Durham) junto con producción de ácido si el medio de aislamiento contiene un indicador de pH. Reincubar aquellos tubos que no muestran alguno o todos estos cambios y examinarlos nuevamente para detectar reacciones positivas a las 48 horas.

### 9.2 Pruebas confirmativas.

#### 9.2.1 Inoculación del medio.

Resembrar a partir de cada tubo de medio de aislamiento que muestre un resultado positivo en uno o más tubos de medio confirmativo (6.2) para detectar la producción de gas e indol.

NOTA 4.- Si se usa el medio más inhibitorio de caldo lactosa para aislar, resembrar en alguno de los dos medios confirmativos más selectivos, Caldo Bilis Lactosa Verde Brillante o Caldo EC para efectuar la confirmación.

#### 9.2.2 Incubación y examen.

Para confirmar la presencia de organismos coliformes, incubar un tubo de 9.2.1 de Caldo Bilis Lactosa Verde Brillante o Caldo EC a  $310\text{K}$  ( $37^\circ\text{C}$ ) y examinarlo para ver si hay producción de gas dentro de un período de 48 horas.

Para confirmar la presencia de organismos coliformes termotolerantes, incubar otro tubo de 9.2.1. de Caldo Bilis Lactosa Verde Brillante o Caldo EC a  $317\text{K}$  ( $44^\circ\text{C}$ ) durante 24 horas para ver si hay producción de gas.

Para confirmar la presencia de *E. coli* presuntiva, incubar un tubo de 9.2.1 de agua de triptona para detectar la formación de indol  $317\text{K}$  ( $44^\circ\text{C}$ ) durante 24 horas. Después añadir de 0.2 a  $0.3 \text{ cm}^3$  de reactivo de Kovacs (6.3) al tubo de agua de triptona; el desarrollo de un anillo de color rojo después de agitar suavemente denota la presencia de indol.

NOTA 5.- La detección de *E. coli* presuntiva se considera una evidencia satisfactoria de contaminación fecal. Sin embargo, pueden efectuarse mayores pruebas para la confirmación de *E. coli* si se considera necesario.

#### 9.3 Prueba de oxidasa.

Algunas bacterias existentes en el agua pueden conformarse a la definición de organismos coliformes en muchos aspectos, pero son capaces de producir gas a partir de lactosa solamente a temperaturas inferiores a 310K (37°C).

Por consiguiente, dan resultados negativos en las pruebas confirmativas estándar para organismos coliformes y su presencia en agua usualmente no se considera significativa. Las especies de Aeromonas, que se encuentran naturalmente en el agua, tienen una temperatura óptima de crecimiento en el rango 303 a 308K (30 a 35°C), pero a pesar de ello son capaces de producir ácido y gas a partir de lactosa a 310K (37°C). Tienen poco significado para efectos sanitarios y se distinguen del grupo de los coliformes por una reacción de oxidasa positiva.

9.3.1 Llevar a cabo la prueba con subcultivos puros de los organismos fermentadores de lactosa, crecidos en medio nutriente de agar, como sigue:

- Colocar de 2 a 3 gotas de reactivo de oxidasa recientemente preparado (6.4) en un papel filtro en una caja de Patri.

- Con una barra de vidrio o un asa de alambre de platino (no de nicromel), colocar parte del cultivo en el papel filtro preparado.

- Considerar la aparición de un color azul marino purpúreo en un lapso de 10 segundos como una reacción positiva.

NOTA 6.- En cada ocasión que se use el reactivo de oxidasa, llevar a cabo pruebas de control con cultivos de organismos que se sepa dan una reacción positiva (Pseudomonas aeruginosa) y uno que dé una reacción negativa (E. coli) en 100 cm<sup>3</sup> de la muestra.

**10.- CALCULOS**

A partir del número de tubos que dan reacciones positivas en los medios de aislamiento y confirmativo, calcular por preferencia a las tablas estadísticas (ver tabla) el número más probable de organismos coliformes, termotolerantes y E. coli presuntiva en 100 cm<sup>3</sup> de la muestra. Cuando se emplean diluciones, el resultado final deberá multiplicarse por el factor de dilución para hacerlo equivalente.

En caso de no encontrar en las tablas la combinación de tubos adecuada, emplear para los cálculos la siguiente ecuación:

$$\text{NMP}/100 \text{ cm}^3 = \frac{\text{No. de tubos positivos} \times 100}{\sqrt{\frac{\text{cm}^3 \text{ de muestra}}{\text{en tubos negativos}} \times \frac{\text{cm}^3 \text{ de muestra}}{\text{en todos los tubos}}}}$$

**TABLA 1**

Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 5 tubos con porciones de 10 cm<sup>3</sup> en cada uno, 5 con porciones de 0.1 cm<sup>3</sup> y 5 con porciones de 0.1 cm<sup>3</sup>.

No. de tubos con reacciones positivas	Índice del N.M.P. por 100 cm <sup>3</sup>	Límite confiable del 95%
5 tubos	5 tubos	5 tubos
5 tubos	5 tubos	5 tubos
5 tubos	5 tubos	5 tubos

con 10 cm <sup>3</sup>	con 1 cm <sup>3</sup>	con 0.1 cm <sup>3</sup>		Inferior	Superior
0	0	0	<2		
0	0	1	2	<0.5	7
0	1	0	2	<0.5	7
0	2	0	4	<0.5	11
1	0	0	2	<0.5	7
1	0	1	4	<0.5	11
1	1	0	4	<0.5	11
1	1	1	6	<0.5	15
1	2	0	6	<0.5	15
2	0	0	5	<0.5	13
2	0	1	7	1	17
2	1	0	7	1	17
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

No. de tubos con reacciones positivas			Indice del N.M.P. por 100 cm <sup>3</sup>	Límite Confiable de 95%	
5 tubos con 10 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 1 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 0.1 cm <sup>3</sup>		Inferior	Superior
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
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	1000
5	5	0	240	68	750
5	5	1	350	120	1000
5	5	2	540	180	1400
5	5	3	920	300	3200
5	5	4	1600	640	5800
5	5	5	= <2400		

**TABLA 2**

Indice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 1 tubo con porciones de 10 cm<sup>3</sup> 5 tubos con porciones de 10 cm<sup>3</sup> y 5 tubos con porciones de 10 cm<sup>3</sup>.

No. de tubos con reacciones positivas			Indice del NMP por 100 cm <sup>3</sup>	Límite confiable de 95%	
1 tubo con 50 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 10 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 1 cm <sup>3</sup>		Inferior	Superior
0	0	0	<1		
0	0	1	1	<0.5	4
0	0	2	2	<0.5	6
0	1	0	1	<0.5	4
0	1	1	2	<0.5	6
0	1	2	3	<0.5	8

0	2	0	2	<0.5	6
0	2	1	3	<0.5	8
0	2	2	4	<0.5	11
0	3	0	3	<0.5	8
0	3	1	5	<0.5	13
0	4	0	5	<0.5	13
1	0	0	1	<0.5	4
1	0	1	3	<0.5	8
1	0	2	4	<0.5	11
1	0	3	6	<0.5	15
1	1	0	3	<0.5	8
1	1	1	5	<0.5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	<0.5	13

No. de tubos con reacciones positivas			Indice del N.M.P. por 100 cm <sup>3</sup>	Límite Confiable de 95%	
1 tubo con 50 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 10 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 1 cm <sup>3</sup>		Inferior	Superior
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
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	100
1	4	5	43	15	120
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	100
1	5	2	54	18	140

1	5	3	92	27	220
1	5	4	160	39	450
1	5	5	=		
			>240		

**TABLA 3**

Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 5 tubos con porciones de 50 cm<sup>3</sup>, 5 tubos con porciones de 10 cm<sup>3</sup> y 5 tubos con porciones de 1 cm<sup>3</sup>.

No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100 cm <sup>3</sup>	Límite confiable de 95%	
5 tubos con 50 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 10 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 1 cm <sup>3</sup>		Inferior	Superior
0	0	0	<1		
0	0	1	1	<0.5	2
0	1	0	1	<0.5	2
0	1	1	1	<0.5	2
0	2	0	1	<0.5	2
0	3	0	1	<0.5	2
1	0	0	1	<0.5	2
1	0	1	1	<0.5	2
1	1	0	1	<0.5	2
1	1	1	1	<0.5	2
1	2	0	1	<0.5	2
1	2	1	2	<0.5	4
1	3	0	2	<0.5	4
2	0	0	1	<0.5	2
2	0	1	1	<0.5	2
2	1	0	1	<0.5	2
2	1	1	2	<0.5	4
2	2	0	2	<0.5	4
2	2	1	2	<0.5	4
2	3	0	2	<0.5	4
2	3	1	3	1	7
2	4	0	3	1	7
3	0	0	2	<0.5	4

3	0	1	2	<0.5	4
3	1	0	2	<0.5	4
3	1	1	2	<0.5	4
3	1	2	3	1	7
3	2	0	3	1	7
3	2	1	3	1	7
3	2	2	4	1	9
3	3	0	3	1	7
3	3	1	4	1	9
3	4	0	4	1	9
3	4	1	4	1	9
4	0	0	2	<0.5	4
4	0	1	3	1	7
4	0	2	3	1	7
4	1	0	3	1	7

No. de tubos con reacciones positivas			Indice del NMP por	Límite Confiable de 95%	
5 tubos con 50 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 10 cm <sup>3</sup>	5 tubos con 1 cm <sup>3</sup>	100 cm <sup>3</sup>	Inferior	Superior
4	1	1	4	1	9
4	1	2	4	1	9
4	2	0	4	1	9
4	2	1	4	1	9
4	2	2	5	2	12
4	3	0	5	2	12
4	3	1	5	2	12
4	3	2	6	2	14
4	4	0	6	2	14
4	4	1	7	3	17
4	5	0	7	3	17
4	5	1	8	3	19
5	0	0	4	1	9
5	0	1	4	1	9
5	0	2	6	2	14
5	1	0	5	2	12
5	1	1	6	2	14
5	1	2	7	3	17
5	2	0	6	2	14
5	2	1	8	3	19
5	2	2	10	4	23
5	2	3	12	4	28
5	3	0	9	3	21
5	3	1	11	4	26
5	3	2	14	5	34
5	3	3	18	6	53
5	4	0	13	6	31
5	4	1	17	6	47
5	4	2	22	7	70

5	4	3	28	9	85
5	4	4	35	11	100
5	5	0	24	8	75
5	5	1	35	11	100
5	5	2	54	18	140
5	5	3	92	27	220
5	5	4	160	39	420
5	5	5	=		
			>240		

**TABLA 4**

Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 3 tubos con porciones de 1 cm<sup>3</sup> y 3 con porciones de 0.1 cm<sup>3</sup>.

No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por cm <sup>3</sup>	Límite confiable de 95%	
3 tubos con 10 cm <sup>3</sup>	3 tubos con 1 cm <sup>3</sup>	3 tubos con 0.1 cm <sup>3</sup>		Inferior	Superior
0	0	0	<3		
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	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
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	280
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1,300
3	3	1	460	71	2,400
3	3	2	1,100	150	4,800
3	3	3	=		
			>2,400		



## 11.- REPORTE DE LA PRUEBA

El reporte de la prueba debe hacer referencia a esta norma oficial y dar toda la información relevante, incluyendo:

- a. Todos los detalles necesarios para la identificación completa de la muestra.
- b. La técnica y medio de cultivo empleados.
- c. El tiempo, temperatura y condiciones de la incubación.
- d. Los resultados expresados conforme a lo que se describe en el punto 10.
- e. Cualquier suceso particular observado en el curso del análisis y cualquier operación no especificada en el método o considerada opcional que pueda haber influido en los resultados.

## 12.- CONFIABILIDAD

El procedimiento de fermentación en tubos múltiples es el método más usado por su facilidad y economía. El resultado de esta prueba se expresa por el "número más probable" (NMP), pero debe entenderse que este método no es exacto ya que sólo nos da la probable densidad de bacterias coliformes totales o fecales de una muestra determinada.

La confiabilidad está dada por los niveles superiores o inferiores del límite de confianza al 95% establecidos en las tablas para cada NMP/100 cm<sup>3</sup>, no obstante, es una indicación importante para evaluar la calidad sanitaria del agua.

## 13.- BIBLIOGRAFIA

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER.  
15th edition. páginas 794-805. 1980.

## 14.- CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma concuerda parcialmente con el anteproyecto de norma ISO/DP 9308/2. Water quality-Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive Escherichia coli by the multiple tube (most probable number) method.